

Agrociencia

Volumen 54, Número 7

1 de octubre - 15 de noviembre, 2020



Dra. MARÍA DE LOURDES DE LA ISLA DE BAUER
Profesor Investigador Titular
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 7, 1 de octubre - 15 de noviembre, 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, **15 de noviembre 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.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: María de Lourdes de la Isla de Bauer
Profesor Investigador Titular, CP



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 54

1 de octubre - 15 de noviembre, 2020

Número 7

Biotecnología ⇌ Biotechnology

- IDENTIFICACION DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS RIZOSFÉRICAS Y ENDÓFITAS ASOCIADAS A *Lycopersicon esculentum* Mill EN EL NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA ⇌ IDENTIFICATION OF RHIZOSPHERIC AND ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA ASSOCIATED TO *Lycopersicon esculentum* Mill FROM THE NORTE OF SANTANDER, COLOMBIA
 Laura Y. **Moreno-Rozo**, Fabián **Galvis-Serrano**..... 843

- In vitro* PROPAGATION, ACCLIMATIZATION AND IDENTIFICATION OF A WILD SPECIES OF *Physalis* WITH ALIMENTARY UTILITY IN PUEBLA, MÉXICO ⇌ PROPAGACIÓN *in vitro*, ACLIMATACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UNA ESPECIE SILVESTRE DEL GÉNERO *Physalis* CON UTILIDAD ALIMENTARIA, EN PUEBLA, MÉXICO
 Elsa **Ventura-Zapata**, Jeanette **Meléndez-Mendoza**, Mirna María **Sánchez-Rivera**, Jonathan **Sánchez-Muñoz**, Nadia Primavera **Tapia-Barrera**, Minerva **Méndez-Tinajero** 859

Ciencia de los Alimentos ⇌ Food Science

- CARATERIZACION SENSORIAL DE LÁMINAS PANIFICADAS DE HARINA DE MAÍZ EN RESPUESTA A MEZCLAS CON HARINA DE AJONOLLI ⇌ SENSORIAL CHARACTERIZATION OF MAIZE-FLOUR BAKED PRODUCTS IN RESPONSE TO SESAME-FLOUR MIXES
 Rodrigo **Santos López**, Lilia Leticia **Méndez Lagunas**, Laura Victoria **Aquino González**, Juan **Rodríguez Ramírez**, Sadoth **Sandoval Torres**, Luis Gerardo **Barriada Bernal**, Irene **Chaparro-Hernández**..... 873

- EFEECTO DE LA ADICIÓN DE MIEL DE ABEJA SIN AGUIJÓN (*Scaptotrigona mexicana*) EN LA CONSERVACIÓN DE CARNE DE POLLO ⇌ EFFECT OF THE ADDITION OF STINGLESS BEE HONEY (*Scaptotrigona mexicana*) ON THE CONSERVATION OF CHICKEN MEAT
 Ricardo **Nepomuceno-Irene**, Aleida S. **Hernández-Cázares**, Ma. de los Ángeles **Vivar-Vera**, Juan Valente **Hidalgo-Contreras**, Adriana **Contreras-Oliva**, Natalia **Real-Luna**, Juan Antonio **Pérez-Sato**, Joel **Velasco-Velasco** 885

Ciencia Pecuaria ⇌ Animal Science

- BIOMETRÍA DEL CERDO CRIOLLO ECUATORIANO EN EL CONTEXTO DEL GANADO PORCINO IBEROAMERICANO ⇌ BIOMETRY OF ECUADORIAN CREOLE PIG IN THE CONTEXT OF IBEROAMERICAN SWINE
 Kleber **Estupiñán-Véliz**, Amparo **Martínez-Martínez**, Angel Carmelo **Sierra-Vásquez**, Eliecer **Pérez-Pineda**, Maricela Adelaida **Canul-Solis**, Francisco **Velázquez-Rodríguez**, Cecilio **Barba-Capote**..... 897

Fitociencia ⇌ Crop Science

- CRECIMIENTO Y TASA DE INTERCAMBIO DE CO₂ DE MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) OBTENIDO POR SEMILLA ⇌ GROWTH AND CO₂ EXCHANGE RATE OF MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) OBTAINED BY SEED
 Sonia Teresa **Cruz-Vasconcelos**, Lucero del Mar **Ruiz-Posadas**, Edmundo **García-Moya**, Manuel **Sandoval-Villa**, Nicacio **Cruz-Huerta** 911

- CONFIRMATION OF GRAIN AMARANTH (*Amaranthus* spp.) LANDRACES BY CANONICAL DISCRIMINANT ANALYSIS ⇌ CONFIRMACIÓN DE RAZAS GEOGRÁFICAS DE AMARANTO (*Amaranthus* spp.) POR ANÁLISIS DISCRIMINANTE CANÓNICO
 Eduardo **Espitia-Rangel**, Diana **Escobedo-López**, Carlos A. **Núñez-Colín**, Miriam J. **Aguilar-Delgado**, Patricia **Rivas-Valencia**, Luisa F. **Sesma-Hernández** 927

Matemáticas Aplicadas, Estadística y Computación ⇌

COMPARISON OF LINEAR AND NONLINEAR MODELS: THE CASE OF THE ROSE QUALITY STEMS ⇌
COMPARACIÓN DE MODELOS LINEALES Y NO LINEALES: EL CASO DE LA CALIDAD DE TALLOS DE ROSA

Martha Elva **Ramírez-Guzmán**, Ma. de Lourdes **Arévalo-Galarza**, Gumercindo **de la Cruz-Guzman**..... 939

Protección Vegetal ⇌ **Plant Protection**

BIOCONTROL DE *Trichoderma* spp. HACIA PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*) ⇌
BIOCONTROL OF *Trichoderma* spp. TO PATHOGENS OF SUGARCANE ROOT (*Saccharum officinarum*)

Lidia Concepción **Gamboa-Villa**, Edgar **Martínez-Fernández**, Patricia **Martínez-Jaimes**, Ramón **Suárez-Rodríguez**,
José Augusto **Ramírez-Trujillo**..... 955

BIOFERTILIZACIÓN FOLIAR CON ALGAS MARINAS (*Algae* (L.)) A UN VIÑEDO Y SU RELACIÓN CON CONTENIDO DE HIERRO, FOTOSÍNTESIS Y RENDIMIENTO ⇌
FOLIAR BIOFERTILIZATION WITH SEA WEEDS (*Algae* (L.)) ON A VINEYARD IN RELATION TO IRON CONTENT, PHOTOSYNTHESIS AND YIELD

Saúl Alejandro **Salmerón-Bravo**, Alejandro **Zermeño-González**, Jorge **Méndez-González**, Homero **Ramírez-Rodríguez**,
Martín **Cadena-Zapata**..... 967

IDENTIFICACION DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS RIZOSFÉRICAS Y ENDÓFITAS ASOCIADAS A *Lycopersicon esculentum* Mill EN EL NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA

IDENTIFICATION OF RHIZOSPHERIC AND ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA ASSOCIATED TO *Lycopersicon esculentum* Mill FROM THE NORTE OF SANTANDER, COLOMBIA

Laura Y. Moreno-Rozo¹, Fabián Galvis-Serrano^{2*}

¹Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas MAJUMBA. Universidad Francisco de Paula Santander, Sede Cúcuta, Colombia. (laurayolimamr@ufps.edu.co). ²Grupo de Investigación Biogen. Universidad de Santander, Sede Cúcuta. Colombia. (fsg999@hotmail.com).

RESUMEN

Las bacterias diazotróficas pueden estimular el crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mediante la síntesis de hormonas, fijación de N y producción de sideróforos, u otros procesos. Las bacterias diazotróficas predominantes en los agroecosistemas pueden ser biofertilizantes potenciales. El objetivo del estudio fue cuantificar y caracterizar la población de bacterias diazotróficas rizosféricas en muestras de suelo rizosférico (SR) y bacterias diazotróficas endófitas en muestras de raíces (R) y material foliar (MF), mediante pruebas fenotípicas y moleculares. El estudio fue exploratorio y con un muestreo aleatorio, con 18 muestras SR, raíces (R) y MF de cultivos de tomate en seis fincas. Las diferencias en el número más probable (NMP) de bacterias diazotróficas no fueron significativas entre los sitios de las muestras de MF y R. La media de NFB mostró diferencias altamente significativas en *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. entre las muestras de SR, R y MF, con un NMP mayor y menor en SR y MF. Esto se relaciona con la caracterización fenotípica y bioquímica de SR donde se identificaron 14 aislados como *Azotobacter* sp. y siete como *Azospirillum* sp. Los géneros *Burkholderia* y *Gluconacetobacter* no mostraron diferencias significativas en el número de aislados entre muestras de SR y R, pero sí respecto a MF, con la población celular menor. Las diferencias entre las fincas no fueron significativas en las variables del suelo relacionadas con la disimilitud de NMP. La caracterización molecular permitió identificar *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. brasilense*, *B. glumae* y *G. azotocaptans*/*G. johannae* en muestras de SR; *B. glumae*, *G. azotocaptans*/*G. johannae* en muestras de R y *G. azotocaptans*/*G. johannae* en muestras de MF.

ABSTRACT

Diazotrophic bacteria can stimulate the growth of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) crop by hormone synthesis, with N fixation and the production of siderophores, or other processes. The predominant diazotrophic bacteria in agroecosystems may be potential biofertilizers. The aim of this study was to quantify and characterize the population of rhizospheric diazotrophic bacteria in samples of rhizospheric soil (RS) and endophytic diazotrophic bacteria in root (R) and foliar material (FM) samples, with phenotypical and molecular tests. The study was exploratory and with random sampling, with 18 RS, roots (R) and FM samples of tomato plantations in six farms. The differences in the most probable number (MPN) of diazotrophic bacteria were not significant between the FM and R sampling sites. The mean of the Mfb displayed highly significant differences in *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. between the RS, R and FM samples, with a higher and lower MPN in RS and FM. This relates with the phenotypical and biochemical characterization of RS, in which 14 isolations were identified as *Azotobacter* sp., and seven as *Azospirillum* sp. The genera *Burkholderia* and *Gluconacetobacter* showed no significant differences in the number of isolations between RS and R samples, but they did with FM, with the lower cell population. The differences between the farms were not significant in the soil parameters, related to the dissimilarity of the MPN. Molecular characterization helped identify *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. brasilense*, *B. glumae* and *G. azotocaptans*/*G. johannae* in samples of RS; *B. glumae*, *G. azotocaptans*/*G. johannae* in samples of R and *G. azotocaptans*/*G. johannae* in FM samples.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2018. Aprobado: noviembre, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 843-857. 2020.

Key words: Diazotrophic, endophytic, rhizospheric, *Lycopersicon esculentum*, North Santander.

Palabras claves: diazotróficas, endófitas, rizosféricas, *Lycopersicon esculentum* Norte de Santander.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es la segunda hortaliza más importante en el mundo después de la papa (*Solanum tuberosum* L.) (Pérez *et al.*, 2015). Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística, en Colombia, el área sembrada con cultivos transitorios y permanentes aumentó 5.7 y 0.2% durante 2015 respecto a 2014 (DANE, 2016). De las 2 332 577 ha, 65.6% correspondió a cultivos permanentes y 34.4% a cultivos transitorios. La producción agrícola incrementó 0.3%, equivalente a 34 231 t más que en 2014. Del total de la producción agrícola de 2015, 49.3% correspondió a cultivos transitorios y 50.7% a permanentes; la disminución mayor en área sembrada correspondió a tomate, con 1875 ha menos que en 2014 (DANE, 2016). El municipio de Chinácota concentra la producción mayor de hortalizas de la zona sur-oriente del departamento Norte de Santander.

El tomate es una planta que demanda gran cantidad de N, P, K, Ca, Mg, Cu, B y Zn. La relación de fertilización N:K es 1:1 desde el trasplante hasta la floración y al inicio del llenado y la maduración de los frutos la demanda de K incrementa a 1:2 o 1:3. La fertilización se recomienda desde el trasplante hasta la formación del último racimo a cosechar, consistente de 200 g de N, P y K por planta (DANE, 2014). La mayoría de los cultivos agrícolas en el departamento Norte de Santander dependen de fertilizantes químicos sintéticos; sin embargo, su uso prolongado causa aumentos en los costos de producción, contaminación ambiental, daños ecológicos, e impacto negativo en la salud animal y humana (Flores *et al.*, 2012). La tendencia mundial demanda tecnologías que contribuyan con la recuperación y mantenimiento del suelo mediante estrategias de economías viables que mejoren su calidad y productividad. Las bacterias diazotróficas en la rizósfera estimulan el crecimiento de las plantas mediante mecanismos como síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, fijación del N, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y control de fitopatógenos del suelo. *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. promueven el crecimiento en cultivos

INTRODUCTION

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is the world's second most important vegetable after the potato (*Solanum tuberosum* L.) (Pérez *et al.*, 2015). According to the National Statistics Administration Department, in Colombia, the area planted with provisional and permanent crops increased 5.7 and 0.2% during 2015 in comparison with 2014 (DANE, 2016). Out of the 2,332,577 ha., 65.6% were used for permanent crops and 34.4% for provisional crops. Agricultural production increased 0.3%, equal to 34 231 t more than in 2014. Out of the total of the agricultural production of 2015, 49.3% was provisional crops, and 50.7%, permanent; the greater distribution in planted areas was of tomatoes, with 1875 ha less than in 2014 (DANE, 2016). The municipal area of Chinácota concentrates the highest production of vegetables in the southeastern area of the department of Norte de Santander.

The tomato plant demands a great amount of N, P, K, Ca, Mg, Cu, B and Zn. The N:K fertilization ratio is 1:1 from grafting until flowering and at the beginning of the filling and maturation of the fruits, the demand for K increases to 1:2 or 1:3. Fertilization is recommended between transplanting and the formation of the last bunch to be harvested, and to consist of 200 g of N, P and K per plant (DANE, 2014). Most agricultural crops in the department of Norte de Santander depend on synthetic chemical fertilizers; however, its prolonged use causes increases in production costs, environmental contamination, ecological damage and a negative impact on human and animal health (Flores *et al.*, 2012). World tendencies demand technologies that contribute with the recovery and the maintenance of soils with viable economy strategies that improve their quality and productivity. The diazotrophic bacteria in the rhizosphere stimulate plant growth with mechanisms such as the synthesis of plant growth regulators, N fixation, nutrient solubilization, siderophore production and the control of soil phytopathogens. *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. promote growth in agricultural crops, due to their ability to adapt, colonize and persist in the plant rhizosphere (Moreno and Galvis, 2013). Endophytic bacteria are organisms that reside in plant tissues, in intracellular spaces and inside

agricolas, por su capacidad de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta (Moreno y Galvis, 2013). Las bacterias endófitas son organismos que residen en los tejidos de las plantas, en espacios intercelulares y dentro de tejidos vasculares (Barraza *et al.*, 2017). Estas bacterias fijan N y fósforo, y actúan como biocontroladores y promotores de la fitoremediación (Doncel *et al.*, 2016).

Las especies de bacterias diazotróficas predominantes en los agroecosistemas son importantes (Alfonso *et al.*, 2005) en los sistemas de producción de *L. esculentum* Mill. En esos sistemas es común el uso de agroquímicos sintéticos y es necesario definir la eficiencia de biofertilizantes potenciales para aumentar las alternativas en el desarrollo de una agricultura sustentable y con producción a bajo costo (Guzmán *et al.*, 2012). El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar las bacterias diazotróficas rizosféricas de muestras de suelo de la rizósfera y bacterias diazotróficas endófitas de muestras de material foliar y raíces, asociadas a cultivos de tomate de diferentes fincas, ubicadas en la principal zona de producción de hortalizas en el sur oriente del departamento Norte de Santander. Lo anterior permitirá conocer las principales bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas en el cultivo del tomate en la mayor zona de producción del departamento Norte de Santander, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Un muestreo aleatorio en diagonal se realizó para obtener muestras de suelo rizosférico (SR), material foliar (MF) y raíces (R) de cultivos de tomate, en seis fincas del municipio de Chinácota, zona sur oriental de Norte de Santander (7° 31' 00" N y 72° 37' 00" O, 21 °C promedio, 1200 mm precipitación anual promedio y 900 y 1800 msnm). En cada finca se obtuvo una muestra compuesta de SR, MF y R (18 muestras en total). Las muestras SR se formaron con cuatro submuestras, extraídas de 5 a 10 cm de profundidad (Martyniuk y Martyniuk, 2002; Tejera *et al.*, 2005). Las muestras MF y R incluyeron 10 a 15 plantas por cultivo; las muestras R incluyeron cortes con longitud aproximada de 10 cm de todo el sistema radical. En las muestras de suelo se determinó pH, conductividad eléctrica, textura, Mg, Ca, K, P, materia orgánica relación Ca/Mg y microelementos.

vascular tissues (Barraza *et al.*, 2017). These bacteria fixate N and phosphate and act as biocontrollers and promoters of phytoremediation (Doncel *et al.*, 2016).

Diazotrophic bacteria species that predominate in agroecosystems are important (Alfonso *et al.*, 2005) in the *L. esculentum* Mill. production systems. In these systems, the use of synthetic agrochemicals is common, and it is necessary to define the efficiency of potential biofertilizers to increase the alternatives in the development of a sustainable agriculture and with low production costs (Guzmán *et al.*, 2012). The aim of this study was to isolate and characterize rhizospheric diazotrophic bacteria from rhizospheric soil samples and endophytic diazotrophic bacteria from samples of foliar material and roots related to tomato plantations in different farms located in the main vegetable-producing area in the southeast of the department of Norte de Santander. This will help know the main rhizospheric and endophytic diazotrophic bacteria in the tomato plantations in the largest production area in the department of Norte de Santander, Colombia.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

A diagonal random sampling was carried out to obtain samples of rhizospheric soil (RS), foliar material (FM) and roots (R) from tomato plantations in six farms in the municipal area of Chinácota, in southeastern Norte de Santander (7° 31' 00" N y 72° 37' 00" O, 21 °C average, 1200 mm average annual rainfall and 900 and 1800 masl). In each farm, a compound sample of Rs, FM and R was taken (18 samples in total). The RS samples were formed with four subsamples, taken at a depth of 5 to 10 cm (Martyniuk and Martyniuk, 2002; Tejera *et al.*, 2005). The samples of FM and R included 10 to 15 plants per plantation; the R samples included cuts with an average length of 10 cm from the whole root system. In the soil samples, we determined pH, electrical conductivity, texture, Mg, Ca, K, P, Ca/Mg ratio organic matter and microelements.

Quantification of the Most Probable Number (MPN)

A 10 g soil sample was resuspended in 90 mL of buffered peptone water and we obtained dilutions in series up to 10⁻⁷. The

Cuantificación del Número más Probable (NMP)

Una muestra de 10 g de suelo se resuspendieron en 90 mL de agua peptona amortiguada y se obtuvieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Las raíces lavadas se segmentaron (1 cm de longitud), desinfectaron con alcohol al 70%, por 1 min, e hipoclorito de sodio al 2%, por 2 min, y se enjuagaron dos veces con agua destilada. De la muestra se maceraron 10 g con 90 mL de agua peptona amortiguada y se obtuvieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . De las muestras MF 10 g se lavaron con agua destilada y desinfectaron con alcohol al 70%, se resuspendieron en 90 mL de agua peptona amortiguada y se maceraron. De esta mezcla se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} (Cárdenas *et al.*, 2010). A partir de las diluciones 10^{-2} y hasta 10^{-7} se inocularon por triplicado, 0.1 mL, en viales con 5 mL de medio semisólido selectivo para diazotófos (NFB para *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., JMV para *Burkholderia* sp. y LGI para *Gluconacetobacter* sp.) y se mantuvieron 8 d a 32 ± 2 °C, para formar una película subsuperficial. Los resultados se obtuvieron con la Tabla de Mc Craddy (Döbereiner *et al.*, 1995). El análisis estadístico de los datos con la técnica del NMP se hizo con el programa Infostat.

Caracterización de los aislados

El contenido de los viales con crecimiento y película en la superficie se usó para siembra directa en los medios sólidos selectivos: Asbhy (*Azotobacter* sp.), Rojo Congo (*Azospirillum* sp.), JMV (*Burkholderia* sp.) y LGI-P (*Gluconacetobacter* sp.). Con tinción de Gram se determinó la morfología celular, tipo de agregación y presencia de estructuras, como quistes.

Identificación bioquímica

Cada aislado se identificó con el sistema BBL Crystal que incluye pruebas para fermentación, oxidación, degradación, hidrólisis de diversos sustratos, oxidasa, catalasa y motilidad en fresco.

Identificación molecular

La identificación molecular se hizo en los aislados con caracterizaciones microbiológicas y bioquímicas de las muestras SR, MF y R. Los testigos positivos fueron: *Azotobacter vinelandii* ATCC® 478™, *A. nigricans* ATCC® 35009™, *A. chroococcum* ATCC® 9043™, *Azospirillum brasilense* ATCC® 29145™, *A. amazonense* ATCC® 35119™, *Burkholderia glumae* ATCC® 33617™ y *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC®700988™. El ADN de los aislados y testigos positivos se obtuvieron con el *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit* de MoBio. La identificación molecular se hizo con oligonucleótidos específicos (Cuadro 1) de

washed roots were segmented (1 cm in length), disinfected with alcohol at 70% for 1 min, and sodium hypochlorite at 2% for 2 min, and rinsed twice with distilled water. From the sample, 10 g were softened with 90 mL of buffered peptone water and we obtained dilutions in series up to 10^{-7} . From the FM samples, 10 g were washed with distilled water and disinfected with alcohol at 70%, resuspended in 90 mL of buffered peptone water and softened. This mixture was used to make dilutions in series up to 10^{-7} (Cárdenas *et al.*, 2010). The dilutions between 10^{-2} and 10^{-7} were inoculated in triplicate, 0.1 mL, in vials with 5 mL of a selective, semi-solid medium for diazotrophes (NFB for *Azospirillum* sp. and *Azotobacter* sp., JMV for *Burkholderia* sp. and LGI for *Gluconacetobacter* sp.) and they were kept 8 d at 32 ± 2 °C, to form a subsuperficial film. The results were obtained using McCraddy's chart (Döbereiner *et al.*, 1995). The statistical analysis of the data with the MPN technique was performed using the program Infostat.

Characterization of the isolations

With the content of the vials with growths and film on the surface, the planting was performed directly on the selective solid media: Asbhy (*Azotobacter* sp.), Rojo Congo (*Azospirillum* sp.), JMV (*Burkholderia* sp.) and LGI-P (*Gluconacetobacter* sp.). With a Gram stain, we determined the cell morphology, type of aggregation and the presence of structures such as cysts.

Biochemical identification

Each isolation was identified using the BBL Crystal system, which includes tests for fermentation, oxidation degradation, the hydrolysis of several substrates, oxidase, catalase and fresh motility.

Molecular identification

The molecular identification was carried out on the isolations, with microbiological and biochemical characterizations of the samples of RS, FM and R. The positive controls were *Azotobacter vinelandii* ATCC® 478™, *A. nigricans* ATCC® 35009™, *A. chroococcum* ATCC® 9043™, *Azospirillum brasilense* ATCC® 29145™, *A. amazonense* ATCC® 35119™, *Burkholderia glumae* ATCC® 33617™ and *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC®700988™. The DNA of the isolations and positive controls were obtained with the *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit* by MoBio. Molecular identification was carried out with specific oligonucleotides (Table 1) from *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense*, *A. brasilense* (designed in this study), *Burkholderia* sp. (Gijon *et al.*, 2011), *B. glumae*

Cuadro 1. Características de los oligonucleótidos.
Table 1. Characteristics of oligonucleotides.

Bacteria diazotrófica	Cebador	Secuencia	Blanco	Tamaño (pb)	C° de hibridación	Fuente
<i>A. chroococcum</i>	AchroTF	GCTTTTCATAAGCTCCCACA	ARNr	308	58	Este trabajo
	AchroTR	CGTTTCTGAGCTTTCAGCGAT	16 S			
<i>A. nigricans</i>	AnigrTF	GCTGCGGCAGGCCTAACA	ARNr	428	60	Este trabajo
	AnigrTR	TATTAGCCCCGCGGCCCTTC	16 S			
<i>A. vinelandii</i>	AvineTF	CGACCTCGCGCAAGGCAAGA	ARNr	230	60	Este trabajo
	AvineTR	CAGTGAAACAATCGACGCGT				
<i>A. amazonense</i>	AamaTF	GATGGTTGTGGAGACTGTCAG	ARNr	631	58	Este trabajo
	AamaTR	GAACCCCAACGTCTAGCACTC	16 S			
<i>A. brasilense</i>	AbraTF	CTCCCGCGCCAGCGAGCGGCG	<i>UbiH</i>	448	60	Este trabajo
	AbraTR	ACTCAGCATGGCGGCGGCCCT				
<i>Burkholderia</i> sp.	RHGF	GGGATTTCATTTCCCTTAGTAAC	ARNr	511	55	Gijon <i>et al.</i> , 2011
	RHGR	GCGATTACTAGCGATTCCAGC	16 S			
<i>B. glumae</i>	glu-F	GAAGTGTGCGCCGATGGAG	<i>gyrB</i>	529	58	Karki <i>et al.</i> , 2012
	glu-R	CCTTCACCGACAGCACGCAT				
<i>Gluconacetobacter</i> sp.	GluG	AATGACTGGGCGTAAAG	ARNr	467	67	Fuentes <i>et al.</i> , 2001
<i>G. azotocaptans</i>	GluA	AATGCTCATCTCTGAACA	16 S			
<i>G. johannae</i>	GluJ	GAAATGAACATCTCTGCT	469			

A. chroococcum, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense*, *A. brasilense* (diseñados en este estudio), *Burkholderia* sp. (Gijon *et al.*, 2011), *B. glumae* (Karki *et al.*, 2012), *G. azotocaptans* y *G. johannae* (Fuentes *et al.*, 2001). El diseño de oligonucleótidos se hizo con secuencias de ARNr 16s y el gen *UbiH*; su similitud se comprobó con el software en línea BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y el software Workbench y su especificidad se probó con cepas autenticadas de ATCC de *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* y *A. brasilense*. La mezcla de PCR se obtuvo en 50 μ L, con 1X de amortiguador de ADN polimerasa, 200 μ M de dNTP, 1 U de ADN polimerasa, 1 μ M de cada iniciador y 2 μ L de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación (temperatura específica para cada especie (Cuadro 1) por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min, y extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% y teñidos con SYBR Green.

Número de acceso a la secuencia de nucleótidos

Los números de acceso de las secuencias de nucleótidos de GenBank utilizadas en el diseño de oligonucleótidos, para la identificación de las bacterias diazotróficas mediante herramientas de bioinformática fueron las siguientes. *A. chroococcum*: AF083211.1, AB430881.1 y CP011835.1; *A. nigricans*: KP966496.1, JX262176.1, JX262168.1 y NR_041033.1;

(Karki *et al.*, 2012), *G. azotocaptans* and *G. johannae* (Fuentes *et al.*, 2001). The oligonucleotides were designed with ARNr 16s sequences and the gene *UbiH*; its similarity was verified using the online software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) and the software Workbench, and its specificity was tested with authenticated ATCC *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* and *A. brasilense* strains. The PCR mixture was obtained in 50 μ L, with 1X of DNA polymerase buffer, 200 μ M of dNTP, 1 U of DNA polymerase, 1 μ M of each primer and 2 μ L of DNA. Amplification conditions were as follows: initial denaturalization at 95 °C for 5 min, 35 cycles with denaturalization at 95 °C for 1 min, hybridization (specific temperature for each species (Table 1)) for 30 s, extension at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were viewed in agarose gels at 1% and dyed with SYBR Green.

Number of access to the nucleotide sequence

The numbers of access to the GenBank nucleotide sequences used in the design of oligonucleotides for the identification of diazotrophic bacteria, using bioinformatics tools were the following: *A. chroococcum*: AF083211.1, AB430881.1 y CP011835.1; *A. nigricans*: KP966496.1, JX262176.1, JX262168.1 y NR_041033.1; *A. vinelandii*: LK473371.1, CP005095.1, CP005094.1, CP001157.1 y AF079808.1; *A. amazonense*: NR_104981.1, AB682665.1, GU458288.1,

A. vinelandii: LK473371.1, CP005095.1, CP005094.1, CP001157.1 y AF079808.1; *A. amazonense*: NR_104981.1, AB682665.1, GU458288.1, NR_117477.1, AY752913.1 y X79742.1; *A. brasilense*: CP022253.1, CP012914.1, CP007793.1, HE577327.1, AF279917.1 y X92496.1.

NR_117477.1, AY752913.1 y X79742.1; *A. brasilense*: CP022253.1, CP012914.1, CP007793.1, HE577327.1, AF279917.1 y X92496.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fisicoquímico de suelos

Los suelos analizados presentaron textura variada media a gruesa, pH entre 5.4 y 7.2 (7.2 en la finca 6), K entre 83 y 606 ppm, P entre 5 y 157 ppm y materia orgánica entre 1.5 y 3.81 % (Cuadro 2).

El tomate se adapta a una gran variedad de suelos, con pH de 5.8 a 6.8 y neutro (DANE, 2014). Vallejo y Estrada (2004) reportaron que los suelos de textura franca o franco-arcillosa con pH entre 6.5-7.9 y capacidad alta de intercambio catiónico promovieron el crecimiento y desarrollo del cultivo. Esto permite explicar por qué el pH 7.20 del suelo de la finca 6 no afecta la producción de tomate, pero pH superior a 6.5, como el de la finca 6, disminuye la disponibilidad de micronutrientes (Fe, Zn, Mn y Cu), B y P; y esos micronutrientes son necesarios para el desarrollo de bacterias diazotróficas, lo cual podría relacionarse con el número bajo de microorganismos (10^4 células g^{-1} suelo) en SR de esta finca.

RESULTS AND DISCUSSION

Physical and chemical analysis of soils

The soils analyzed presented medium to thick varied textures, with pH ranging between 5.4 and 7.2 (7.2 in farm 6), K between 83 and 606 ppm, P between 5 and 157 ppm and organic matter ranging between 1.5 and 3.81 % (Table 2).

The tomato adapts to a large variety of soils with a pH of 5.8 to 6.8 and neutral (DANE, 2014). Vallejo and Estrada (2004) reported that the soils with loamy or clay-loam textured soils with a pH of between 6.5-7.9 and a high ability for cationic exchange promoted the growth and development of the crop. This helps explain why the pH of 7.20 of the soil in farm 6 did not affect the tomato production, yet a pH higher than 6.5, like in farm 6, reduces the availability of micronutrients (Fe, Zn, Mn and Cu), B and P; and those micronutrients are required for the development of diazotrophic bacteria, which could be related to the low number of microorganisms (10^4 cells g^{-1} soil) in the RS of this farm.

Cuadro 2. Ubicación y características físico químicas del suelo de las fincas estudiadas.

Table 2. Location and physical and chemical characteristics of the soil in the farms studied.

Finca	Ubicación	msnm	Textura	Materia Orgánica %	Nitrógeno %	Fosforo ppm	Potasio ppm	Calcio ppm	Magnesio ppm	pH
La Primavera (F1)	N 07° 31' 793" O 072° 34' 413"	1847.7	Franco	1.50	0.075	157	419	2348	165	5.50
El Bordo (F2)	N 07° 32' 486" O 072° 34' 518"	1759.6	Franco arenoso	1.86	0.093	148	496	2306	207	6.04
La Ponderosa (F3)	N 07° 34' 347" O 072° 35' 912"	1412.37	Franco arenoso	2.25	0.112	44	289	1033	109	5.54
El Amparito (F4)	N 07° 36' 717" O 072° 35' 704"	1238.65	Franco arenoso	2.75	0.137	35	83	1580	39	5.40
Lindarte (F5)	N 07° 37'564" O 072° 37'627"	955.50	Franco arcilloso arenoso	2.49	0.124	30	606	4545	333	6.40
Los Ibarra (F6)	N 07° 37'001" O 072° 35'441"	1392.56	Franco arcilloso arenoso	3.81	0.191	5	525	16303	422	7.20

Cuantificación del NMP

Las diferencias significativas en las variables del suelo que se relacionan con la disimilitud de NMP en SR, MF y R no fueron significativas (Cuadro 3). Las muestras SR, con textura gruesa, de las fincas 2, 3 y 4 mostraron 10^6 a 10^7 células g^{-1} de suelo, en comparación con las fincas 1, 5 y 6, con textura media y 10^4 a 10^5 células g^{-1} de suelo (Cuadro 3). Lacasta *et al.* (2005) señalaron que la textura de los suelos origina diferente porosidad y agregación, que pueden generar problemas de endurecimiento, aireación, capacidad de retención hídrica y permeabilidad. En condiciones ambientales similares se debe prever que en suelos de texturas más gruesas la aireación es mayor, lo que favorece los procesos de degradación producto de la actividad microbiana. Las diferencias entre NMP de los tipos de muestras con el medio NFb, específico para los géneros *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp., fueron altamente significativas en el número de bacterias entre SR, R y MF; el aumento mayor fue en SR y el menor en MF. Esto coincidió con lo observado por Castro *et al.* (2007) de que en la rizósfera se depositan 5 a 20 % de los exudados derivados de la fotosíntesis, que permiten la proliferación de la microbiota y originan aumento en las poblaciones microbianas en el suelo. Remans (2007) afirmó que en los suelos agrícolas, excepto por los aportes antropogénicos, las comunidades diazotróficas son la fuente principal de N y puede mejorar la producción de los cultivos y disminuir el uso de fertilizantes sintéticos.

MPN quantification

The significant differences in the soil variables that relate to the dissimilitud of MPN in RS, FM significant (Table 3). The RS samples with a coarse texture from farms 2, 3 and 4 displayed 10^6 to 10^7 cells g^{-1} of soil, in comparison with farms 1, 5 and 6, with a medium texture and 10^4 and 10^5 cells g^{-1} of soil (Table 3). Lacasta *et al.* (2005) pointed out that the texture of soils originates different porosity and aggregation, which can cause problems with hardening, airing and capacity of water retention and permeability. Under similar environmental conditions, the fact that coarser soils display higher airing must be foreseen, and this favors the degradation processes resulting from microbial activity. The differences between the MPN of the type of samples with the Nfb medium, specific to the genera *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp., were highly significant in the number of bacteria between RS, R and FM; the increase was greater in RS and lowest in FM. This agrees with observations by Castro *et al.* (2007) regarding the fact that 5 to 20% of the exudates derived from photosynthesis are deposited in the rhizosphere, allowing microbiota to proliferate and causing an increase in the microbial populations in the soil. Remans (2007) claimed that in agricultural soils, with the exception of anthropogenic contributions, diazotrophic communities are the main source of N and can improve the production of crops and reduce the use of synthetic fertilizers.

Cuadro 3. Población de bacterias diazotróficas en muestras de suelo rizosférico, raíces y material foliar.
Table 3. Population of diazotrophic bacteria in samples of rhizospheric soil, roots and foliar material.

Muestra	Medio de cultivo	NMP ^b por finca (células/gramo)						Análisis estadístico
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	
SR [†]	NFb	7.0×10^4	1.2×10^7	4.6×10^7	3.8×10^7	4.5×10^5	1.4×10^4	36.33 C
	JMV	4.5×10^5	5.3×10^6	6.0×10^6	5.7×10^6	3.1×10^5	2.6×10^4	36.17 C
	LGI	3.8×10^5	2.3×10^6	1.0×10^6	7.4×10^6	2.3×10^5	5.0×10^4	35.50 C
R [‡]	NFb	2.3×10^4	5.8×10^5	4.5×10^5	3.8×10^6	1.9×10^5	7.8×10^5	32.42 BC
	JMV	2.4×10^5	2.6×10^5	7.0×10^5	5.7×10^5	7.0×10^5	2.1×10^7	38.17 C
	LGI	9.8×10^4	2.1×10^6	1.1×10^5	7.4×10^4	1.2×10^5	8.4×10^6	32.17 BC
MF [§]	NFb	4.3×10^2	1.1×10^3	2.8×10^4	8.8×10^4	4.5×10^4	5.5×10^3	8.67 A
	JMV	6.2×10^4	4.3×10^4	6.3×10^4	9.0×10^4	6.7×10^4	2.3×10^4	16.75 AB
	LGI	4.7×10^4	5.7×10^4	2.9×10^4	1.9×10^4	1.5×10^4	4.7×10^4	11.33 A

[†]Suelo rizosférico, [‡]Raíces, [§]Material Foliar, ^bNumero más probable ♦ [†]Rhizospheric soil, [‡]Roots, [§]Foliar material,

^bMost Probable Number.

Los medios selectivos para los géneros *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp., no evidencian diferencias significativas entre las poblaciones obtenidas en SR y R, pero sí con respecto a MF en el cual la población celular es menor (Cuadro 3). Esto se ajusta a lo reportado por Khalid *et al.* (2006), de que la rizósfera de la planta es un ambiente ecológico muy importante para los microorganismos que colonizan las raíces de las plantas en crecimiento. Distintas comunidades de microorganismos beneficiosos del suelo están asociadas con los sistemas radicales de todas las plantas superiores.

Las muestras de SR de las fincas 2, 3 y 4 tuvieron un NMP de 10^7 células g^{-1} de suelo con base al resultado en medio Nfb. Estos resultados coinciden con lo descrito por Alfonso *et al.* (2005) quienes obtuvieron un NMP de 10^6 células g^{-1} de suelo e identificaron estos dos géneros. Los resultados en la cuantificación de *Burkholderia* sp. coinciden con los experimentos de Cárdenas *et al.* (2010) y Mantilla *et al.* (2009) en condiciones climáticas diferentes y reportan la predominancia del género en muestras de SR, debido al parecer a la amplia gama de hormonas vegetales que exudan, y permiten su adaptación en múltiples ambientes. *Gluconacetobacter* sp. también se aisló en muestras de SR, a pesar de ser endófito. Mantilla *et al.* (2009) indican la presencia del género *Gluconacetobacter* sp. en SR al ser liberado por medio de lixiviados. Garrido *et al.* (2010) reportan la presencia de *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. en muestras de R y MF de pastos, similar a lo encontrado en nuestro estudio.

Caracterización fenotípica y molecular

Caracterizaciones fenotípicas y bioquímicas se hicieron en los 37 aislados obtenidos de bacterias diazotróficas, 30 de las cuales se aislaron de SR. Como *Azotobacter* sp. se identificaron 14 aislados rizosféricos, muestras SR1-SR14, (Cuadro 4), con características macroscópicas de colonias irregulares, opacas, mucosas o secas de color café o crema y producción de quistes (Flores *et al.*, 2012). Los aislados SR10 y SR12 presentaron pigmento verde fluorescente, característico de *A. vinelandii* o *A. paspali*. En la identificación bioquímica 12 aislados fueron positivos con sacarosa, melibiosa, manitol, sorbitol, ureasa y oxidasa, propio de *A. vinelandii* y *A. chroococcum*; los aislados SR3 y SR8 fueron positivos con sacarosa,

The selective media for the genera *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp., do not display significant differences between the populations obtained in RS and R, but they do regarding FM, in which the cell population is lower (Table 3). This agrees with Khalid *et al.* (2006), who claims that the plant rhizosphere is a very important ecological environment for the microorganisms that colonize the roots of growing plants. Different communities of microorganisms that benefit the soil are related to the root systems of all higher plants.

The RS samples from farms 2, 3 and 4 had an MPN of 10^7 cells g^{-1} of soil, based on the result in the Nfb medium. These results coincide with descriptions by Alfonso *et al.* (2005), who obtained an MPN of 10^6 cells g^{-1} of soils and identified these two genera. The results of the quantification of *Burkholderia* sp. coincide with the experiments by Cárdenas *et al.* (2010) and Mantilla *et al.* (2009) under different weather conditions and report the predominance of the genus in RS, due, seemingly, to the wide range of plant hormones they exude and help them adapt to multiple environments. *Gluconacetobacter* sp. was also isolated in RS samples, despite being endophytic. Mantilla *et al.* (2009) indicate the presence of the genus *Gluconacetobacter* sp. in RS which were released by leachates. Garrido *et al.* (2010) report the presence of *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. in grass R and FM samples, similar to what was found in this study.

Phenotypic and molecular characterization

Phenotypic characterizations were carried out on the 37 isolations taken from diazotrophic bacteria, 30 of which were isolated from the RS. Fourteen rhizospheric isolations were identified as *Azotobacter* sp., along with SR1-SR14 samples (Table 4), with macroscopic characteristics of irregular cultures, dull-colored, mucous or dry, brown or cream-colored cultures and production of cysts (Flores *et al.*, 2012). Isolations SR10 and SR12 presented a fluorescent green pigment, typical of *A. vinelandii* or *A. paspali*. In the biochemical identification, 12 isolations were positive with sucrose, melibiose, mannitol, sorbitol, urease and oxidase, typical of *A. vinelandii* and *A. chroococcum*; isolations SR3 and SR8 were positive with sucrose, urease and oxidase, and negative with melibiose, mannitol and sorbitol, typical of

Cuadro 4. Identificación bioquímica y molecular de aislados diazotróficos rizosféricos y endófitos.
Table 4. Biochemical and molecular identification of diazotrophic, rhizospheric and endophytic isolations.

Muestra	Ubicación Bacteria	Bioquímica Probable Genero	Identificación		
			#	Especie	#
SR [†]	Rizosférico	<i>Azotobacter</i> sp.	14	<i>A. chroococcum</i>	5
				<i>A. vinelandii</i>	2
				<i>A. nigricans</i>	2
		<i>Azospirillum</i> sp.	7	<i>A. brasilense</i>	6
				<i>Burkholderia</i> sp.	6
				<i>B. glumae</i>	3
R [‡]	Endófito	<i>Gluconacetobacter</i> sp.	3	<i>G. azotocaptans/johannae</i>	3
		<i>Burkholderia</i> sp.	3	<i>B. glumae</i>	2
		<i>Gluconacetobacter</i> sp.	2	<i>G. azotocaptans/johannae</i>	2
		<i>Burkholderia</i> sp.	2	<i>B. glumae</i>	1

[†]Suelo rizosférico, [‡]Raíces, [§]Material Foliar ♦ [†]Rhizospheric soil, [‡]Roots, [§]Foliar material.

ureasa y oxidasa, y negativos con melibiosa, manitol y sorbitol, características de *A. nigricans*. Siete se identificaron como *Azospirillum* sp. (SR15-SR21) con características macroscópicas propias del género: colonias de color rosado, con detalle óptico opaco y formas irregulares o redondas, frecuentemente arrugadas y con elevación variable (Obando *et al.*, 2010). Los aislados correspondieron al género *Azospirillum*: positivo con oxidasa, fosfatasa, ureasa e hidrólisis de esculina, negativo con hidrólisis de gelatina, producción de pigmentos solubles en agua y producción de indol y variable para catalasa y azúcares (Garrity *et al.*, 2005).

Once aislados se identificaron como *Burkholderia* sp., 6 rizosféricos (SR22- SR27) y 5 endófitos de los cuales 3 se aislaron de muestras de R (R28- R30) y 2 de muestras de MF (MF31-MF32) (Cuadro 4). Los aislados presentaron características macroscópicas como colonias medianas a pequeñas, húmedas, blanquecinas con centro amarillo (Galvis y Carrillo, 2015). En las pruebas bioquímicas mostraron resultados positivos característicos a catalasa, oxidasa, arabinosa y sacarosa. Seis aislados dieron negativo para melibiosa y 2 débil, propio de *B. glumae* y *B. cepacea*, respectivamente (Garrity *et al.*, 2005). También se obtuvieron cinco aislados de *Gluconacetobacter* sp., tres rizosféricos (SR33- SR35) y dos endófitos a partir de muestras de R (R36 y R37) (Cuadro 4). Los aislados presentaron colonias de forma redonda, superficie lisa, elevación convexa o plano-convexa, color anaranjado y margen traslúcido o amarillo, que

A. nigricans. Seven were identified as *Azospirillum* sp. (SR15-SR21) with typical macroscopic characteristics of the genus: pink-colored cultures with a dull appearance and irregular or round shapes, frequently wrinkled and with a variable elevation (Obando *et al.*, 2010). The isolations belonged to the *Azospirillum* genus: positive with oxidase, phosphatase, urease and esculin hydrolysis, negative with gelatin hydrolysis, production of water-soluble pigments and the production of indole and variable for catalase and sugars (Garrity *et al.*, 2005).

Eleven isolations were identified as *Burkholderia* sp., 6 rhizospheric isolations (SR22- SR27) and 5 endophytic ones, 3 of which were isolated from samples of R (R28- R30) and 2 samples of FM MF (MF31-MF32) (Table 4). The isolations presented macroscopic characteristics such as small to medium, moist, whitish cultures with yellow centers (Galvis and Carrillo, 2015). Biochemical tests gave positive results, typical of catalase, oxidase, arabinose and sucrose. Six isolations were negative to melibiose and 2 were weak, typical of *B. glumae* and *B. cepacea*, respectively (Garrity *et al.*, 2005). Five isolations of *Gluconacetobacter* sp., three rhizospheric (SR33- SR35) and two endophytic, were also taken from R samples (R36 y R37) (Table 4). The isolations presented round cultures with smooth surfaces, convex or flat-convex elevations, orange in color and translucent or yellow edge, which matched the genus (Mehnaz *et al.*, 2006). These isolations displayed positive results in the tests with catalase, oxidase and

concordó con el género (Mehnaz *et al.*, 2006). Estos aislados mostraron resultados positivos con la prueba catalasa, oxidasa y sacarosa y negativos a glicina (Madhaiyana *et al.*, 2004).

No hubo diferencias significativas entre las poblaciones de *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp., sobre medios selectivos a partir de muestras de SR y R, pero sí respecto a muestras de MF. Esto es probable que se deba a la ventaja competitiva de las bacterias rizosféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes es mayor al interior de las plantas y menor el número de microorganismos endófitos (James, 2000).

Los oligonucleótidos diseñados en este experimento y la estandarización de la PCR mostraron especificidad para la identificación de *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* y *A. brasilense*, y se usaron cepas testigo ATCC (Figura 1). En el análisis molecular por PCR de los 14 aislados caracterizados fenotípicamente y bioquímicamente como *Azotobacter* sp., 5 se identificaron como *A. chroococcum* (SR5, SR7, SR9, SR11 y SR14), 2 como *A. vinelandii* (SR10 y SR12) y 2 como *A. nigricans* (SR3 y SR8) (Figura 2A, 2B y 2C). De los 7 aislados caracterizados como *Azospirillum* sp., todos, excepto el SR21, se identificaron por PCR como *A. brasilense* (Figura 2D).

La identificación de los 11 aislamientos de *Burkholderia* sp., se comprobó con oligonucleótidos específicos y características fenotípicas. Los aislamientos SR22, SR24, SR25, R28, R30 y MF32 se identificaron como *B. glumae* (Figura 2E) y los de *Gluconacetobacter* sp. descritos fenotípicamente y bioquímicamente, se identificaron por PCR como *G. azotocaptans* o *G. johannae* (Figura 2F).

Las pruebas fenotípicas utilizadas en la identificación de microorganismos pueden presentar discordancia entre las características del aislamiento en estudio y las correspondientes de la especie. La identificación se considera probable pero no definitiva. Para resolver estos problemas se propusieron métodos genotípicos de identificación bacteriana como el uso de una amplia variedad de genes utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en la determinación de géneros y especies bacterianas; el análisis del ARNr 16S el marcador inicial, y en numerosas situaciones, suficiente para realizar una identificación específica (Bou *et al.*, 2011). De acuerdo con lo anterior, en este estudio se utilizó el ARNr 16S para el diseño de oligonucleótidos en

sucrose and negative to glycine (Madhaiyana *et al.*, 2004).

No significant differences were reported between the *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. populations regarding selective media from RS and R samples, although there were regarding FM samples. This is probably due to the competitive advantages of rhizospheric bacteria, since the availability of nutrients is greater inside the plant, where the number of endophytic microorganisms is also lower (James, 2000).

The oligonucleotides designed in this experiment and the standardization of PCR displayed specificity for the identification of *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* and *A. brasilense*, and ATCC control strains were used (Figure 1). In the molecular analysis with PCR of the 14 isolations characterized phenotypically and biochemically as *Azotobacter* sp., 5 were identified as *A. chroococcum* (SR5, SR7, SR9, SR11 and SR14), 2 as *A. vinelandii* (SR10 and SR12) and 2 as *A. nigricans* (SR3 and SR8) (Figure 2A, 2B and 2C). Out of the 7 isolations characterized as *Azospirillum* sp., all but SR21 were identified with PCR as *A. brasilense* (Figure 2D).

The identification of the 11 *Burkholderia* sp. isolations was verified with specific oligonucleotides and phenotypical characteristics. Isolations SR22, SR24, SR25, R28, R30 and MF32 were identified as *B. glumae* (Figure 2E) and the *Gluconacetobacter* sp. isolations described phenotypically and biochemically were identified with PCR as *G. azotocaptans* or *G. johannae* (Figure 2F).

The phenotypical tests used to identify microorganisms can present discrepancies between the characteristics of the isolation under study and those of the species. Identification is considered probable but not definitive. In order to solve these problems, genotypical methods were proposed for the identification of bacteria, such as the use of a wide variety of genes utilized as molecular target in taxonomic or phylogenetic studies when determining bacterial genera and species; the analysis of rRNA 16S the initial marker, and in numerous situations, enough for a specific identification (Bou *et al.*, 2011). According to this, this study used rRNA 16S to design oligonucleotides in determining *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* and *A. brasilense*, amplifications with the expected size are produced (verification by PCR and *in silico*

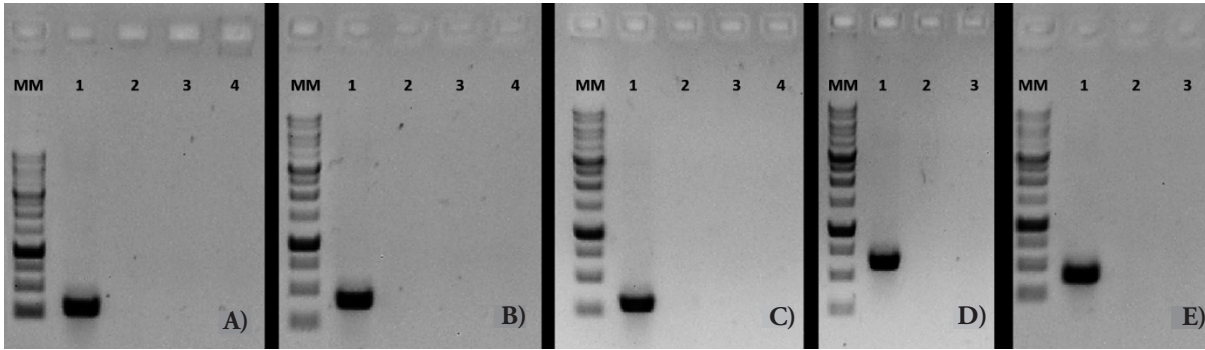


Figura 1. Comprobación de la especificidad de los oligonucleótidos diseñados en cepas de referencia ATCC. A) *A. chroococcum*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. chroococcum* ATCC® 9043™, producto esperado de 308 pb.; línea 2: *A. nigricans* ATCC® 35009™; línea 3: *A. vinelandii* ATCC® 478™; línea 4: control negativo. B) *A. nigricans*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. nigricans* ATCC® 35009™, producto esperado de 428 pb.; línea 2: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; línea 3: *A. vinelandii* ATCC® 478™; línea 4: control negativo. C) *A. vinelandii*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. vinelandii* ATCC® 478™, producto esperado de 230 pb.; línea 2: *A. nigricans* ATCC® 35009™; línea 3: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; línea 4: control negativo. D) *A. amazonense*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. brasilense* ATCC® 29145™, producto esperado de 631 pb; línea 2: *A. amazonense* ATCC® 35119™; línea 3: control negativo. E) *A. brasilense*. Línea MM: Marcador de pesos molecular 1Kb DNA Ladder RTU; línea 1: *A. amazonense* ATCC® 35119™, producto esperado de 448 pb; línea 2: *A. brasilense* ATCC® 29145™; línea 3: control negativo.

Figure 1. Verification of the specificity of the oligonucleotides designed in ATCC reference strains. A) *A. chroococcum*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. chroococcum* ATCC® 9043™, expected 308 pb. product; line 2: *A. nigricans* ATCC® 35009™; line 3: *A. vinelandii* ATCC® 478™; line 4: negative control. B) *A. nigricans*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. nigricans* ATCC® 35009™, expected 428 pb. product; line 2: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; line 3: *A. vinelandii* ATCC® 478™; line 4: negative control. C) *A. vinelandii*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. vinelandii* ATCC® 478™, expected 230 pb. product; line 2: *A. nigricans* ATCC® 35009™; line 3: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; line 4: negative control. D) *A. amazonense*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. brasilense* ATCC® 29145™, expected 631 pb product; line 2: *A. amazonense* ATCC® 35119™; line 3: negative control. E) *A. brasilense*. Line MM: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU; line 1: *A. amazonense* ATCC® 35119™, expected 448 pb product; line 2: *A. brasilense* ATCC® 29145™; line 3: negative control.

la determinación de *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. amazonense* y *A. brasilense*, se generan amplificaciones con el tamaño esperado (verificación por PCR y validación *in silico*) y se logra una identificación específica, empleando testigos positivos y negativos certificados.

Los microorganismos diazotróficos asociados con el cultivo del tomate en la región de estudio parece que no se habían documentado. En este estudio los géneros de diazotróficas rizosféricas predominantes en SR fueron *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Burkholderia*. Las bacterias endófitas características en las muestras R y MF fueron de los géneros *Burkholderia* y *Gluconacetobacter*. Alfonso *et al.* (2005), en un estudio en Cuba con 26 °C, identificaron los géneros

validation) and a specific identification is achieved, using certified positive and negative controls.

Diazotrophic microorganisms related to the tomato crop in the area under study seem not to have been documented. In this study, the genera of rhizospheric diazotrophes predominant in RS were *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Burkholderia*. Characteristic endophytic bacteria in the R and FM samples belonged to the genera *Burkholderia* and *Gluconacetobacter*. Alfonso *et al.* (2005), in a study carried out in Cuba with 26 °C, identified the genera of *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* and *Streptomyces*; the tomato rhizosphere predominated, and *Azospirillum* was the dominant genus (Alfonso *et al.*, 2005). The population density

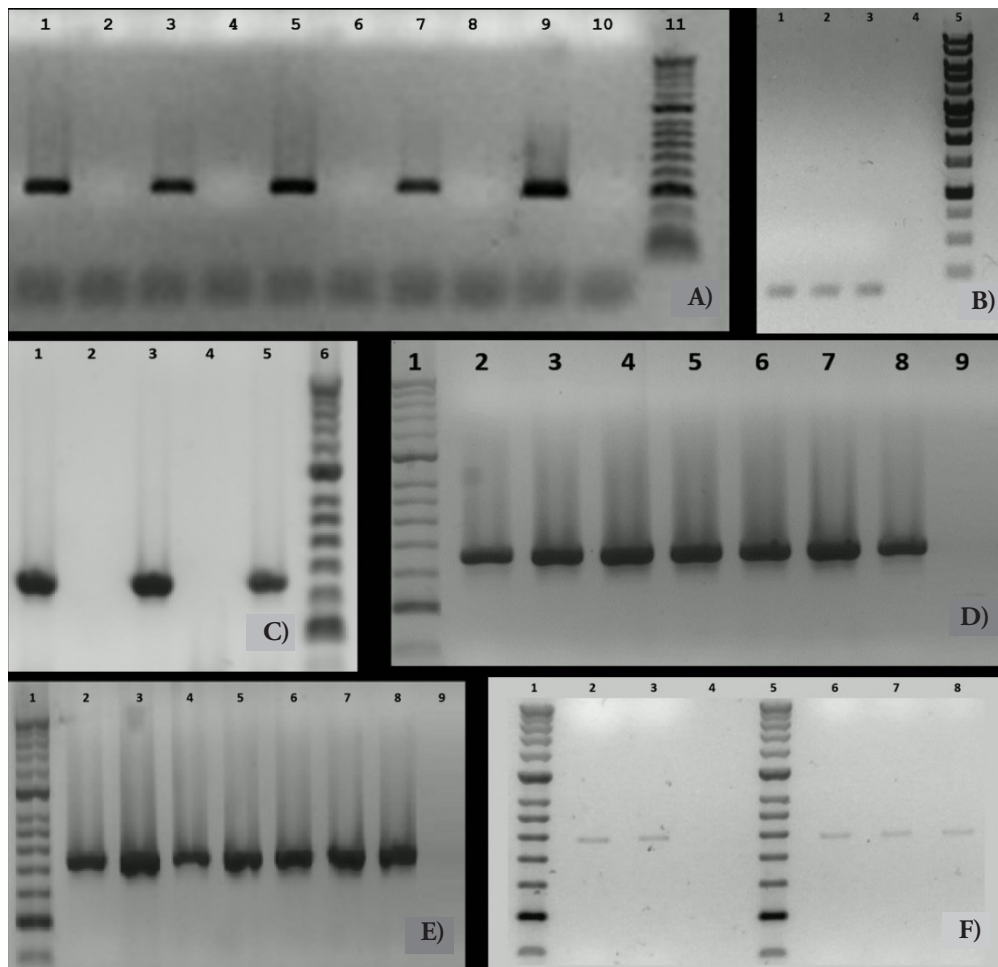


Figura 2. Identificación por PCR de bacterias diazotróficas. a. *A. chroococcum*. Líneas 1 a 8: aislados SR5, SR6, SR7, SR8, SR9, SR10, SR11 y SR12; línea 9: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; línea 10: control negativo; línea 11: *HyperLadder*™ 50bp. Producto esperado de 308 pb. b. *A. vinelandii*. Líneas 1 y 2: aislados SR10 y SR12; línea 3: *Azotobacter vinelandii* ATCC® 478™; línea 4: control negativo; línea 5: 1Kb *DNA Ladder RTU*. Producto esperado de 230 pb. c. *A. nigricans*. Líneas 1 a 3: aislados SR3, SR5 y SR8; línea 4: control negativo; línea 5: *A. nigricans* ATCC® 35009™; línea 6: *HyperLadder*™ 50bp. Producto esperado de 230 pb. d. *A. brasilense*. Línea 1: *HyperLadder*™ 50bp; líneas 2 a 7: aislados SR15 a SR20; línea 8: *Azospirillum brasilense* ATCC® 29145™; línea 9: control negativo. Producto esperado de 448 pb. e. *B. glumae*. Línea 1: *HyperLadder*™ 50bp; líneas 2 a 7: aislados SR22, SR24, SR25, R28, R30 y MF32; línea 8: *Burkholderia glumae* ATCC® 33617™; línea 9: control negativo. Producto esperado de 529 pb. f. *G. azotocaptans*/*G. johannae*. Líneas 1 y 5: *HyperLadder*™ 50bp; líneas 2, 6, 7 y 8: aislados SR33, SR35, R36 y R37; línea 3: *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC®700988™; línea 4: control negativo. Producto esperado de 467-469 pb.

Figure 2. Identification by PCR of diazotrophic bacteria. A) *A. chroococcum*. Lines 1 to 8: isolations SR5, SR6, SR7, SR8, SR9, SR10, SR11 and SR12; line 9: *A. chroococcum* ATCC® 9043™; line 10: negative control; line 11: *HyperLadder*™ 50bp. Expected 308 pb product. B) *A. vinelandii*. Lines 1 and 2: isolations SR10 and SR12; line 3: *Azotobacter vinelandii* ATCC® 478™; line 4: negative control; line 5: 1Kb *DNA Ladder RTU*. Expected 230 pb product. C) *A. nigricans*. Lines 1 to 3: isolations SR3, SR5 and SR8; line 4: negative control; line 5: *A. nigricans* ATCC® 35009™; line 6: *HyperLadder*™ 50bp. Expected 230 pb product. D) *A. brasilense*. Line 1: *HyperLadder*™ 50bp; lines 2 to 7: isolations SR15 to SR20; line 8: *Azospirillum brasilense* ATCC® 29145™; line 9: negative control. Expected 448 pb product. E) *B. glumae*. Line 1: *HyperLadder*™ 50bp; lines 2 to 7: isolations SR22, SR24, SR25, R28, R30 and MF32; line 8: *Burkholderia glumae* ATCC® 33617™; line 9: negative control. Expected 529 pb product. F) *G. azotocaptans*/*G. johannae*. Lines 1 and 5: *HyperLadder*™ 50bp; lines 2, 6, 7 and 8: isolations SR33, SR35, R36 and R37; line 3: *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC®700988™; line 4: negative control. Expected 467-469 pb. product.

Pseudomonas, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, dominó la rizósfera del tomate, y *Azospirillum* fue el género dominante (Alfonso *et al.*, 2005). La densidad poblacional de bacterias endófitas es altamente variable y depende de la bacteria y la planta hospedante, además del estado de desarrollo de la planta, la densidad del inóculo y las condiciones ambientales. La mayor densidad poblacional de bacterias endófitas nativas o introducidas, se observan de manera normal en la raíz y en la parte inferior del tallo; se presenta una disminución gradual del tallo hasta la hoja (Cordero *et al.*, 2010).

Azospirillum brasilense en tomate causa un aumento significativo en el peso de la raíz, la longitud de los pelos radicales y el brote, debido probablemente a una secreción mayor de ácido indol-3-acético (IAA) y etileno (Ribaudó *et al.*, 2006). *Azospirillum vinelandii* también induce aumento de la biomasa radical del tomate mediante la solubilización de fósforo y adquisición de microelementos, que favorecen la floración y su desarrollo en general (Sashidhar y Podile, 2009). En invernadero *Azotobacter* sp. tiene influencia positiva en el desarrollo vegetativo de tomate, disminuye el número de días a la floración y aumento la altura, volumen radical y peso de la biomasa seca total (Escobar *et al.*, 2011). La presencia de *Burkholderia* en la rizósfera y el rizoplano en el cultivo de tomate se relaciona con un desarrollo mejor del sistema radicular y foliar de la planta, debido probablemente a la producción de sideróforos y la actividad antagonica contra patógenos (Caballero *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

La diferencia en NMP entre fincas y su relación con las características físico-químicos del suelo no es significativa. Los suelos con textura gruesa favorecen el crecimiento de la microbiota en la rizósfera. La diversidad mayor de especies en muestras de SR, correspondió a las bacterias diazotróficas rizosféricas *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. brasilense*, *B. glumae* y *G. azotocaptans*/*G. johannae*, las bacterias diazotróficas endofíticas, en muestras R, y *B. glumae*, *G. azotocaptans*/*G. johannae*. en muestras de MF, *B. glumae*.

of endophytic bacteria is highly variable and depends on the bacteria and host plant, as well as the state of development of the plant, the density of the inoculant and environmental conditions. The highest population density of endophytic bacteria, whether native or introduced, appear normally in the root and the lower part of the shoot; a gradual reduction is observed between the shoot and the leaf (Cordero *et al.*, 2010).

Azospirillum brasilense in tomato causes a significant increase in the weight of the root, the length of root hairs and sprouting, probably due to a greater secretion of indol-3-acetic acid (IAA) and ethylene (Ribaudó *et al.*, 2006). *Azospirillum vinelandii* also leads to an increase in the radical biomass in tomato via the solubilization of phosphorous and acquisition of microelements that favor flowering and its general development (Sashidhar and Podile, 2009). In greenhouses, *Azotobacter* sp. has a positive influence on the vegetative development of tomato, it reduces the number of days until flowering and increases total height, radical volume and total dry biomass weight (Escobar *et al.*, 2011). The presence of *Burkholderia* in the rhizosphere and the rhizoplane in the tomato plantation is related to a better development of the radical and foliar systems of the plant, due mainly to the production of siderophores and antagonistic activity against pathogens (Caballero *et al.*, 2007).

CONCLUSIONS

The difference in MPN between farms and their relation with the physical and chemical characteristics of the soil is not significant. Soils with a coarse texture favor the growth of microbiota in the rhizosphere. The greatest diversity of species in RS samples was found in the diazotrophic rhizospheric bacteria *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *A. brasilense*, *B. glumae* and *G. azotocaptans*/*G. johannae*, diazotrophic endophytic bacteria, in samples of R, and *B. glumae*, *G. azotocaptans*/*G. johannae*. In FM samples, *B. glumae*.

—End of the English version—

---*---

LITERATURA CITADA

- Alfonso, E. T., A. Leyva, y A. Hernández. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Rev. Colomb. Biotecnol. 7: 47-54.
- Barraza, Z., A. Bravo, y A. Pérez. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* productora de metabolito con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae*. Rev. Colomb. Cienc. Anim. 9(S): 114-121.
- Bou, G., A. Fernández, C. García, J. Sáez, y S. Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm. Infec. Microbiol. Clín. 29: 601-608.
- Caballero, J., J. Onofre, P. Estrada, y L. Martínez-Aguilar, L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5308-5319.
- Cárdenas, D. M., M. Garrido, R. Bonilla, y V. L. Baldani. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. Pastos Forrajes 33: 1-11.
- Castro S., Y. Herschokovits, Y. Okon, y E. Jurkevich. 2007. Efectos de la inoculación en planta, crecimiento - promoción rizobacterias como microorganismos residentes de la rizosfera. Microbiol. FEMS 276: 311-329.
- Cordero, A., J. Sierra, y J. Cuello. 2010. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriobloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre. Colombia. Acta Biol. Colomb. 15: 219-228.
- DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). 2016. Encuesta nacional agropecuaria ENA 2015. Boletín técnico. Bogotá, Colombia. 25 p.
- DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). 2014. Insumos y factores asociados a la producción agrícola. Boletín mensual. Bogotá, Colombia. 72 p.
- Döbereiner, J., V. L. Baldani, y J. I. Baldani. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília (EMBRAPA-SPI). 60 p.
- Doncel, A., L. Chamorro, y A. Pérez A. 2016. Actividad in vitro de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas con pasto colosuana en el municipio de Corozal, Sucre. Rev. Colomb. Cienc. Anim. 8: 351-360.
- Escobar, C., Y. Horna, C. Carreño, y G. Mendoza. 2011. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. Sci. Agropec. 2: 39-49.
- Flores, A. C., J. C. Contreras, Reyes M. H., y Rodríguez H. 2012. Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. Rev. Cient. 4: 32-41.
- Fuentes, L. E., R. Bustillos, A. Tapia, T. Jiménez, E. T. Wang, E. Martínez, and J. Caballero. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. Int. J. Syst. Evol. Micr. 51: 1305-1314.
- Galvis, F., y M. Carrillo. 2015. Identificación y caracterización molecular de aislados de *Burkholderia glumae*. Agente causante del añublo bacterial en el cultivo de arroz. Inf. Tecnol. 26: 33-40.
- Garrido, M., D. Cárdenas, R. Bonilla, y V. Baldani, 2010. Efecto de los factores edafoclimáticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotróficas. Pastos Forrajes 33: 1-11.
- Garrity, G., D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (eds). 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Springer, New York. 1256 p.
- Gijon, A., D. Téliz, D. Mejía, R. De La Torre, E. Cardenas, R. C. De León, and A. Mora. 2011. Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. J. Phytopathol. 159: 377-381.
- Guzmán, A., M. Obando, D. Rivera, y R. Bonilla. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). Rev. Colomb. Biotecnol. 14: 182-190.
- Karki, H. S., B. Shrestha, J. W. Han, D. E. Groth, I. K. Barphagha, M. C. Rush, and J. H. Ham. 2012. Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. PLoS One 7: 1-12.
- Khalid A., M. Arshad, and Z. A. Zahir. 2006. Phytohormones: microbial production and applications. In: Uphoff N. et al. (eds). Biological Approaches to Sustainable Soil Systems. Taylor & Francis, Boca Raton, Flo. 220 p.
- James, E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res. 65: 197-209.
- Lacasta, C., R. Meco, y N. Maire. 2005. Evolución de las producciones y de los parámetros químicos y bioquímicos del suelo, en un agrosistema de cereales sometido a diferentes manejos de suelo durante 21 años. Congreso Internacional sobre Agricultura de Conservación. 436p.
- Madhaiyan, M., V. Saravanan, D. Jovi, H. Lee, R. Thenmozhi, K. Hari, and T. Sa, T. 2004. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. Microbiol. Res. 159: 233-243.
- Mantilla, A. J., G. Cardona, C. P. Peña, U. Murcia, M. Rodríguez, y M. M. Zambrano. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. Rev. Biol. Trop. 57: 915-927.
- Martyniuk, S., and M. Martyniuk. 2002. Occurrence of *Azotobacter* spp. in some polish soils. Pol. J Environ. Stud. 12: 371-374.
- Mehnaz, S., B. Weselowski, and G. Lazarovits. 2006. Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. Syst. App. Microbiol. 29: 496-501. Int. J. Syst. Evol. Micr.
- Moreno, L. Y., y F. Galvis. 2013. Potencial biofertilizante de bacterias diazotólicas aisladas de muestras de suelo rizosférico. Pastos Forrajes 36: 33-37.
- Obando, D. M., L. B. Burgos, D. Rivera, M. Rubiano, V. Divan, y R. Bonilla. 2010. Caracterización de bacterias diazotólicas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). Acta Biol. Colomb. 15: 107-120.
- Pérez, J. R., J. A. Rodríguez, B. M. Amador, M. F. Herrera, F. G. Izquierdo, R. A. Murillo, y G. E. Goya. 2015. Humatos de vermicompost y su efecto en el crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Biotecnia 17: 9-12.

- Remans, R. 2007. Searching for nitrogen under phosphorus deficiency: the interplay between common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Rhizobium and plant growth-promoting rhizobacteria. PhD thesis, KULeuven. Belgium. 172 p.
- Ribaudo, C. M., E. M. Krumpholz, F. D. Cassán, R. Bottini, M. L. Cantore, y J. A. Curá. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. J. Plant Growth Reg. 25: 175-185.
- Sashidhar, B., y A. R. Podile. 2009. Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. Microbial Biotechnol. 2: 521-529.
- Tejera, J., C. Llunch, M. Martínez, y J. González. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strain from the sugarcane rhizosphere. Plant Soil 7: 223-232.
- Vallejo, F., y E. Estrada. 2004. Producción de Hortalizas en Clima Cálido. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 346 p.

***In vitro* PROPAGATION, ACCLIMATIZATION AND IDENTIFICATION OF A WILD SPECIES OF *Physalis* WITH ALIMENTARY UTILITY IN PUEBLA, MÉXICO**

PROPAGACIÓN *in vitro*, ACLIMATACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UNA ESPECIE SILVESTRE DEL GÉNERO *Physalis* CON UTILIDAD ALIMENTARIA, EN PUEBLA, MÉXICO

Elsa Ventura-Zapata¹, Jeanette Meléndez-Mendoza², Mirna María Sánchez-Rivera¹, Jonathan Sánchez-Muñoz¹,
Nadia Primavera Tapia-Barrera^{1*}, Minerva Méndez-Tinajero¹

¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Colonia San Isidro, Apartado Postal 24. 62731, Yautepec, Morelos, México. (n_primavera@yahoo.com). ²Instituto Tecnológico de Zacatepec. Tecnológico 27, Plan de Ayala. 62780, Zacatepec de Hidalgo, Morelos.

ABSTRACT

Plants of the genus *Physalis* are recognized for their nutritional and medicinal properties in Mexico, but only 24% of the 70 species are used. In Puebla, Mexico, a species of this genus that grows wild, and which is not yet identified, produces fruits that are consumed by the local population. The objective of this research was to identify this new species, and to establish a method of propagation and cultivation, after proving its alimentary utility. A taxonomic study, and *in vitro* culture and hydroponics techniques were applied to identify, propagate and cultivate this species. *In vitro* germination was carried out with seeds of ripe fruits in MS medium at 50%. The germination percentage was 79% at 12 d of cultivation. Nodes from seedlings growing *in vitro* were used to induce multiple sprouting in MS medium supplemented with BAP (6-benzylamine purine) in concentrations of 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹ and a kin factor (Kinetin) with IBA (indole butyric acid) of 0.2-2.0 mg L⁻¹. Hypocotyls and cotyledons were used to induce organogenesis with NAA (naphthalene acetic acid) and BAP (0.5-1.0 mg L⁻¹) added to MS medium. With 1.5 mg L⁻¹ of BAP and 0.5 mg L⁻¹ of IBA 100% multiple sprouting was obtained, and shoots and roots with 1 mg L⁻¹ of BAP and 1 mg L⁻¹ of NAA. Root formation was induced by IAA (indole acetic acid), NAA and IBA of 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹. The best response in rooting was with 0.5 mg L⁻¹ of IBA. The seedlings were acclimatized for 49 d; the percentage of survival was 100%. The taxonomic study identified this plant as *Physalis aff rydbergii* Fernald. Through micropropagation it is possible to propagate species of alimentary and medicinal interest in less time than with conventional methods.

RESUMEN

Las plantas del género *Physalis* son reconocidas en México por sus propiedades nutricionales y medicinales, pero solo se utilizan 24% de las 70 especies existentes. En Puebla, México, una especie de este género que crece de forma silvestre, y la cual no se ha identificado, produce frutos que son consumidos por la población local. El objetivo de la investigación fue identificar a esta nueva especie y establecer un método de propagación y cultivo, después de comprobar su utilidad alimentaria. Un estudio taxonómico y técnicas de cultivo *in vitro* e hidropónicas se aplicaron para identificar, propagar y cultivar esta especie. Una germinación *in vitro* de las semillas de frutos maduros se realizó en MS al 50%. El porcentaje de germinación fue de 79% a 12 d de cultivo. Nódulos de plántulas que se desarrollaron *in vitro* se utilizaron para inducir brotes múltiples en un medio MS suplementado con BAP (6-bencilaminopurina) en concentraciones de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹ y un factor kin (Kinetina) con IBA (ácido indol butírico) de 0.2-2.0 mg L⁻¹. Hipocótilos y cotiledones se usaron para inducir organogénesis con NAA (ácido naftaleno acético) y BAP (0.5-1.0 mg L⁻¹) agregados al medio MS. Con 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de IBA, se obtuvo una brotación múltiple de 100%, así como tallos y raíces con 1 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de NAA. La formación de las raíces se indujo con IAA (ácido indol acético), NAA y IBA de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹. La mejor respuesta en enraizamiento fue con 0.5 mg L⁻¹ de IBA. Las plántulas se aclimataron durante 49 d; el porcentaje de sobrevivencia fue de 100%. El estudio taxonómico identificó a esta planta como *Physalis aff rydbergii* Fernald. Por medio de micropropagación es posible propagar especies de interés alimentario y medicinal en menor tiempo que con los métodos convencionales.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: November, 2019. Approved: August, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 859-872. 2020.

Palabras clave: *Physalis*, cultivo *in vitro*, organogénesis, aclimatación.

Key words: *Physalis*, *in vitro* culture, organogenesis, acclimatization.

INTRODUCTION

Mexican rural communities complement their diet with collected edible plants from the forest, and secondary vegetation that thrives their territory. Ethnobotanical studies carried out in different regions of the country report more than 1500 species of wild edible plants that provide between 8 and 17% of the annual diet of peasant families (Lascurain *et al.*, 2010). All these species are considered genetic resources to face the challenges of national food security; their conservation is important for Mexico (Sarukhán *et al.*, 2017).

Species of the genus *Physalis* are distributed throughout the country (Martínez *et al.*, 2017). These species are edible for humans and animals, but are also medicinal, industrial and ornamental, and even ritual in some communities. This is based on the information of husk tomato samples consulted in 15 Mexican herbaria, including the Universidad Autónoma de México, National Herbarium at Instituto Nacional de Biología (MEXU), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Herbarium (ENCB), Colegio de Posgraduados Herbarium Hortorio (CHAPA), “Luz María Villarreal de Puga” Herbarium (IBUG), “Dr. Jerzy Rzedowski” Herbarium of the City of Querétaro (QMEX) and Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Herbarium (ANSM).

The above mentioned uses are associated with 15 species, which represent 24% of the 70 recognized in the Mexican territory, from which the root, stem, leaves, fruit and receptacle are used (Santiaguillo and Blas, 2009). *Physalis* is an important genus for people since it includes species with edible fruits (López-Sandoval *et al.*, 2018). Fruits from different wild *Physalis* species are harvested for self-consumption or for sale in Mexico (Valdivia-Mares *et al.*, 2016). Maldonado *et al.* (2011) highlighted this genus as a source of witaesteroids, compounds of terpene origin, with various bioactivities, and preventive properties against cancer. *Physalis peruviana* produces withanolide E and 4 β -hydroxywithanolide E, which are applied as anticancer agents, and also have antioxidant activity (Xia *et al.*, 2016; Barrientos *et al.*, 2019).

INTRODUCCIÓN

Las comunidades rurales mexicanas complementan su dieta con plantas comestibles recolectadas del bosque y vegetación secundaria que crece en su territorio. Estudios etnobotánicos realizados en diferentes regiones del país reportan más de 1500 especies de plantas comestibles silvestres que brindan entre 8 y 17% de la dieta anual de familias campesinas (Lascurain *et al.*, 2010). Todas estas especies se consideran recursos genéticos para enfrentar los retos de la seguridad alimentaria nacional; su conservación es importante para México (Sarukhán *et al.*, 2017).

En todo el país hay una distribución de especies del género *Physalis* (Martínez *et al.*, 2017). Estas especies son comestibles para humanos y animales, pero también son medicinales, industriales y ornamentales, e incluso ceremoniales en algunas comunidades. Esto se basa en la información de muestras de tomate de cáscara consultada en 15 herbarios mexicanos, incluyendo la Universidad Autónoma de México, Herbario Nacional del Instituto Nacional de Biología (MEXU), Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Herbario Hortorio del Colegio de Posgraduados (CHAPA), Herbario “Luz María Villarreal de Puga” (IBUG), Herbario “Dr. Jerzy Rzedowski” de la Ciudad de Querétaro (QMEX) y el Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (ANSM).

Los usos mencionados anteriormente se relacionan con 15 especies, que representan 24% de las 70 reconocidas en territorio mexicano, de las cuales se usan la raíz, el tallo, las hojas, el fruto y el cáliz (Santiaguillo y Blas, 2009). *Physalis* es un género importante para la gente, ya que incluye a especies con frutos comestibles (López-Sandoval *et al.*, 2018). Frutos de especies diferentes de *Physalis* silvestres se cosechan para el consumo o la venta en México (Valdivia-Mares *et al.*, 2016). Maldonado *et al.* (2011) destacaron a este género como una fuente de witaesteroides, compuestos originados del terpeno, con bioactividades variadas y propiedades preventivas contra el cáncer. *Physalis peruviana* produce witanólido E y 4 β -hidroxiwitanólido E, que se aplican como agentes anticancerígenos y también tienen actividad antioxidante (Xia *et al.*, 2016; Barrientos *et al.*, 2019).

Algunas especies del género *Physalis* son parte de la cultura alimenticia de América Central y del

Species of the genus *Physalis* are part of the food culture in Central and North America, and it is important to identify their state of conservation, and to perform research about genetic diversity and geographical distribution in order to promote their use and conservation (Santiaguillo and Blas, 2009; Sarukhán, *et al.*, 2017). In the Northeast of the state of Puebla, Mexico, a plant of this *Physalis* genus grows wild, its fruits are consumed by local people and it is not identified. Thus, the objective of this research was to identify the species of wild husk tomato from the genus *Physalis*, and to establish a method for propagation and cultivation.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Ripe fruits of *Physalis* were collected during September 2013 at San José Alchichica, a town of Tepeyahualco Municipality, in Puebla.

In vitro germination

The seeds were separated from the fruit, washed with distilled water and dried at room temperature for one week. One hundred seeds were placed into 500 mL beaker with 2% extran solution for 5 min. The seeds were sprayed three times with distilled water, submerged with 7% ethanol for 30 s, and washed with distilled water. Seeds were then placed in *Benomilo* (commercial grade) solution for 20 min, under aseptic conditions using a laminar flow hood (Alder-Mexico) and washed three times with sterile distilled water; then seeds were placed in a 0.6% sodium hypochlorite solution for 10 and 15 min and rinsed three times with sterile distilled water. Seeds were submerged in *Agrimicin* (commercial grade) solution during 5 min, and rinsed three times with distilled water. In glass bottles with 50% Murashige and Skoog (MS) culture medium (Murashige and Skoog, 1962), seeds were placed in sterile conditions and after covering with the lids, they remained 12 d in darkness at 25 ± 1 °C. Afterwards, they were subjected to photoperiod for 8 h in darkness and 16 h in light at 25 ± 1 °C. The total amount of pathogen-free seeds, plus germinated seeds were counted in order to obtain the percentage of both contamination and germination.

Inducing multiple sprouts

Shoot sprouting was induced by placing nodal sections in 36 treatments with plant growth regulators: combination of IBA

Norte, y es importante identificar su estado de conservación, así como investigar su diversidad genética y distribución geográfica para promover su uso y conservación (Santiaguillo y Blas, 2009; Sarukhán, *et al.*, 2017). Al noreste del estado de Puebla, México, una planta del género *Physalis* crece de forma silvestre y, aunque la gente local consume sus frutos, la planta no se ha identificado. Así, el objetivo de esta investigación fue identificar la especie de tomatillo del género *Physalis* y establecer un método para su propagación y cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Frutos maduros de *Physalis* se recolectaron en septiembre de 2013 en San José Alchichica, en el municipio de Tepeyahualco, Puebla.

Germinación *in vitro*

Las semillas se separaron de los frutos, se lavaron con agua destilada y secaron a temperatura ambiente durante una semana. Cien semillas se colocaron en un matraz de 500 mL con Extran al 2% por 5 min. Luego, las semillas se rociaron tres veces con agua destilada, sumergidas en etanol al 7% por 30 s y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se colocaron las semillas en una solución de *Benomilo* (grado comercial) por 20 min bajo condiciones asépticas usando una cabina de flujo laminar (Alder-México) y se lavaron tres veces con agua destilada. Luego se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% por 10 y 15 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se sumergieron en *Agrimicin* (grado comercial) durante 5 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada. En frascos de vidrio con un medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) al 50% (Murashige y Skoog, 1962), se colocaron semillas en condiciones estériles y después de taponarlas, permanecieron por 12 d en la oscuridad a 25 ± 1 °C. Después fueron expuestas a un fotoperiodo de 8 h en la oscuridad y 16 h en la luz a 25 ± 1 °C. La cantidad total de semillas libres de patógenos se contó, más las semillas germinadas, para obtener el porcentaje tanto de contaminación como de germinación.

Inducción de brotación múltiple

El surgimiento de brotes se indujo al colocar secciones nodales en 36 tratamientos con reguladores del crecimiento vegetal: una combinación de IBA con Kin (0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg

with Kin (0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹), and BAP (0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹). For each treatment 20 explants (nodes) were placed. After 12 and 25 d of cultivation, they were counted for total sprouts in order to calculate the percentage of response and average number of shoots per explant.

Induction by organogenesis

Induction of organogenesis was carried out with a factorial arrangement of ANA (0.5 and 1.0 mg L⁻¹), with BAP (0.5 and 1.0 mg L⁻¹). Six explants from cotyledons and six from hypocotyls were placed in each of the nine treatments. Shoots, calluses and roots generated by hypocotyls and cotyledons as explants, were evaluated as the response in each one of the treatments. The experiment lasted 34 d.

Root induction

To induce root formation ANA, IBA and AIA at 0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹ were evaluated. In each of the 12 treatments, 15 shoots between 1.2 and 2.0 cm high, were placed. After 25 d of culture, the percentage of explants that formed root and the average number of roots per explant were evaluated.

Acclimatization of the *in vitro* plants

The method was based on a hydroponic system with gradual decrease in relative humidity, as reported by Ventura *et al.* (2003). On 10 plastics containers (80 mL capacity), 20 mL of nutritive Steiner solution were placed, and in each container an *in vitro*-rooted plant was placed. The containers were covered with an aluminum cap and a transparent polyethylene bag (11 x 21 cm). Each week, the temperature and relative humidity were measured inside the container with a thermo-hygrometer which was introduced through an orifice made at 5 cm from top of the bag. To achieve acclimatization, every 3 d and during seven weeks, an orifice of around 0.8 mm of diameter was drilled in the polyethylene bag (ACME 857-Mexico); thus, the temperature was maintained at 25 ± 2 °C. Stomata conductance as mmol m² s⁻¹ was measurement with a leaf porometer (Decagon Devices Inc., Model SC-1, USA) by placing the underside from upper immature leaves and mature leaves of the plants on the sensor plate.

Taxonomy study

This plant species was identified at the National Herbarium (MEXU), Instituto Nacional de Biología, under the Universidad Autónoma de México. Two specimens, 40 cm long with flowers and fruits, were collected at San José Alchichica. Each specimen

L⁻¹), y BAP (0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹). Por cada tratamiento se colocaron 20 explantes (nódulos). Después de 12 y 25 d de cultivo, se contaron los brotes totales para calcular el porcentaje de respuesta y promedio de brotes por cada explante.

Inducción por organogénesis

La inducción de la organogénesis se llevó a cabo con un arreglo factorial de ANA (0.5 y 1.0 mg L⁻¹), con BAP (0.5 y 1.0 mg L⁻¹). Seis explantes de cotiledones y seis de hipocótilos se colocaron en cada uno de los nueve tratamientos. Tallos, callos y raíces generadas por hipocótilos y cotiledones como explantes, se evaluaron en respuesta a cada uno de los tratamientos. El experimento duró 34 d.

Inducción de raíz

Para inducir la formación de raíces, se evaluaron ANA, IBA y AIA a 0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹. En cada uno de los 12 tratamientos, se colocaron 15 tallos, de entre 1.2 y 2.0 cm de altura. Después de 25 d de cultivo se evaluaron el porcentaje de explantes que formaron raíces, así como el promedio de raíces por explante.

Aclimatación de las plantas *in vitro*

El método se basó en un sistema hidropónico con una reducción gradual en la humedad relativa, según lo reportado por Ventura *et al.* (2003). En 10 contenedores plásticos (capacidad de 80 mL), se colocaron 20 mL de solución nutritiva Steiner y en cada contenedor se colocó una planta enraizada *in vitro*. Los contenedores se cubrieron con una tapa de aluminio y una bolsa de polietileno transparente (11 x 21 cm). Cada semana se midieron la temperatura y la humedad relativa dentro del contenedor con un termohigrómetro, el cual se introdujo a través de una perforación realizada a 5 cm de la parte superior de la bolsa. Para lograr la aclimatación, cada 3 d durante siete semanas, se le perforaba un orificio con un diámetro de alrededor de 0.8 mm en la bolsa de polietileno (ACME 857-Mexico); de esta forma, la temperatura se mantuvo a 25 ± 2 °C. La conductancia estomática como mmol m² s⁻¹ se midió con un porómetro foliar (Decagon Devices Inc., Model SC-1, EE.UU.); se colocó el lado inferior de las hojas inmaduras superiores y de las hojas maduras de la planta en el sensor.

Estudio taxonómico

Esta especie vegetal se identificó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto Nacional de Biología, de la Universidad Autónoma de México. Dos especímenes, de 40 cm de largo con

was prepared and placed on a sheet of paper (45 x 30 cm). All the parts of plants were carefully extended and covered with a sheet of paper with equivalent dimensions. The sheets of paper were placed between two pieces of cardboard that were pressed with a wooden grid which had the same dimensions as the cardboard pieces. Then, after the cardboard sheets were tied together with cord, more pressure was applied. The specimens were stored in an herbarium for 48 h in order to identify them via the corresponding protocols.

Statistical analysis

Means in the three replicates, \pm standard deviation, were analyzed using a two-ways ANOVA, and the Mann-Whitney test to compare stomata conductance from upper and lower leaves during acclimatization of the *in vitro* plants.

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro germination

Pathogen-free seeds were obtained in 100% (Figure 1a) and germination ratio was 79% (Figure 1b). Disinfection method allowed 100% of pathogen-free seeds.

Induction of multiple sprouting

All explants treated with 0.5 mg L⁻¹ IBA presented multiple sprouting. In none of the KIN treatments was this percentage obtained, nor in its combination with IBA. And when five concentrations of BAP were used, 1.5 mg L⁻¹ was the only concentration that induced 100% sprouting (Table 1 and Table 2).

flores y frutos, fueron recolectados en San José Alchichica. Cada espécimen se preparó y se colocó sobre una hoja de papel (45 x 30 cm). Todas las partes de las plantas se extendieron con cuidado y se cubrieron con otra hoja de papel de iguales dimensiones. Las hojas de papel se colocaron entre dos piezas de cartón, las cuales se comprimieron con una rejilla de madera con las mismas medidas que los cartones. Después, las láminas de cartón se amarraron entre sí con cuerda y se aplicó más presión sobre ellas. Los especímenes se almacenaron en un herbario por 48 h para identificarlos con los protocolos correspondientes.

Análisis estadístico

Los promedios de las tres réplicas \pm desviación estándar se analizaron por medio de un ANDEVA de doble vía, y se usó la prueba Mann-Whitney para comparar la conductancia estomática de las hojas de las partes superior e inferior de la planta durante la aclimatación de las plantas *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación *in vitro*

Del total de las semillas obtenidas, 100% resultaron libres de patógenos (Figura 1a) y la tasa de germinación fue de 79% (Figura 1b). El método de desinfección permitió obtener el 100% de semillas libres de patógenos.

Inducción de brotación múltiple

Todos los explantes tratados con 0.5 mg L⁻¹ de IBA presentaron brotes múltiples. En ninguno de los tratamientos KIN se obtuvo este porcentaje, ni en

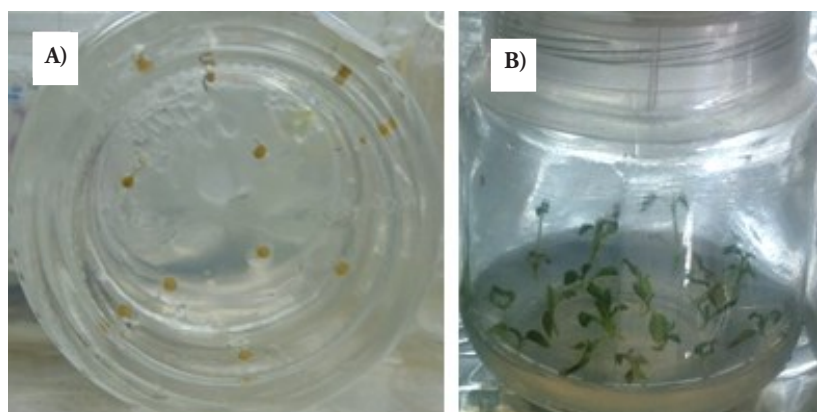


Figure 1. *In vitro* germination of *Physalis aff rydbergii* Fernald. A) seeds sown in culture medium after disinfection, B) seedlings from seed germination.

Figura 1. Germinación *in vitro* de *Physalis aff rydbergii* Fernald. A) semillas sembradas en medio de cultivo después de desinfección, B) plántulas de semillas germinadas.

Table 1. Effect of the combination of concentrations of indolbutyric acid and kinetin in the induction of multiple sprouting.**Cuadro 1. Efecto de la combinación de concentraciones de ácido indol butírico y kinetina en la inducción de brotes múltiples.**

IBA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)											
	0.0		0.2		0.5		1.0		1.5		2.0	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
0.0 ⁽¹⁾	90	1.0	75	1.06	90	1.00	60	1.00	85	1.20	60	1.08
0.2 ⁽²⁾	90	0.9	60	1.16	70	1.20	85	1.35	85	1.35	85	1.11
0.5 ⁽³⁾	100	1.1	90	1.11	65	1.07	85	1.17	55	1.09	50	1.00
1.0 ⁽⁴⁾	90	1.0	25	1.20	15	1.33	45	1.33	35	1.14	40	1.37
1.5 ⁽⁵⁾	90	1.0	40	1.12	5	1.00	15	1.00	70	1.07	55	1.00
2.0 ⁽⁶⁾	75	1.02	45	1.11	35	1.00	45	1.33	35	1.14	65	1.07

IBA indolbutyric acid, K kinetin, A response rate, B number of buds per explant, Number inside parentheses. ♦ IBA ácido indol butírico, K kinetina, A tasa de respuestas, B número de brotes por explante, Número entre paréntesis.

Table 2. Effect of benzyl amino purine in the induction of multiple sprouting.**Cuadro 2. Efecto de bencilaminopurina en la inducción de brotes múltiples.**

BAP (mg L ⁻¹)	Response (%)	Total buds	Average of buds / explant
0.0	95	27	1.4
0.2	60	14	1.1
0.5	90	24	1.3
1.0	90	28	1.6
1.5	100	26	1.3
2.0	60	12	1.0

BAP= Benzyl amino purine. ♦ BAP= Bencilaminopurina.

The control plants of the IBA and KIN experiment and of the BAP treatment had 90 and 95%, respectively, of multiple sprouting so that the propagation by nodes could be carried out without the addition of growth regulators. Regarding *in vitro* regeneration of the *Solanaceae* family, some of the best efficiency occurs when the medium is supplemented with cytokinins. In our research, the best response to induce shoots was with MS medium supplemented with 1.5 mg L⁻¹ de BAP and 0.5 mg L⁻¹ of IBA, as growth regulators. The average number of shoots per explant in all concentrations for *Physalis aff rydbergii* Fernald were too low.

These results are similar to those obtained by Chaves *et al.* (2005) in *P. peruviana* L, which showed 1.75 shoots by explant using a medium supplemented with 0.3 mg L⁻¹ BAP. Sheeba *et al.* (2015) and Otrshy *et al.* (2013) used nodes culture, and mixing 2.0 mg L⁻¹ BAP and 0.25 mg L⁻¹ IAA, as well as 4 mg L⁻¹ BAP, 1 mg L⁻¹ Kin and 0.5 mg L⁻¹

su combinación con IBA. Y cuando se usaron cinco concentraciones de BAP, solo la concentración de 1.5 mg L⁻¹ indujo una germinación de 100% (Cuadros 1 y 2).

Las plantas testigo del experimento IBA y KIN y del tratamiento BAP tuvieron 90 y 95%, respectivamente, de brotes múltiples, por lo que la propagación por nódulos podría llevarse a cabo sin aplicar reguladores de crecimiento. Respecto a la regeneración *in vitro* de especies de la familia *Solanaceae*, la eficiencia mejor ocurre cuando el medio se suplementa con citoquininas. En nuestra investigación, la respuesta mejor de inducción de brotes fue con el medio MS suplementado con 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de IBA como reguladores del crecimiento. El número promedio de brotes por explante en todas las concentraciones para *Physalis aff rydbergii* Fernald fue demasiado bajo.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Chaves *et al.* (2005) en *P. peruviana* L, que pre-

IBA, they obtained a rank of response of multiple sprouting from 80 to 100% for *P. minima* L. and *P. peruviana* L., respectively. However, a high response of sprouting in regulator-free medium was observed; which coincides with Rodríguez (2012) who used *Crasulaceae* plants.

Organogenesis induction

Explants in the control group (treatment A) showed no response due to absence of growth regulators. But explants from hypocotyls and cotyledons expressed organogenic response to NAA/BAP regulators (Table 3). Cotyledon explants showed an organogenesis response to shoots with concentrations of 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ of BAP and to roots with concentrations of 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ of ANA. In both cases, the highest concentration was which induced the greatest response. Callus formation from cotyledon and hypocotyl occurred mainly in treatments containing BAP, in combination with 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ and ANA. The treatment induced shoot formation with 0.5 mg L⁻¹ from both

sentó 1.75 brotes por explante usando un medio suplementado con 0.3 mg L⁻¹ BAP. Sheeba *et al.* (2015) y Otrosby *et al.* (2013) usaron un cultivo de nódulos con una mezcla de 2.0 mg L⁻¹ BAP con 0.25 mg L⁻¹ IAA, así como 4 mg L⁻¹ BAP, 1 mg L⁻¹ Kin y 0.5 mg L⁻¹ IBA, y obtuvieron un rango de respuesta de brotes múltiples de 80 a 100% para *P. minima* L. y *P. peruviana* L., respectivamente. Sin embargo, se observó una tasa alta de respuesta en brotación en un medio libre de reguladores; lo cual coincide con Rodríguez (2012), quien usó plantas de *Crasulaceae*.

Inducción de organogénesis

Los explantes en el grupo testigo (tratamiento A) no presentaron respuesta, debido a la ausencia de reguladores del crecimiento. Pero los explantes de hipocótilos y cotiledones expresaron respuesta organogénica a los reguladores NAA/BAP (Cuadro 3). Los explantes de cotiledones presentaron una respuesta de organogénesis para brotes con concentraciones de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de BAP y para raíces, con concentraciones de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de ANA. En ambos

Table 3. Effect of treatments with naphthalene acetic acid and benzyl aminopurine to induce organogenesis from hypocotyl and cotyledon as explant.
Cuadro 3. Efecto de tratamientos con ácido naftalenacético y bencilaminopurina para inducir organogénesis a partir de hipocótilo y cotiledón como explantes.

Explants	Treatments	Buds (%)	Callus (%)	Roots (%)
Hypocotyl	A	0	0	0
"	B	0	33	0
"	C	0	66	0
"	D	0	100	0
"	E	16	100	0
"	F	0	83	0
"	G	0	100	16
"	H	0	100	0
"	I	0	100	0
Cotyledon	A	0	0	0
"	B	33	16	0
"	C	50	33	0
"	D	0	0	33
"	E	0	100	0
"	F	0	100	0
"	G	0	0	100
"	H	0	100	0
"	I	0	100	0

Treatments (NAA/BAP, mg L⁻¹) = A= 0.0/0.0, B = 0.0/0.5, C = 0.0/1.0, D = 0.5/0.0, E = 0.5/0.5, F= 0.5/1.0, G = 1.0/0.0, H = 1.0/0.5, I = 1.0/1.0. ♦ Tratamientos (NAA/BAP, mg L⁻¹) = A= 0.0/0.0, B = 0.0/0.5, C = 0.0/1.0, D = 0.5/0.0, E = 0.5/0.5, F= 0.5/1.0, G = 1.0/0.0, H = 1.0/0.5, I = 1.0/1.0.

growth regulators, but root formation was due only to the treatment with 0.5 mg L⁻¹ of ANA. BAP in the culture medium induced callus formation, but the highest responses occurred in combination with ANA. There was a higher percentage of shoots with C treatment and 1.0 mg L⁻¹ BAP in cotyledon as explant; thus, this treatment was better for *in vitro* propagation of *Physalis* plant for shoot induction using 50% MS medium (Table 3).

The best morphogenetic response to induce shoots was obtained using cotyledons as explant after 34 d of culture, with 50 *vs.* 16% from hypocotyls as explant. This was attributed to the difference in anatomy traits between both explants. Contreras and Almeida (2003) reported morphogenesis induction from hypocotyls and cotyledons of *Physalis ixocarpa* L., using BAP, IAA and Zeatin as growth regulators in the MS medium. However, their results of shoots induction do not agree with our research, since they had a better response by using hypocotyls as explant; 66 shoots using Zeatine, and 44 shoots when mixing BAP and IAA; and a lower response with cotyledons as explant, with 54 shoots in the culture with Zeatine, and 36 shoots using BAP and IAA as regulators. Hence, Zeatine was the better cytoquinine to induce bud formation for both explants (cotyledon and hypocotyls), in contrast to the combination of BAP and IAA.

Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) mixed 1.5 mg L⁻¹ of BAP and IAA, and reported 70% bud formation from hypocotyls of *CHF1-Chapingo* variety, and a yield of 20.8 shoots per explant after 21.1 d of culture. Otrshy *et al.* (2013) reported leaves with nodes from *P. peruviana* L., in medium supplemented with BAP and Kin; callus formation was dependent on the NAA concentration and their combination with BAP.

Root induction

Response in shoot induction and average number of roots per explant existed in 12 treatments with different growth regulators (Table 4). Data was registered after 25 d since the start of each experiment; afterwards, the growth of the roots was stopped. No secondary roots were formed because the roots augmented. A cottony appearance and large size of the roots was gradually observed. Higher percentages of root formation were observed with treatments 0.5 mg L⁻¹ IBA and 0.2 mg L⁻¹ AIA. However, 0.5 mg L⁻¹

casos, la concentración más alta fue la que indujo la respuesta mayor. La formación de callo en hipocótilos y cotiledones ocurrió principalmente en los tratamientos con BAP, en combinación con 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de ANA. El tratamiento indujo la formación de brotes con 0.5 mg L⁻¹ de ambos reguladores del crecimiento, aunque la formación de la raíz solo se debió al tratamiento con 0.5 mg L⁻¹ de ANA. BAP en el medio de cultivo indujo la formación de callo, pero las respuestas mayores ocurrieron en combinación con ANA. Un porcentaje mayor de brotes se generó con el tratamiento C y 1.0 mg L⁻¹ de BAP con el cotiledón como explante. Así, este tratamiento fue el mejor para la propagación *in vitro* de la planta de *Physalis* con inducción de brotes en el medio MS al 50% (Cuadro 3).

La respuesta morfogénica mejor para inducir brotes se obtuvo al usar los cotiledones como explantes después de 34 d de cultivo, con 50 *vs.* 16% a partir de hipocótilos como explante. Esto se atribuyó a la diferencia en los rasgos anatómicos entre ambos explantes. Contreras y Almeida (2003) reportaron inducción morfogénica de hipocótilos y cotiledones en *Physalis ixocarpa* L., con BAP, IAA y Zeatina como reguladores del crecimiento en el medio. Sin embargo, los resultados obtenidos por dichos autores para la inducción de brotes no coinciden con nuestra investigación, ya que ellos obtuvieron una respuesta mejor al usar hipocótilos como explantes; 66 brotes con Zeatina y 44 con la mezcla BAP e IAA; así como una respuesta menor al usar cotiledones como explantes, con 54 brotes en el cultivo con Zeatina y 36 con BAP e IAA como reguladores. Por consiguiente, Zeatina fue la mejor citoquinina para inducir la formación de brotes para ambos explantes (hipocótilos y cotiledones), en contraste con la combinación de BAP e IAA.

Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) mezclaron 1.5 mg L⁻¹ de BAP e IAA y documentaron una formación de brotes de 70% de hipocótilos de la variedad *CHF1-Chapingo*, así como un rendimiento de 20.8 brotes por explante después de 21.1 d de cultivo. Otrshy *et al.* (2013) reportaron hojas con nódulos de *P. peruviana* L. en un medio suplementado con BAP y KIN; la formación de callos dependió de la concentración de NAA y su combinación con BAP.

Inducción de raíces

En los 12 tratamientos con diferentes reguladores del crecimiento existió respuesta en la inducción de

Table 4. Effect of the concentration of auxin types on root formation (%).

Cuadro 4. Efecto de la concentración de tipos de auxinas en la formación de raíz (%).

mg L ⁻¹	NAA (%)	IBA (%)	IAA (%)
0.0	47	-	-
0.2	60	60	73
0.5	67	80	47
1.0	13	47	67
1.5	20	33	27

NAA= Naphthalene acetic acid; IBA= Indol butyric acid; IAA= Indol acetic acid. ♦ NAA= Ácido naftaleno acético; IBA= Ácido indol butírico; IAA= Ácido indol acético.

IBA obtained the higher response to root formation (≈ 80%), and the average counted of roots per explant was four (Figure 1d). This number showed no significant differences among treatments (Figure 2).

Auxins in culture medium can promote the formation of roots. In our research there were three auxins and only 0.5 mg L⁻¹ IBA induced 80% root formation, which is similar to results showed

raíz y en el promedio de raíces por explante (Cuadro 4). Los datos se registraron 25 d después del inicio de cada experimento; después, el crecimiento de las raíces se detuvo. Tampoco se formaron raíces secundarias porque aumentarían las raíces. Una apariencia algodonosa y tamaño grande se observó de manera gradual en las raíces. Porcentajes mayores de formación radical se observaron con los tratamientos 0.5 mg L⁻¹ IBA y 0.2 mg L⁻¹ AIA. Sin embargo, 0.5 mg L⁻¹ de IBA obtuvo la respuesta más alta en la formación de raíces (≈ 80%) y el promedio de raíces contabilizadas por explante fue de cuatro (Figura 1d). Este número no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Figura 2).

Las auxinas pueden promover la formación de raíces en un medio de cultivo. En nuestra investigación hubo tres auxinas y solo 0.5 mg L⁻¹ IBA indujo el 80% de formación de raíces, lo cual fue similar a los resultados obtenidos por Otroschy *et al.* (2013), quienes encontraron una formación de raíces de 100% con 0.5 mg L⁻¹ y 1.0 mg L⁻¹ de IBA en *P. peruviana* L. El crecimiento en cultivos libres de reguladores presentó una respuesta de 47% en formación radical, similar a los resultados reportados por Contreras y

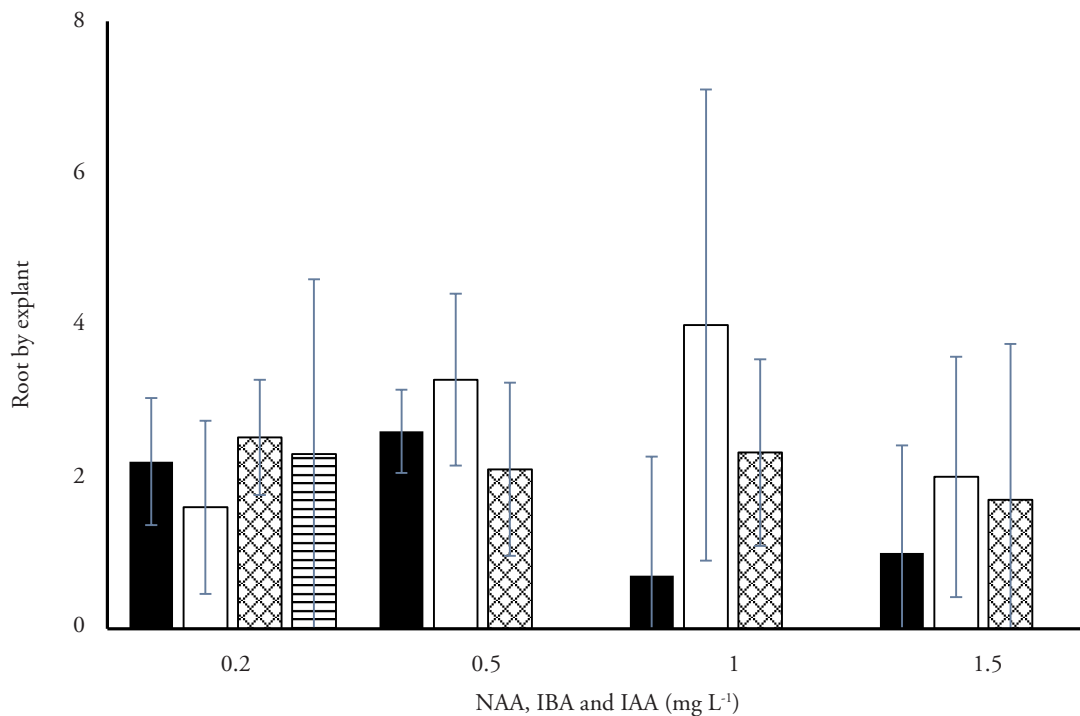


Figure 2. Average of roots per explant, with NAA (■), IBA (□), IAA (⊠) and control (▨). There was no statistical difference (p>0.05).

Figura 2. Promedio de raíces por explante, con NAA (■), IBA (□), IAA (⊠) y testigo (▨). Sin diferencia estadística (p>0.05).

by Otroshy *et al.* (2013) who found 100% root formation with 0.5 mg L⁻¹ and 1.0 mg L⁻¹ of IBA in *P. peruviana* L. Growth in regulators-free cultures showed a response of 47% in root formation, similar to the results reported by Contreras and Almeida (2003) and by Montiel *et al.* (2011), who did not use regulators to induce rooting in *P. ixocarpa* L. and *P. peruviana* L., respectively. This could be related to concentration of salts in the 50% MS medium, because no response was observed using 100% MS medium (Montiel *et al.*, 2011).

Acclimatization

During seven weeks of acclimatization, the temperature and the relative humidity decreased inside the bag used to cover the plants. The difference between the initial data and the final data was 7.0 °C, and a difference of 19% for relative humidity (Figure 3). The stomatal conductance of leaves from the bottom of the plant showed a trend to decrease with values higher than 500 mmol m² s⁻¹ during the first

Almeida (2003) y por Montiel *et al.* (2011), quienes no usaron reguladores para inducir el enraizamiento en *P. ixocarpa* L. y *P. peruviana* L., respectivamente. Esto podría estar relacionado con la concentración de sales en el medio MS al 50%, ya que no se observó respuesta al usar un medio MS al 100% (Montiel *et al.*, 2011).

Acclimatación

Durante siete semanas de aclimatación, la temperatura y la humedad relativa disminuyeron dentro de las bolsas usadas para cubrir las plantas. La diferencia entre el dato inicial y el final fue de 7.0 °C, y para la humedad relativa, una diferencia de 19% (Figura 3). La conductancia estomática de las hojas de la parte inferior de la planta presentó una tendencia a la reducción, con valores mayores a 500 mmol m² s⁻¹ durante las tres primeras semanas de aclimatación y 117.48 mmol m² s⁻¹ al final del proceso, mientras que las hojas de la parte superior de la planta no mostraron ese comportamiento.

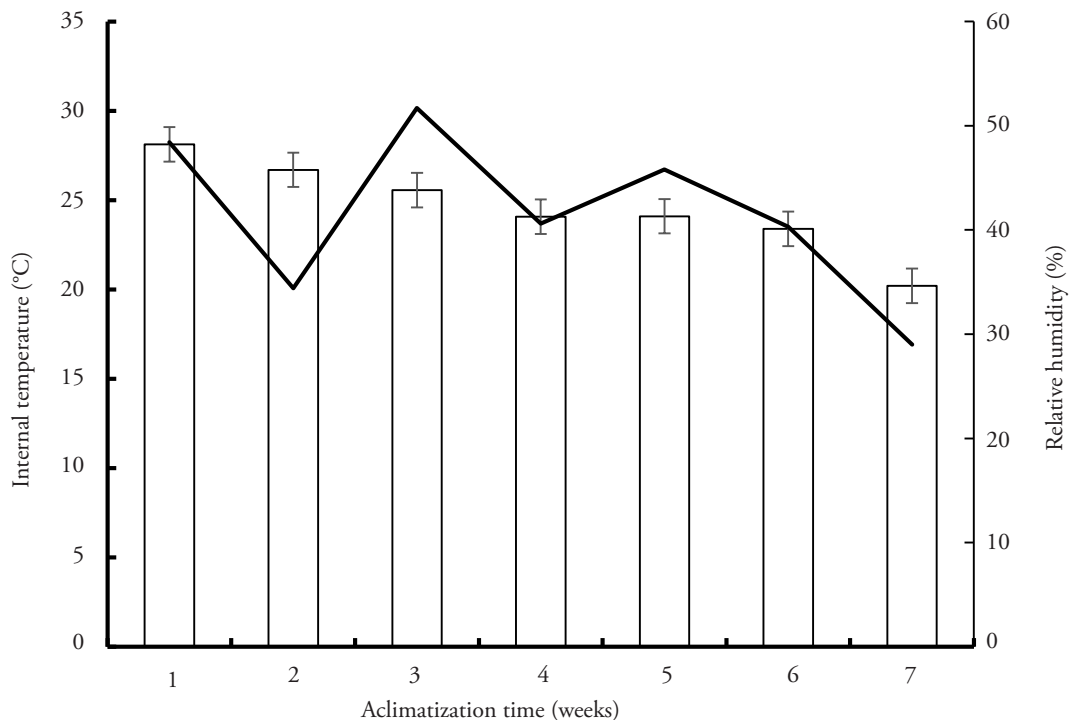


Figure 3. Record of the temperature inside the plastic bag that is covering the plant (□) and the percentage of the temperature and relative humidity of the environment (-).

Figura 3. Registro de la temperatura dentro de la bolsa plástica que cubre la planta (□) y porcentaje de temperatura y humedad relativa del ambiente (-).

three weeks of acclimatization, and $117.48 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$ at the end of the process; while the leaves of the upper part of the plant showed no such behavior.

At the beginning and at the end of the acclimatization stage, conductance recorded was $100 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$, with the highest value ($238.23 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$) in the fourth week (Figure 4). In both types of leaves there was a high interval of standard deviations, with a statistically significant difference in the first two weeks. During acclimatization, seedlings have high transpiration rates due to *in vitro* culture, and their stomata do not regulate opening and closing (Teixeira *et al.*, 2017). In our research, the behavior of the stomatal conductance in lower leaves indicates that there was a gradual regulation in the opening and closing of stomata, in such a way that as air enters with a lower concentration of water vapor, the conductance decreases.

Seon *et al.* (2000) reported a decrease in stomatal conductance during the process of acclimatization of *Rehmannia glutinosa*. The small variation of the stomatal conductivity observed during seven weeks of

Al principio y la final de la etapa de aclimatación, la conductancia registrada fue de $100 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$, con el valor más alto ($238.23 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$) en la cuarta semana (Figura 4). En ambos tipos de hojas hubo un intervalo alto de desviaciones estándar, con una diferencia estadística significativa en las primeras dos semanas. Durante la aclimatación, las plántulas muestran tasas altas de transpiración debido al cultivo *in vitro* y los estomas no regulan su apertura y cierre (Teixeira *et al.*, 2017). En nuestro estudio, el comportamiento de la conductancia estomática en las hojas inferiores indica que hubo una reducción gradual en la apertura y cierre de los estomas; de tal forma que, a medida que entra el aire con una concentración menor de vapor de agua, la conductancia disminuye.

Seon *et al.* (2000) consignaron una reducción en la conductancia estomática durante el proceso de aclimatación de *Rehmannia glutinosa*. La pequeña variación de la conductividad estomática observada durante siete semanas de aclimatación en las hojas superiores puede deberse a la falta de regulación en

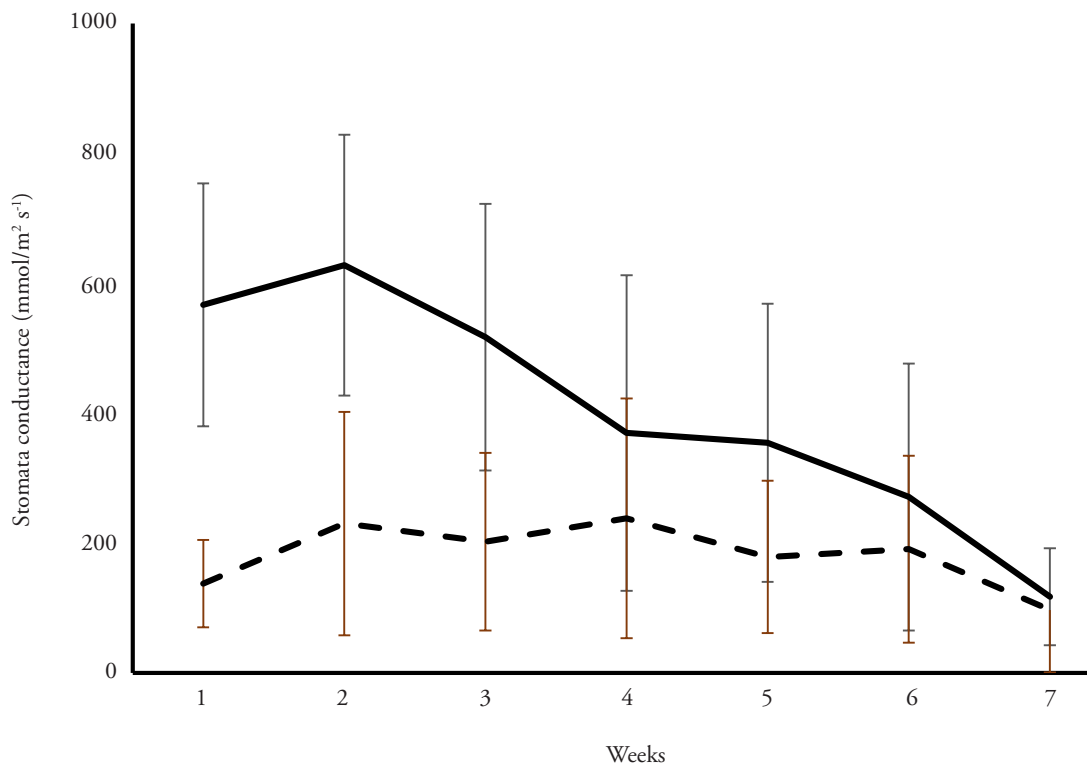


Figure 4. Behavior of the stomata conductance from lower (solid line) and upper leaves (dashed line) when applying Mann-Whitney test ($p=0.017$).

Figura 4. Comportamiento de la conductancia estomática de hojas inferiores (línea continua) y superiores (línea punteada) al aplicar la prueba Mann-Whitney ($p=0.017$).

acclimatization in upper leaves may be due to the lack of regulation in the stomatal opening. The difference in conductance values with those recorded in lower leaves could be due to their lower development, with lower stomatal density or smaller stomatal size, or both. Noé and Bonini (1996) reported the anatomical changes in high bush blueberry leaves (*Vaccinium corymbosum*) cv. 'Bluetta' during the air conditioning process. Therefore, there are changes in the shape of palisade cells from circular to rectangular, double the number of palisade cell layers, and a decrease in the stomatal density.

Identification of *Physalis*

According to the National Herbarium in Mexico (MEXU), *Physalis* was identified as a species that belongs to subgenera *Rydbergis* *Hendrych* from section *Rydbergae* M. Martínez, which has two species: *P. minimaculata* *Waterf* and *P. rydbergii* *Fernald*. Thus, this species was identified as *P. aff rydbergii* *Fernald*, an herbal plant and perennial characterized by its indumentum of simple trichomes that could be glandular or not. Their flowers stand apart from each other, the corolla is yellow and rotated with dark macules (Figure 5A). Receptacle of the fruit is spherical (Figure 5B).

las aperturas estomáticas. La diferencia en valores de conductancia con los registrados en las hojas inferiores puede deberse a su desarrollo menor, con una densidad estomática menor o al tamaño más pequeño de los estomas, o ambos. Noé y Bonini (1996) informaron los cambios anatómicos en hojas de mora azul (*Vaccinium corymbosum*) cv. 'Bluetta' durante el proceso de aclimatación. Por lo tanto, existen cambios en la forma de las células en empalizada de circular a rectangular, se duplica el número de capas de células empalizadas y se reduce la densidad estomática.

Identificación de *Physalis*

De acuerdo con el Herbario Nacional de México (MEXU), *Physalis* se identificó como una especie perteneciente a los subgéneros en *Rydbergis* *Hendrych* de la sección *Rydbergae* M. Martínez, que tiene dos especies: *P. minimaculata* *Waterf* y *P. rydbergii* *Fernald*. Así, esta especie se identificó como *P. aff rydbergii* *Fernald*, una planta herbácea y perenne, caracterizada por su indumento de tricomas simples, que pueden ser glandulares o no. Sus flores sobresalen las unas de las otras, la corola es amarilla y rodeada de máculas oscuras (Figura 5A). El cáliz del fruto es esférico (Figura 5B).



Figura 5. *Physalis aff rydbergii* Fernald A) Flower, B) fruit.
 Figura 5. *Physalis aff rydbergii* Fernald A) Flor, B) Fruto.

CONCLUSIONS

The species of *Physalis* growing in Puebla, Mexico, was identified as *Physalis aff rydbergii* Fernald. *In vitro* propagation was established by the cultivation of nodes and induction of organogenesis in cotyledons. The greatest response in root formation was obtained with indole butyric acid. At the end of acclimatization, the stomatal conductance of lower and upper leaves tended to be the same.

LITERATURE CITED

- Andrade-Rodríguez M., M. C. López-Peralta, V. A. González-Hernández, A. García-Velázquez, and A. Peña-Lomelí. 2005. Effect of genotype on micropropagation of husk tomato. *Rev. Chapingo Ser Hortic.* 11: 31-37.
- Barrientos Ramírez L, M. L. Arvizu, E. Salcedo Pérez, S. Villanueva Rodríguez, J. J. Vargas Radillo, B. Barradas Reyes, y M. Ruiz López. 2019. Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodiifolia* Lam. silvestre y cultivo. *Rev. Mex. Cienc For.* [Internet]. 10: 182-00.
- Chaves, A. D., M. W. Schuchi, and A.C. Erig. 2005. Establecimiento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. *Ciência e Agrotecnol.* 29: 1281-1287.
- Contreras I., y Almeida, P. J. 2003. Micropropagación del tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.). *Rev. de Facultad de Farmacia de los Andes* 45: 61-64.
- Lascurain, M., S. Avendaño, S. del Amo, y A. Niembro. 2010. Guía de Frutos Silvestres Comestibles en Veracruz. Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, CONAFOR-CONACYT, México. 144 p.
- López-Sandoval, J. A., E. J. Morales-Rosales, H. Vibrans, E. Uscanga-Mortera, O. Vargas-Ponce, and M. Martínez-Díaz-De-Salas. 2018. Cultivation of wild species of genus *Physalis* and its relationship with synanthropy. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 21: 303-315.
- Maldonado, E., A. L. Pérez-Castorena, C. Garcés, and M. Martínez. 2011. Philadelphicalactones C and D and other cytotoxic compounds from *Physalis philadelphica*. *Steroids.* 76: 724-728.
- Martínez, M., O. Vargas-Ponce, A. Rodríguez, F. Chiang, and S. Ocegueda. 2017. Solanaceae family in Mexico. *Bot Sci.* 95: 131-145.
- Montiel M., O., M.C. Pastelin-Solano, E. Ventura-Zapata, C. Castañeda-Castro, M. T. González-Arno, M. Guevara-Valencia, M. Luna-González, and C. Díaz-Ramos. 2011. Enlargement and rooting of peruvian cherry (*Physalis peruviana* L.) vitroplants. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 13: 537-542.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Noe N., and L. Bonini. 1996. Leaf anatomy of high bush blueberry grow *in vitro* and during acclimatization *ex vitro* conditions. *Biol Plant.* 38: 19-25.

CONCLUSIONES

La especie de *Physalis* que crece en Puebla, México, se identificó como *Physalis aff rydbergii* Fernald. La propagación *in vitro* se estableció con el cultivo de nódulos y la inducción de organogénesis en cotiledones. La mayor respuesta en la formación de raíces se obtuvo con el ácido indol butírico. Al final de la aclimatación, la conductancia estomática de las hojas inferiores y superiores tendió a ser la misma.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

- Otroshy M., A. Mokhtari, S. Mohammad, S. M. M. Khodae, and A. Bazrafshan. 2013. Direct regeneration from leaves and nodes explants of *Physalis peruviana* L. *Intl. J. Farm. All Sci.* 2: 214-218.
- Rodríguez, L., J. 2012. Obtención y propagación *in vitro* de la crasulácea ornamental *Pachyphytum compactum* Rose para su rescate y conservación. Chapingo, México: UACH. 76 p.
- Santiaguillo H., J. F., y S. Blas Y. 2009. Aprovechamiento tradicional de las especies del género *Physalis* en México. *Rev. Geograf. Agríc.* 43: 81-86.
- Sarukhán, J., P. Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, J. Llorente-Bousquets, G. Halffter, R. González, I. March, A. Mohar, S. Anta, J. de la Maza, I. Pisanty, T. Urquiza Hass, S. P. Ruíz G., y G. García M. (comps). 2017. Capital Natural de México. Síntesis: Evaluación del Conocimiento y Tendencias de Cambio, Perspectivas de Sustentabilidad, Capacidades Humanas e Institucionales. CONABIO. Ciudad de México, México. 126 p.
- Seon, J. H., Y. Y. Cui, T. Kozai, and K. Y. Paek. 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival ratio of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 61: 135-142.
- Sheeba, E., S. Palanivel and S. Parvathi. 2015. *In Vitro* flowering and rapid propagation of *Physalis minima* Linn. A medicinal plant. *Int. J. Innov. Res. Sci Eng. Technol.* 4: 18763-18768.
- Teixeira S., J. A., M. M. Hossain, M. Sharma, J. Dobránszki, J. C. Cardoso, and Z. Songiun. 2017. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Hortic Plant J.* 3: 110-124.
- Valdivia-Mares, L. E., F. A. Rodríguez-Zaragoza, J. J. Sánchez-González, and O. Vargas-Ponce. 2016. Phenology, agronomic and nutritional potential of three wild husk tomato species (*Physalis*, Solanaceae) from Mexico. *Sci Hortic.* 200: 83-94
- Ventura Z., E., G. Salcedo M., A. N. Hernández L., B. Martínez B., G. Trejo T., A. De Jesús, S., M. Velázquez V., and A. Jiménez A. 2003. *In vitro* regeneration and acclimatization of plants of tumeric (*Curcuma longa* L.) in a hydroponic system. *Biotechnol. Appl.* 20: 25-31.

Xia G., Y. Li, J. Sun, L. Wang, X. Tang, B. Lin, N. Kang, J. Huang, L. Chen, and F. Qiu. 2016. Withanolides from the stems and leaves of *Physalis pubescens* and their cytotoxic activity. *Steroids*. 115: 136-146.

CARATERIZACION SENSORIAL DE LÁMINAS PANIFICADAS DE HARINA DE MAÍZ EN RESPUESTA A MEZCLAS CON HARINA DE AJONOJLI

SENSORIAL CHARACTERIZATION OF MAIZE-FLOUR BAKED PRODUCTOS IN RESPONSE TO SESAME-FLOUR MIXES

Rodrigo Santos López¹, Lilia Leticia Méndez Lagunas², Laura Victoria Aquino González², Juan Rodríguez Ramírez², Sadoth Sandoval Torres², Luis Gerardo Barriada Bernal³, Irene Chaparro-Hernández³

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Comitancillo. Carretera Ixtaltepec - Comitancillo Km 7.5. 70750. San Pedro Comitancillo, Oaxaca, México. ²Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN), unidad Oaxaca. Hornos 1003. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. ³Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Hornos 1003. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. (lbarriadab@ipn.mx).

RESUMEN

En México es poco común la formulación de productos panificados desde harinas de maíz (*Zea mays*) adicionadas con harinas de otros cereales, leguminosas, oleaginosas o frutos secos o ambos, con el propósito de obtener productos con propiedades sensoriales o nutricias mejoradas. En esta investigación se evaluaron las propiedades sensoriales, textura y grado de aceptación, de láminas panificadas (conocidas en México como totopos) con una base de harina de cinco razas de maíz y harina integral de ajonjolí (*Sesamum indicum*) como aditivo en las proporciones 20:0, 19:1, 18:2, 17:3. Las propiedades de efecto crujiente, frescura y dureza se evaluaron mediante el análisis cuantitativo y cualitativo de los patrones de esfuerzo (TPA), mientras que el grado de aceptación se evaluó por un panel no entrenado. El diseño experimental fue factorial con dos factores y tres repeticiones por nivel (n=60). Las diferencias entre medias se evaluaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las masas panificables evaluadas presentaron diferencias en las propiedades sensoriales, efecto crujiente y frescura, en una relación de harina de maíz:harina de ajonjolí 17:3 (p/p). El grado de aceptación de los productos panificados no cambió con ninguna proporción de harina mixta.

Palabras clave: harinas mixtas panificables, *Sesamum indicum*, *Zea mays*, láminas panificables, propiedades sensoriales.

ABSTRACT

In Mexico, the formulation of baked goods from maize (*Zea mays*) flours added with flours from other cereals, legumes, oilseeds or dry fruits or both is not very common, with the purpose of obtaining products with improved sensory or nutritional properties. In this study, the sensory properties, texture and degree of acceptance were evaluated, of baked chips (known in Mexico as *totopos*) with a base of flour from different maize landraces to which different proportions of whole sesame (*Sesamum indicum*) flour were added as additive. The properties of crunch effect, freshness and hardness were evaluated through the quantitative and qualitative analysis of the effort patterns (TPA), while the degree of acceptance was evaluated by an untrained panel. The experimental design was factorial with two factors and three repetitions per level (n=60). The means differences were evaluated with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The different baking doughs assessed presented differences in the sensory properties, crunch effect and freshness; in a flour rate of maize flour:sesame flour of 17:3 (w/w). The degree of the baked goods did not change with any proportion of flour mix.

Key words: mixed baking flours, *Sesamum indicum*, *Zea mays*, baked chips, sensory properties.

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays*) is the main cereal plant in Mexico (SAGARPA, 2017). In the central-south part of the republic, maize consumption is the main caloric source in the daily diet.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 873-884. 2020.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) es el principal cereal cultivado en México (SAGARPA, 2017). En la parte centro-sur de la república el consumo de maíz es la principal fuente calórica en la ingesta diaria.

La panificación es el proceso de cocción de una masa con base en harina de trigo, harinas de semillas comestibles, o sus mezclas; y agua. Los productos pueden contener sal y levadura comestibles (DOF, 1999). Una práctica común en la panificación es el uso de aditivos para mejorar las propiedades de la masa, incrementar la calidad o mejorar las propiedades nutricionales de los productos panificados (Mamat y Hill, 2014).

En México se producen alrededor de 1425 t anuales de ajonjolí (*Sesamum indicum*) que se destinan a la obtención de aceite, como complemento en piensos dietarios en actividades pecuarias, y en menor grado, para elaborar productos alimenticios enriquecidos (SIAP, 2018). El ajonjolí es una oleaginosa cuyo contenido de aceite es 42 a 54% del peso seco de la semilla; además tiene 22 a 25% de proteína (Yoshida *et al.*, 2007). La fracción del aceite contiene 90 a 96% de triacilglicérols y 2 a 3% de fosfolípidos, y es resistente al deterioro oxidativo debido a la presencia de sesamol, sesaminol y diversos tocoferoles (Hemalatha y Ghafoorunissa, 2004).

La presencia de ácidos grasos, en su mayoría poliinsaturados, y de aminoácidos esenciales en la harina de ajonjolí, la convierte en un aditivo con gran potencial en la industria de los productos panificados. El cambio en las propiedades sensoriales derivado de la mezcla de harinas de cereales y ajonjolí puede influir positivamente en la aceptación del producto, si los atributos sensoriales son similares a los de productos panificados tradicionales. Los atributos sensoriales como dureza, frescura y efecto crujiente tienen una correlación significativa con percepciones de alimentos de alta calidad y aceptación (Mallikarjunan, 2004). La dureza se define como el efecto sensorial relacionado con la fuerza o presión ejercida al momento de masticarlos (Luyten *et al.*, 2004; van Vliet *et al.*, 2007). La frescura es el parámetro sensorial más versátil en alimentos, se relaciona con el atributo de dureza, pero su adecuada interpretación depende del tipo de producto evaluado y de múltiples consideraciones culturales relacionadas con su consumo (Saeleaw y Schleining, 2011). El efecto crujiente es un atributo sensorial asociado con el efecto sonoro

Baking is the cooking process of a dough based on wheat flour, edible seeds flours, or their mixture; and water. The products can contain salt and edible yeast (DOF, 1999). A common practice in the baking industry is the use of additives to improve the properties of the dough, increase the quality, or improve the nutritional properties of the baked goods (Mamat and Hill, 2014).

In Mexico around 1 425 t of sesame (*Sesamum indicum*) are produced annually, which are destined to obtaining oil, as supplement in feeds for livestock activities, and to a lesser degree, in the elaboration of enriched food products (SIAP, 2018). Sesame is an oilseed with high oil content, which represents between 42 and 54% of the dry weight of the seed; in addition, it contains between 22 to 25% of protein (Yoshida *et al.*, 2007). The oil fraction is made up primarily of triglycerides (between 90 to 96%) and phospholipids (between 2 to 3%); and it is resistant to oxidative deterioration due to the presence of the sesamol, the sesaminol and different tocopherols (Hemalatha and Ghafoorunissa, 2004).

The presence of fatty acids, mostly polyunsaturated, and of essential amino acids in sesame flour, makes it an additive with great potential in the industry of baked goods. The change in sensory properties derived from the mixture of cereal flours and sesame can have a positive influence on the acceptance of the product, as far as the sensory attributes are, at least, similar to the ones that can be appreciated in the traditional baked goods. Sensory attributes like hardness, freshness and crunch effect were significantly correlated with perceptions of foods with high quality and acceptance (Mallikarjunan, 2004). Hardness was defined as the sensory effect related to the force or pressure exerted at the moment of chewing (Luyten *et al.*, 2004; van Vliet *et al.*, 2007). Freshness was described as the most versatile sensory parameter in foods; it is related with the attribute of hardness, but its adequate interpretation depends on the type of product assessed and on multiple cultural considerations related to their consumption (Saeleaw and Schleining, 2011). The crunch effect is a sensory attribute associated with the sound effect when chewing, and it is related with the intake of toasted or fried goods (Pedreschi and Moyano, 2005; Thanatuksorn *et al.*, 2007); the presence or absence of the crunch effects influences significantly the acceptance and purchase of the final product (Mallikarjunan, 2004).

al masticar, y se relaciona con la ingesta de productos tostados o fritos (Pedreschi y Moyano, 2005; Thanatuksorn *et al.*, 2007); la presencia o ausencia del efecto crujiente tiene influencia significativa en la aceptación y adquisición del producto final (Mallikarjunan, 2004).

El objetivo de esta investigación fue evaluar las propiedades sensoriales, textura y grado de aceptación de láminas panificadas con una mezcla de harina de variedades de maíz adicionada con harina integral de ajonjolí como aditivo. La hipótesis fue que el uso de harina de ajonjolí como aditivo en masas panificables con base en harina de variedades de maíz modifica las propiedades sensoriales de dureza, frescura y efecto crujiente en los productos panificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Cinco muestras se seleccionaron de dos razas de maíz nativo: zapalote chico, bolita azul, bolita morado, bolita rojo y bolita amarilla para su evaluación. Las semillas se adquirieron de productores rurales del municipio de la Villa de Zaachila (16° 57' 04.3" N; 96° 45' 00.1" O), y del municipio de Tehuantepec (16° 19' 36.6" N; 95° 11' 57.4" O), en el estado de Oaxaca, México. La semilla de ajonjolí de la variedad Instituto 71 (var. Tehuantepec III) proveniente del ciclo otoño-invierno 2017, se adquirió de productores del distrito de San Blas Atempa, municipio de Tehuantepec (16° 19' 36.6" N; 95° 11' 57.4" O).

Preparación de la harina de maíz

Remoción del pericarpio

Un kilogramo de maíz se coció en 1 L de una solución de hidróxido de calcio (Fermont) al 10% (p/v) a 92 °C por 1 h. Los granos cocidos se drenaron y lavaron dos veces con agua destilada (Fermont). La masa drenada se deshidrató en un secador convectivo (Excalibur D900TB, EUA) a 70 °C por 24 h hasta alcanzar un porcentaje de humedad menor al 10% (base seca). El material seco se molió en un molino de cuchillas (Boou Bo-800S1, China) hasta obtener material granulado, el cual se tamizó en malla #60 hasta tener partículas de tamaño ≤ 0.25 mm.

Preparación de la harina de ajonjolí

Los granos de ajonjolí se lavaron con agua destilada (Fermont) y se molieron en molino de cuchillas (Boou Bo-800S1, China) hasta obtener una masa de consistencia homogénea.

The objective of this study was to evaluate the sensory properties, texture and degree of acceptance, of baked chips with a mixture of flours from different maize varieties added with whole sesame flour as additive. The hypothesis was that the use of sesame flour as additive in baking doughs with a base of flour from different maize varieties modifies the sensory properties of hardness, freshness and crunch effect in baked goods.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Five different samples were selected from two maize races, *zapalote chico*, *bolita azul*, *bolita morado*, *bolita rojo*, and *bolita amarilla* for their assessment. The seeds were obtained directly from rural producers in the county of Villa de Zaachila (16° 57' 04.3" N; 96° 45' 00.1" W), and the county of Tehuantepec (16° 19' 36.6" N; 95° 11' 57.4" W), in the state of Oaxaca, Mexico. The sesame seed of the variety Instituto 71 (var. Tehuantepec III) from the fall-winter cycle 2017 was obtained from producers in the district of San Blas Atempa, county of Tehuantepec (16° 19' 36.6" N; 95° 11' 57.4" W).

Maize flour preparation

Removal of the pericarpium

A kilogram of maize was cooked in a liter of a 10% (w/v) of calcium hydroxide solution (Fermont) at 92 °C for 1h. The cooked grains were drained and washed twice with distilled water (Fermont). The drained mass was dehydrated in a convection drier (Excalibur D900TB, USA) at 70 °C for 24 h, until reaching a percentage of moisture under 10% (dry base). The dry material was ground through a blade mill (Boou Bo-800S1, China) until obtaining granulated material. The granulated material was sieved through a #60 mesh until obtaining particles of size ≤ 0.25 mm.

Sesame flour preparation

The sesame grains were washed with distilled water (Fermont) and ground in a blade mill (Boou Bo-800S1, China) until obtaining dough of homogeneous consistency.

Baking mixed flour preparation

Different rates of maize flour (MF) and whole sesame flour (SF) were assessed, with addition of sesame flour in rates of 20:0 (w/w) to 10:10 (w/w).

Preparación de la harina mixta panificable

Cuatro relaciones de harina de maíz (HM) y de harina integral de ajonjolí (HA) se evaluaron con adiciones de harina de ajonjolí en relaciones de 20:0 (p/p) hasta 10:10 (p/p).

La harina mixta se hidrató con agua destilada (Fermont) y se homogenizó mediante agitación mecánica durante 15 min. A la masa panificable resultante se le adicionó goma xantana (Sigma-Aldrich), 1.5% (p/p), como aditivo para mejorar las propiedades viscoelásticas.

La mezcla se formó después en láminas de masa de 2 mm de espesor y de 12 cm de diámetro; para cocerse en horno convectivo (Oster TSSTTVRB04, EUA) a 230 °C durante 7 min.

Cuantificación de color

El color se evaluó usando coordenadas CIE La*b* con un espectrofotómetro y una geometría 45°/0 (Hunter-Lab MiniScan 4500L, EUA).

Para evaluar la combinación de la harina de maíz-ajonjolí, las diferencias de color fueron determinadas con la ecuación 1 (Sharma, 2018).

$$\Delta E_{ab} = \left[(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

donde, ΔE_{ab} : diferencia total de color; L_0 : luminosidad del producto panificado sin adición de harina de ajonjolí; L : luminosidad del producto panificado adicionado con harina de ajonjolí; a_0 : color en la región roja de las láminas panificadas sin adición de harina de ajonjolí; a : color en la región roja del producto panificado adicionado con harina de ajonjolí; b_0 : color en la región azul de las láminas panificadas sin adición de harina de ajonjolí; b : color en la región azul del producto panificado adicionado con harina de ajonjolí.

Evaluación de los atributos sensoriales

La dureza, la frescura y el efecto crujiente de las láminas panificadas se evaluaron con un analizador de textura de doble compresión (Lloyd Instruments LS series, EUA) equipado con una sonda cilíndrica de acero de 10 mm de diámetro. Un análisis de perfil de textura (TPA) se realizó para cuantificar los atributos sensoriales de las láminas panificadas.

Evaluación sensorial por panel de degustación

La evaluación se realizó con 30 panelistas de 20 a 35 años de edad. Cada panelista evaluó muestras al azar debidamente codificadas. La evaluación sensorial registró el grado de aceptación en una escala hedónica de diez puntos; en la cual el valor de 1,

The mixed flour was hydrated with distilled water (Fermont) and was homogenized through mechanical agitation during 15 min. The resulting baking dough was added with xanthan gum (Sigma-Aldrich) 1.5% (w/w), as additive to improve the viscoelastic properties.

The mixture was formed later into dough chips of 2 mm thickness and 12 cm diameter, to be cooked in a convection oven (Oster TSSTTVRB04, USA) at 230 °C during 7 min.

Color quantification

The color was evaluated using CIE La*b* coordinates with a spectrophotometer and a 45°/0 geometry (Hunter-Lab MiniScan 4500L, EE.UU.).

To evaluate the combination of maize-sesame flour, the color differences were defined with Equation 1 (Sharma, 2018).

$$\Delta E_{ab} = \left[(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Where: ΔE_{ab} : total color difference; L_0 : luminosity of the baked good without adding sesame flour; L : luminosity of the baked good with sesame flour addition; a_0 : color in the red region of baked chips without adding sesame flour; a : color in the red region of the baked goods with sesame flour addition; b_0 : color in the blue region of the baked chips without adding sesame flour; b : color in the blue region of the baked goods with sesame flour addition.

Assessment of sensory attributes

The hardness, freshness and crunch effect of baked chips were evaluated with a double compression texture analyzer (Lloyd Instruments LS series, USA) equipped with a steel cylindrical probe of 10 mm diameter. A texture profile analysis (TPA) was carried out to quantify the sensory attributes of the baked chips.

Sensory assessment by a tasting panel

The evaluation was carried out with 30 panelists in an age interval of 20-35 years. Every panelist evaluated properly codified random samples. The sensory evaluation recorded the degree of acceptance in a hedonic scale of ten points, where the value of 1 indicated an extreme dislike, and the value of 10 indicated extreme like.

Experimental design and statistical analyses

A factorial statistical analysis of the data obtained was carried out. The factors evaluated were maize variety and proportion of

indicó un disgusto extremo; y el valor de 10, indicó un gusto extremo.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico factorial completamente al azar. Los factores evaluados fueron la variedad de maíz (5 niveles) y la proporción de harina de ajonjolí adicionada en la mezcla (4 niveles). Los datos se analizaron con un ANDEVA de una vía y las diferencias entre los valores promedio se analizaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El análisis sensorial por panel de degustación se analizó con un ANDEVA de Friedman y de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico se efectuó con el programa Statistica ver. 7.0 (Statsoft, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La raza zapalote chico se cataloga como una raza de grano suave, caracterizada por una mayor proporción de amilosa en los gránulos de almidón, un alta concentración de proteínas, y la presencia de una mayor concentración de ácidos grasos; mientras que la raza bolita se considera como una raza de dureza intermedia, y el tamaño de los gránulos de almidón (predomina amilopeptina) y el contenido de aceite están en valores intermedios; ambas razas exhiben propiedades deseables en la conformación de productos panificables, tortillas y totopos (CONABIO, 2010). Las diferencias en el tamaño de los gránulos de almidón, la relación amilosa:amilopeptina y la concentración de lípidos nativos en el grano se ha correlacionado con el comportamiento viscoelástico de masas nixtamalizadas de razas de maíz (Agama-Acevedo *et al.*, 2011; Contreras-Jiménez, 2013; Contreras-Jiménez, 2015⁴); pero existe poca información del efecto de estas variables en las propiedades sensoriales de los productos panificados.

Las masas panificables conformadas por harinas de maíz:harina de ajonjolí (HM:HA) en relaciones superiores a 17:3 (p/p) exhibieron atributos pobres de elasticidad y generaron láminas panificadas irregulares y frágiles, por lo cual no fue posible evaluar formulaciones por encima de esta relación. Este comportamiento se explica por la presencia de ácidos grasos polares, triacilgliceroles y fosfolípidos, correlacionados con cambios indeseados en la viscoelasticidad en

sesame flour added in the mixture. The data were analyzed with one-way ANOVA and the differences between the average values were analyzed with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The sensory analysis by tasting panel was analyzed with a Friedman and Kruskal-Wallis ANOVA. The statistical analysis was carried out with the Statistica ver. 7.0. software (Statsoft, 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

The *Zapalote chico* landrace is cataloged as a soft grain race, characterized by a higher proportion of amylose in the starch granules, a high concentration of proteins, and the presence of a higher concentration of fatty acids; meanwhile, the *bolita* landrace is considered a race of intermediate hardness, where the variations in the size of the starch granules (predominantly amylopectin), as well as the oil content, are found in intermediate values; both landraces exhibit desirable properties in the conformation of baked goods, *tortillas* and *totopos* (CONABIO, 2010). The differences in size of the starch granules, the amylose:amylopectin rate and the concentration of native lipids in the grain was correlated with the viscoelastic behavior of *nixtamal* flours of different maize landraces (Agama-Acevedo *et al.*, 2011; Contreras-Jiménez, 2013; Contreras-Jiménez, 2015); however, there is scarce information about the effect of these variables on the sensory properties of baked goods.

The baking doughs made of maize flour:sesame flour (MF:SF) in rates higher than 17:3 (w/w) exhibited poor elasticity attributes, and generated irregular and fragile baked chips, which is why it was not possible to evaluate dough formulations higher than this rate. This behavior is explained by the presence of polar fatty acids, triglycerides and phospholipids, which have been correlated with undesirable changes in the viscoelasticity of baking doughs based on wheat flour and wheat flours fortified with other flours (Ghotra *et al.*, 2002; Chin *et al.*, 2007).

In *nixtamal* maize doughs, concentrations of fatty acids higher than 6 % (w/w) were related to losses in the viscoelastic properties, where lipids seem to impede the reconfiguration of crystalline amylopectin structures or the formation of amylopectin structures

⁴Contreras-Jiménez, B., E. Morales S., M. Gaytán M. 2015. Efecto de acondicionamiento sobre las propiedades reológicas de masa de maíz nixtamalizada obtenida por extrusión. Instituto Politécnico Nacional (CICATA-IPN). Tesis doctoral. pp: 78-128. Repositorio DSpace IPN <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/21521>

masas panificables con base en harina de trigo y en harinas de trigo fortificadas con otras harinas (Ghokra *et al.*, 2002; Chin *et al.*, 2007).

En masas nixtamalizadas de maíz, las concentraciones de ácidos grasos mayores al 6% (p/p) se relacionaron con pérdidas en las propiedades viscoelásticas, y los lípidos parecen impedir la reconfiguración de las estructuras cristalinas de amilopectina o la formación de estructuras de amilopectina – iones de calcio, o ambas, después de la retrodegradación ocasionada por la cocción alcalina (Mondragón-Chaparro *et al.*, 2004).

Atributos de color

La harina de ajonjolí no modificó ($p > 0.05$) los atributos de color de los productos panificados en las variedades de maíz evaluadas (Cuadro 1). Los cambios de color en los productos panificados se debieron a la presencia de diversas fracciones del grano de maíz, como el cotiledón, el endospermo y la cascari-lla; y también la de otros compuestos que influyen en el color (el aceite proveniente del ajonjolí, as antocianinas del maíz, y los productos de la oxidación de dichos compuestos por efecto de la cocción).

Los cambios en la luminosidad pueden estar relacionados con la presencia de aceites; mientras que cambios en los parámetros a^* y b^* pueden ser el resultado de la presencia de otros metabolitos secundarios.

Dureza

Sin la adición de harina de ajonjolí, las láminas panificadas de la variedad bolita rojo exhibieron la mayor dureza, 9.16 N s^{-1} (Cuadro 2), mientras que las láminas de la variedad bolita amarillo tuvieron la menor dureza, 2.77 N s^{-1} . La adición de la harina de

calcium ions, or both, after the retro-degradation caused by alkaline cooking (Mondragón-Chaparro *et al.*, 2004).

Color attributes

The sesame flour did not modify ($p > 0.05$) the color attributes of the baked goods in the maize varieties evaluated (Table 1). The color changes in the baked goods resulted from the presence of various fractions of the maize grain, such as cotyledon, endosperm and husk, as well as those of other compounds that influence color (oil from sesame, as well as maize anthocyanins, and products from oxidation of those compounds from cooking).

The changes in luminosity can be related to the presence of oils, while changes in the parameters a^* and b^* can result from the presence of other secondary metabolites.

Hardness

Without the addition of sesame flour, the baked chips of the *bolita rojo* variety exhibited the highest hardness, 9.16 N s^{-1} (Table 2), while the chips of the *bolita amarillo* variety exhibited the lowest hardness, 2.77 N s^{-1} . The addition of sesame flour increased the hardness of the baked chips elaborated with the *bolita amarillo* variety (8.15 N s^{-1}) for a MF:SF rate of 17:3; meanwhile, the *bolita rojo* variety exhibited the greatest decrease in hardness for the same flour rate (4.2 N s^{-1}). These results were different from those observed in maize tortillas mixed with triticale flour, and in other baked goods. Thus, Vaca-García *et al.* (2011) reported a decrease in the final hardness of tortillas made with *nixtamal* maize flour base to which triticale flour was added up to a rate of 2:1

Cuadro 1. Evaluación del cambio de color (ΔE_{ab}) de las láminas panificadas.
Table 1. Assessment of the color change (ΔE_{ab}) of baked chips.

Relación harina de maíz: harina de ajonjolí	Zapalote chico	Bolita azul	Bolita morado	Bolita rojo	Bolita amarillo
20 : 0	73.24±2.74	1.19±2.59	47.72±5.38	51.64±3.45	77.83±2.94
19 : 1	69.63±0.17	1.26±0.62	53.05±1.29	53.40±2.08	75.30±4.31
18 : 2	68.86±1.66	1.23±1.35	48.54±1.98	55.33±0.68	74.80±1.38
17 : 3	69.79±2.73	1.24±1.76	50.60±2.01	53.07±2.97	69.80±3.59

Sin diferencia estadística (Tukey, $p > 0.05$). ♦ Without statistical difference (Tukey, $p > 0.05$).

ajonjolí aumentó la dureza en las láminas panificadas elaboradas con la variedad bolita amarillo (8.15 N s⁻¹) para una relación HM:HA de 17:3, mientras que la variedad bolita roja mostró el mayor decremento en la dureza para la misma relación de harina (4.2 N s⁻¹). Estos resultados fueron diferentes a los observados en tortillas de maíz y harina de triticale y en otros productos panificados. Así, Vaca-García *et al.* (2011) reportaron una disminución en la dureza final de tortillas elaboradas con una base de harina nixtamalizada de maíz adicionada con harina de triticale hasta una proporción 2:1 (p/p), y el proceso de reconfiguración de la red cristalina de almidones de la harina de triticale impidió la retrodegradación de la amilosa y amilopectina en el producto panificado.

Awolu *et al.* (2016) encontraron cambios no significativos en la dureza de las masas panificables con base en harina de maíz (75 a 85%, p/p) a las cuales se adicionaron harinas de soya (10 a 20%, p/p) y harina de *Cyperus esculentus* (5 a 10 %, p/p). Sudha *et al.* (2007) y Noor-Aziah y Komathi (2009) reportaron que en la formulación de masas panificables mixtas

(w/w) and to which the process of reconfiguration of the crystalline network of triticale flour starch impeded the retro-degradation of amylose and amylopectin in the baked good.

Awolu *et al.* (2016) found non-significant changes in the hardness of the baking doughs based on maize flour (between 75 to 85%, w/w), to which soy flours were added (between 10 to 20% w/w) and *Cyperus esculentus* flour (between 5 to 10%, w/w). Sudha *et al.* (2007) and Noor-Aziah and Komathi (2009) reported that in the formulation of mixed baking doughs based on wheat flour, the addition of different whole cereal flours, fruits or vegetables; the freshness and hardness attributes were not modified significantly, even when the addition of other flours was close to 40 % (w/w).

The changes in hardness of various baked goods were described as the result from an increase in the concentration of polar fatty acids, triglycerides, monogalactosyl diglyceride, tri galactosyl monoglycerides, as well as their physical state in the baking dough. These compounds generate

Cuadro 2. Evaluación sensorial.
Table 2. Sensory assessment.

Raza	Relación HM:HA	Dureza (N s ⁻¹)	Frescura (N s ⁻¹)	Efecto crujiente (N mm)
Zapalote chico	20 : 0	6.46±0.87a	14.01±1.62a	6.62±2.25a
	19 : 1	4.33±0.62a	13.65±3.55a	5.54±2.04a
	18 : 2	4.20±1.67a	12.70±5.18a	4.20±2.21a
	17 : 3	4.43±2.12a	14.93±10.61a	5.68±3.89a
Bolita azul	20 : 0	3.42±0.84a	9.06±0.45a	4.47±0.53a
	19 : 1	7.30±0.99a	16.81±2.12a	9.28±0.47a
	18 : 2	6.13±1.46a	18.35±5.8a	7.4±2.25a
Bolita morado	17 : 3	5.46±1.70a	15.16±7.22a	6.89±2.66a
	20 : 0	5.11±0.84a	13.11±2.33a	5.02±0.92a
	19 : 1	7.12±0.76a	19.72±3.17a	9.75±1.83a
Bolita rojo	18 : 2	5.16±3.04a	15.90±5.54a	6.96±1.97a
	17 : 3	7.65±1.58a	22.85±9.25a	7.67±4.27a
	20 : 0	9.16±0.88a	21.23±3.33a	9.00±1.87a
Bolita amarillo	19 : 1	4.51±0.43b	9.69±1.28a	5.41±0.91a
	18 : 2	5.26±1.82b	18.42±17.73a	6.31±3.30a
	17 : 3	4.32±1.19b	10.59±4.10a	5.10±1.43a
Bolita amarillo	20 : 0	2.77±0.43a	9.87±2.91a	2.93±1.05a
	19 : 1	4.90±4.90a	14.88±2.69a	7.81±1.76a
	18 : 2	6.39±2.01a	21.72± 5.07a	9.53±5.14a
	17 : 3	8.15±2.31b	31.55± 2.39b	14.65±8.66b

Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (p≤0.05). ♦ Means with different letter in a row are statistically different (Tukey, p≤0.05).

con base en harina de trigo, la adición de diferentes harinas de cereales integrales, frutas o de verduras, no modificó los atributos de frescura y dureza, aunque la adición de otras harinas fue cercana al 40% (p/p).

Los cambios en la dureza de diversos productos panificados resultan de un aumento en la concentración de ácidos grasos polares, triacilgliceroles, monogalactocildegliceroides y trigalactocilmonogliceroles, así como de su estado físico en la masa panificable. Estos compuestos generan alteraciones en la formación de las redes cristalinas de los gránulos de almidón - iones de calcio - aglutinantes (gluten/goma xantana) debido a reacciones de competencia por sitios activos en las cadenas laterales del aglutinante (Gan *et al.*, 1995; Sroan y McRitchie, 2009); así como modificaciones de la capacidad de retención de aire durante el amasado (Sroan y McRitchie, 2009; Delcour y Hoskeney, 2010) y del bióxido de carbono durante la fermentación y cocción de la masa (Autio y Laurikainen, 1997; Jacob y Leelovath, 2007; Chin *et al.*, 2010). Aumentos en la dureza de los productos panificados también se relacionaron con el patrón de aglomeración de las partículas de almidón en el interior del producto, y con la porosidad de la capa externa generada durante la cocción (Watanabe *et al.*, 2003; Mousia *et al.*, 2007; Chin *et al.*, 2010).

Frescura

El efecto de la adición de harina de ajonjolí sobre la frescura se muestra en el Cuadro 2. La adición de harina de ajonjolí a la harina de maíz de la variedad bolita morada causó que las láminas panificadas exhibieran el mayor atributo de frescura (19.72 N s^{-1}) en una relación harina HM:HA de 19:1; mientras que las láminas de harina de maíz de la variedad bolita roja mostraron el mayor decremento en la frescura (9.69 N s^{-1}) para la misma relación de harinas.

No es sencillo definir el atributo de frescura en alimentos. Cheng *et al.* (2007) y Saeleaw y Schleinig (2011) indicaron que los atributos de frescura y dureza tienen una correlación significativa, y es difícil diferenciar las aportaciones de cada uno en los productos analizados; por lo tanto se hace referencia a este atributo como un indicador de la vida de anaquel del producto. Atributos de baja firmeza se relacionan con productos más duros, que han tenido una pérdida de humedad, como sucede con el pan, o experimentan cambios en las estructuras cristalinas

alteraciones en la formación de redes cristalinas de aglutinante (gluten/xanthan gum) starch granules –calcium ions– resulting from reactions of competition over active sites in the lateral chains of the agglutinant (Gan *et al.*, 1995; Sroan and McRitchie, 2009); also, modifications of the ability to retain air during kneading (Sroan and McRitchie, 2009; Delcour and Hoskeney, 2010) and carbon dioxide during fermentation and cooking of the dough (Autio and Laurikainen, 1997; Jacob and Leelovath, 2007; Chin *et al.*, 2010). Increases in the hardness of the baked goods were also related to the pattern of agglomeration of the starch particles inside the product, and to the porosity of its external layer generated during cooking (Watanabe *et al.*, 2003; Mousia *et al.*, 2007; Chin *et al.*, 2010).

Freshness

The effect of adding sesame flour on freshness is shown in Table 2. The addition of sesame flour to the maize flour from the *bolita morada* variety caused for the baked chips to exhibit the highest attribute of freshness (19.72 N s^{-1}) in a MF:SF flour rate of 19:1, while the maize flour chips of the *bolita rojo* variety showed the highest decrease in freshness (9.69 N s^{-1}) for the same flour rate.

It is not simple to define the attribute of food freshness. Cheng *et al.* (2007) and Saeleaw and Schleinig (2011) indicated that the attributes of freshness and hardness are significantly correlated, and it is difficult to differentiate the contributions of each in the products analyzed; therefore, this attribute is normally referred to as an indicator of the shelf life of the product. Attributes of low firmness in products are related with harder products, which have experienced a loss of moisture, as it happens with bread, or else which experience changes in the crystalline structures of their components generating an increase in hardness, for example in tortillas.

Crunch effect

The MF:SF rate modified ($p \leq 0.05$) the crunch effect (Table 2) starting from the proportion 17:3. In the baked chips without addition of sesame flour, the *bolita rojo* variety exhibited the highest crunch effect (9.00 N mm) while the *bolita amarillo* variety exhibited the lowest effect (2.93 N mm). With the

de sus componentes que generan un aumento en la dureza, por ejemplo en las tortillas.

Efecto crujiente

La relación HM:HA modificó ($p \leq 0.05$) el efecto crujiente (Cuadro 2) a partir de la proporción 17:3. En las láminas panificadas sin la adición de harina de ajonjolí, la variedad bolita rojo exhibió el mayor efecto crujiente (9.00 N mm) mientras que la variedad bolita amarillo mostró el menor efecto (2.93 N mm). Con la adición de harina de ajonjolí, el mayor aumento en el efecto crujiente se observó en la variedad bolita amarillo (14.65 N mm), en una relación de harina de ajonjolí: maíz de 17:3; mientras que la variedad bolita roja exhibió el menor efecto crujiente para la misma relación de harinas (5.10 N mm).

Varios factores afectan el volumen del producto panificado final y la conformación de las redes de almidón-iones del calcio-aglutinante (gluten/goma xantana) (Brooker, 1996; Crowley *et al.*, 2000; Sloan y MacRitchie, 2009). Estas propiedades tienen una correlación directa con las propiedades crujientes.

La dureza, la frescura y el efecto crujiente se han explicado por los patrones de compresión (Figura 1). La dureza se relaciona con la magnitud de la mayor inflexión, mientras que el efecto crujiente se correlaciona con la presencia de múltiples inflexiones durante el periodo de prueba (Cheng *et al.*, 2007). La mayor inflexión se presenta para todas las proporciones de HM:HA evaluadas, después de los 20 s.

La evaluación de la frescura se determina de forma inversa a la usada para describir los atributos de dureza y esta interpretación está relacionada con el uso final del producto. Por ejemplo, en masa de harina de trigo para obtener pan, se buscan productos con bajos índices de fuerza e inflexiones de baja amplitud y frecuencia, referidos a productos frescos y de consistencia blanda. Además, para obtener botanas fritas o tostadas se prefiere índices elevados de dureza e inflexiones de alta amplitud, propiedades buscadas en productos secos y firmes (Duizer, 2004).

Evaluación del grado de aceptación

Los panelistas asignaron calificaciones altas a todos los productos panificados, lo cual indica que el grado de aceptación de los productos se encuentra en el cuartil de la máxima aceptación (8-10), pero no hubo diferencias significativas entre las proporciones HM:HA evaluadas (Cuadro 3).

addition of sesame flour, the highest increase in the crunch effect was observed in the *bolita amarillo* variety (14.65 N mm), in a maize:sesame flour rate of 17:3, while the *bolita rojo* variety exhibited the lowest crunch effect for the same flour rate (5.10 N mm).

Various factors affect the volume of the final baked good and the configuration of starch-ions networks of the calcium-agglutinant (gluten/xanthan gum) (Brooker, 1996, Crowley *et al.*, 2000, Sloan and MacRitchie, 2009); these properties are directly correlated with the crunch properties

Hardness, freshness and crunch effect were explained from the point of view of compression patterns (Figure 1). Hardness is related to the magnitude of the highest inflection, while the crunch effect was correlated with the presence of multiple inflections during the trial period (Cheng *et al.*, 2007). The highest inflection is presented for all the rates of MF:SF assessed, after the 20 s.

The assessment of freshness is determined inversely to the one used to describe the hardness attributes; this interpretation is related to the final use of the product, for example in wheat flour dough destined to obtaining bread, products are sought with low indices of strength and inflections of low amplitude and frequency, referred to fresh products and soft consistency. Besides, for obtaining fried or toasted snacks, high indices of hardness are preferred and high amplitude inflections, properties sought after in dry and firm products (Duizer, 2004).

Evaluation of the degree of acceptance

The panelists assigned high grades to all the baked goods (Table 3), which indicates that the degree of acceptance of the products is in the quartile of maximum acceptance (8-10), but there were no significant differences between the MF:SF rates evaluated (Table 3).

Broyart *et al.* (1998) indicated that the quality assigned by the consumer has a significant correlation with the sensory properties of the product (odor, color, flavor, texture, aftertaste, among others). The sensory evaluations by the final consumer are quite variable, and they refer to the characteristics of products without addition of components. A dark color or accentuated hardness can be interpreted as an indicator of overcooking, while a weak or accentuated odor can be interpreted as a lack of cooking or alteration of the product.

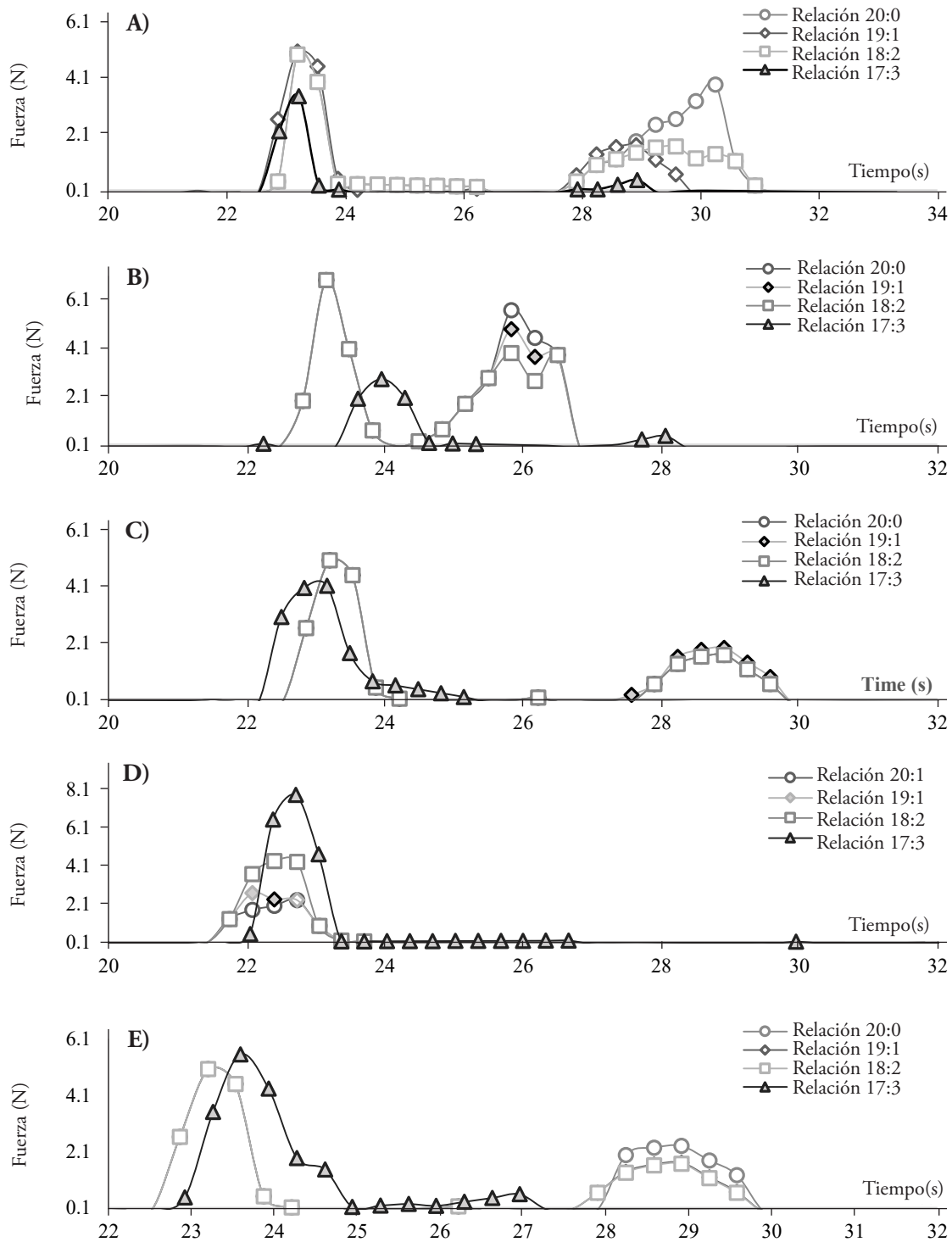


Figura 1. Patrón de compresión de los productos panificados. (A) Zapalote chico; (B) Bolita azul; (C) Bolita morado; (D) Bolita rojo; (E) Bolita amarillo.

Figure 1. Compression pattern of baked goods. (A) Zapalote chico. (B) Bolita azul. (C) Bolita morado. (D) Bolita rojo. (E) Bolita amarillo.

Cuadro 3. Evaluación sensorial por panel de degustación.
Table 3. Sensory assessment by tasting panel.

Raza	Relación HM:HA			
	20:0	19:1	18:2	17:3
Zapalote chico	8.13±0.63	8.13±0.83	8.00±0.92	7.80±0.86
Bolita azul	8.00±0.84	8.27±0.79	7.87±0.74	8.07±0.79
Bolita morado	8.27±0.79	7.93±0.88	7.93±0.96	7.87±0.74
Bolita rojo	7.73±0.88	7.80±0.67	8.00±0.92	7.80±0.77
Bolita amarillo	7.93±0.88	8.00±0.92	8.20±0.67	8.07±0.79

Sin diferencia estadística ($p>0.05$). ❖ Without statistical difference (Tukey, $p>0.05$).

Broyart *et al.* (1998) indicaron que la calidad asignada por el consumidor tiene una correlación significativa con las propiedades sensoriales del producto (olor, color, sabor, textura, regusto, entre otras). Las evaluaciones sensoriales por el consumidor final son muy variables y se refieren a las características de los productos sin adición de componentes. Un color oscuro o una dureza acentuada puede interpretarse como un indicador de sobre cocción, mientras que un olor tenue o acentuado se puede interpretar como una falta de cocción o alteración del producto.

CONCLUSIONES

La máxima relación HM:HA que permite conservar las características viscoelásticas necesarias para la producción de productos tostados fue 17:3 HM:HA.

Las láminas panificadas de la variedad bolita rojo a las cuales no se les adicionó harina de ajonjolí exhibieron las mejores propiedades crujientes entre las razas de maíz evaluadas.

Las láminas panificadas de la variedad bolita amarillo adicionadas con harina de ajonjolí en una proporción de 17:3 (HM:HA), mostraron las mejores propiedades crujientes entre las mezclas panificadas evaluadas.

La formulación de mezclas de harina de diferentes razas nativas de maíz y de harina de ajonjolí permite obtener nuevos productos panificados atractivos y de alta aceptación por el consumidor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen la ayuda económica otorgada por la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFAA –IPN), para la publicación de este manuscrito.

CONCLUSIONS

The maximum MF:SF rate that allows conserving the necessary viscoelastic characteristics for the production of toasted products was 17:3 MF:SF.

The baked chips of the *bolita rojo* variety to which no sesame flour was added exhibited the best crunch properties of the maize landraces evaluated.

The baked chips of the *bolita amarillo* variety added with sesame flour in a proportion of 17:3 (MF:SF) exhibited the best crunch properties among the baking mixtures evaluated.

The formulation of flour mixtures of different maize varieties of landraces and sesame flour allow obtaining new baked goods, attractive and of high acceptance by the consumer.

—End of the English version—



LITERATURA CITADA

Agama-Acevedo, E., Y. Salinas-Moreno, G. Pacheco-Vargas, y L. A. Arturo Bello-Pérez. 2011. Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 2: 317-329.

Autio, K., and T. Laurikainen. 1997. Relationships between flour/dough microstructure and dough handling and baking properties. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 181-185.

Awolu O, O., O. S. Omoba, O. Olawoye, and M. Dairo. 2016. Optimization of production and quality evaluation of maize – based snack supplemented whit soybean and tigernut (*Cyperus esculenta*) flour. *Food. Sci. Nutr.* 5: 3-13.

Brooker, B. E. 1996. The role of fat in the stabilization of gas cells in bread dough. *J. Cereal. Sci.* 24: 187-198

- Broyart, B., G. Trystram, and A. Duquenoy. 1998. Predicting color kinetics during cracker baking. *J. Food. Eng.* 35: 351-368.
- Cheng, E., M., S. Alavi, T. C. Pearson, and R. Agbisit. 2007. Mechanical-acoustic and sensory evaluations of cornstarch-protein isolate extrudates. *J. Texture. Stud.* 38: 473-498.
- Chin, N., K. Goh, R. Adul-Rahman, and M. Hashim D. 2007. Functional effect of fully hydrogenated palm oil-based emulsifiers on baking performance of white bread. *International J. Food Eng.* 3: 1-17.
- Chin N., R. Abdul-Rahman, M. Hashim D, and S. Yue-Kowng. 2010. Palm oil shortening effects on baking performance of white bread. *J. Food Process. Eng.* 33: 413 - 433.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad). 2010. Taller sobre la argumentación para conservar las razas mexicanas de maíz del proyecto recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México. https://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo9_Analisis_Especialistas/Jesus_Sanchez_2011.pdf. (Consulta: mayo 2019).
- Contreras-Jiménez, B., E. Morales-Sánchez, M. L. Reyes-Vega, y M. Gaytán-Martínez. 2013. Propiedades funcionales de harinas de maíz nixtamalizado obtenidas por extrusión a baja temperatura. *CYTA- J. Food* 12: 2636-270.
- Crowley, P., H. Grau, and E. K. Arendt. 2000. Influence of additives and mixing time on crumb grain characteristics of wheat bread. *Cereal Chem.* 77: 370-375.
- Delcour, J. A., and R. C. Hoseney. 2010. *Principles of Cereal Science and Technology* (3rd). AACC International Inc. Minnesota. 260 p.
- Duizer, L. 2004. Sound input techniques for measuring texture. *In: Kilcast, D. (ed). Texture in Food*. Woodhead Publishing, Cambridge, U.K. pp: 146-166.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 1999. Norma Oficial Mexicana (NOM) 147-SSA1. 1996. "Bienes y servicios. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales". México, D.F. pp: 3.
- Gan, Z., P. R. Ellis, and J. D. Schofield. 1995. Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *J. Cereal. Sci.* 21: 215-230.
- Ghotra, B. S., S. D. Dyal, and S. S. Narine. 2002. Lipid shortenings: a review. *Food Res. Int.* 35: 1015-1048.
- Hemalatha, S., and Ghafoorunissa. 2004 Lignans and tocopherols in Indian sesame cultivars. *JAOCs.* 81: 467-470.
- Jacob, J., and K. Leelovath. 2007. Effect of fat-type on cookie dough and cookie quality. *J. Food Eng.* 79: 299-305.
- Luyten, H., J. Plijter, and T. van Vliet. 2004. Crisp/Crunchy crusts of cellular foods: a literature review with discussion. *J. Texture Stud.* 35: 445-492.
- Mallikarjunan, P. 2004. Understanding and measuring consumer perceptions of crispness. *In: Kilcast, D. (ed). Texture in Food. Vol 2: Solid foods*. Woodhead, Cambridge. pp: 200-210.
- Mamat, H., and S. E. Hill. 2014. Effect of fat types on the structural and textural properties of dough and semi-sweet biscuit. *J. Food Sci. Technol.* 51: 1998-2005.
- Mondragón-Chaparro, M., L. A. Bello-Pérez, E. Agama-Acevedo, D. Betancur-Ancona, and J-L. Peña. 2004. Effect of cooking time, steeping and lime concentration on starch gelatinization of corn during nixtamalization. *Starch* 56: 248-253
- Mousia, Z., G. M. Campbell, S. S. Pandlrella, and C. Webb. 2007. Effect of fat level, mixing pressure and temperature on dough expansion capacity during proving. *J. Cereal. Sci.* 46: 139-147.
- Noor-Aziah, A. A., and C. Komathi. 2009. Physicochemical and functional properties of peeled and unpeeled pumpkin flour. *J. Food. Eng.* 74: 328-333.
- Pedreschi, F., and P. Moyano. 2005. Oil uptake and texture development in fried potato slices. *J. Food. Eng.* 70: 557-563.
- Saeleaw, M., and G. Schleining. 2011. Effect of frying parameters on crispiness and sound emission of cassava crackers. *J. Food. Eng.* 103: 229-236.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017. *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*. SAGARPA, Ciudad de México. pp: 8-28.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. *Acciones y Programas; Producción Agrícola*. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do (Consulta: abril 2019).
- Sharma, A. 2018. *Understanding Color Management*. 2nd edition. John Miley & Sons Ltd. New York, USA. 305 p.
- Sroan, B. S, and F. MacRitchie. 2009. Mechanism of gas cell stabilization in breadmaking. The secondary liquid lamellae. *J. Cereal. Sci.* 49: 41-46.
- Statistica. Statsoft - Statistica ver. 7.0. Disponible para descarga a partir de un servidor informático ajeno a statsoft Ltd. <https://statistica.software.informer.com/7.0/> (Consulta: noviembre 2019).
- Statistica. TIBCO-Statistica ver. 13.0 <http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features> (Consulta: noviembre 2019).
- Sudha, M. L., R. Vetrmani, and K. Leelavathi. 2007. Influence of fiber from different cereals on the rheological characteristics of wheat flour dough and biscuit quality. *Food Chem.* 100: 1365-1370.
- Thanatukorn, P., K. Kajiwara, and T. Suzuki. 2007. Characterization of deep-fat frying in a wheat flour-water mixture model using a state diagram. *J. Sci. Food Agric.* 87: 2648-2656.
- Vaca-García, V. M., C. G. Martínez-Rueda, Ma. D. Mariezcurrena-Berasain, and A. Dominguez-Lopez. 2011. Functional properties of tortillas with triticale flour as a partial substitute of nixtamalized corn flour. *J. Food Sci. Technol.* 44: 1383-1387.
- van Vliet, T., J. E. Visser, and H. Luyten. 2007. On the mechanism by which oil uptake decreases crispy/crunchy behavior of fried products. *Food Res. Int.* 40: 1122-1128.
- Watanabe, A., K. Yokomizo, and A. Eliasson. 2003. Effect of physical states of nonpolar lipids on rheology, ultracentrifugation, and microstructure of wheat flour dough. *Cereal Chem.* 80: 281-284.
- Yoshida, H., M. Tanaka, Y. Tomiyama, and Y. Mizushima. 2007. Regional distribution in the fatty acids of triacylglycerols and phospholipids of sesame seeds (*Sesamum indicum*). *J. Food Lipids* 14:189-201.

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE MIEL DE ABEJA SIN AGUIJÓN (*Scaptotrigona mexicana*) EN LA CONSERVACIÓN DE CARNE DE POLLO

EFFECT OF THE ADDITION OF STINGLESS BEE HONEY (*Scaptotrigona mexicana*) ON CHICKEN MEAT CONSERVATION

Ricardo **Nepomuceno-Irene**¹, Aleida S. **Hernández-Cázares**^{1*}, Ma. de los Ángeles **Vivar-Vera**², Juan Valente **Hidalgo-Contreras**¹,
Adriana **Contreras-Oliva**¹, Natalia **Real-Luna**¹, Juan Antonio **Pérez-Sato**¹, Joel **Velasco-Velasco**¹

¹Campus Córdoba. Colegio de Postgraduados. 94946. Amatlán de los Reyes Veracruz. (nepomuceno.ricardo@colpos.mx), (aleyse@colpos.mx), (jvhidalgo@colpos.mx), (adricon@colpos.mx), (nreal@colpos.mx), (pantonio@colpos.mx), (joel42ts@colpos.mx). ²Instituto Tecnológico de Tuxtepec, Oaxaca. Avenida Dr. Víctor Bravo Ahuja s/n. Colonia 5 de mayo. Tuxtepec, Oaxaca. 68350. (angelesvivar@hotmail.com)

RESUMEN

La oxidación lipídica y proteica genera pérdida del valor nutricional y disminución de la calidad total de la carne. En este estudio se analizó el efecto de la adición de miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*) sobre la calidad y conservación de pechuga de pollo, triturada y cocinada, durante su almacenamiento en refrigeración. La carne fresca triturada se adicionó con 1, 3 y 5% de miel, y como testigo se utilizó carne sin adición de miel. La carne con y sin miel se cocinó y se evaluó a los 0, 3, 6, 9 y 12 d de almacenamiento a 4 °C. Un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial (4x5) se utilizó para el análisis de los datos. Al término de cada periodo de almacenamiento, se evaluó el rendimiento por cocción (RC), el pH, la acidez, la actividad de agua (a_w), la humedad, el color, el perfil de textura (TPA), la oxidación lipídica (TBARS) y la oxidación proteica (DNPH). La adición de miel mantuvo la calidad de la pechuga de pollo durante los 12 d de almacenamiento en refrigeración, las variables fisicoquímicas de dureza, pH y color no mostraron diferencias significativas. La adición de miel incrementó el rendimiento por cocción; además, la oxidación lipídica y proteica de la carne disminuyó con la adición de miel lo cual evidencia su potencial antioxidante, y la adición del 5% fue el tratamiento con los valores menores de oxidación lipídica. Por lo tanto, el tipo evaluado de miel, procedente de abejas sin aguijón, puede utilizarse como un producto funcional, natural y alternativo para sustituir antioxidantes sintéticos en carne de pollo y sus productos derivados.

Palabras clave: miel, abeja sin aguijón, *Scaptotrigona mexicana*, oxidación proteica, oxidación lipídica, antioxidante cárnico.

ABSTRACT

Lipid and protein oxidation generates losses in the nutritional value and a reduction in total quality of meat. This study analyzed the effect of the addition of honey from stingless bees (*Scaptotrigona mexicana*) on the quality and conservation of ground and cooked chicken breast, during refrigeration storage. To fresh ground meat it was added 1, 3 and 5% honey, and meat without honey was used as a control. Meat with and without honey was cooked and evaluated after 0, 3, 6, 9 and 12 d of storage at 4 °C. A completely randomized design with a factorial arrangement of (4x5) was used for the analysis of data. At the end of each storage period, cooking performance (RC), pH, acidity, water activity (a_w), moisture, color, texture profile (TPA), lipid oxidation (TBARS) and protein oxidation (DNPH) were evaluated. The addition of honey maintained the quality of the chicken breast for the 12 d of refrigeration storage, the physiochemical variables, as hardness, pH and color showed no significant differences. The addition of honey increased the cooking performance. Additionally, lipid and protein oxidation decreased by the honey effect, thus showing antioxidant potential; the addition of 5% was the treatment with the lowest lipid oxidation. Therefore, evaluated type of honey (from stingless bees) may be used as a functional, natural and alternative product to substitute synthetic antioxidants in chicken meat and derived products.

Key words: honey, stingless bee, *Scaptotrigona mexicana*, protein oxidation, lipid oxidation, meat antioxidant.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 885-896. 2020.

INTRODUCCIÓN

La oxidación es uno de los principales procesos responsables de la pérdida de calidad y de la conservación en la carne y sus productos, durante almacenamiento y cocción porque se generan compuestos asociados a la rancidez que afectan olor, color y textura de la carne (Cortinas *et al.*, 2005). En presencia de oxígeno y algunos agentes pro-oxidantes, los radicales libres o especies reactivas del oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) interactúan con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de la carne, lo cual acelera los procesos de oxidación (Falowo *et al.*, 2014).

La oxidación lipídica es un proceso complejo por el cual los ácidos grasos insaturados reaccionan con el O₂ molecular a través de radicales libres y forman peróxidos u otros productos primarios de oxidación (Argyri *et al.*, 2012). Los productos de oxidación secundarios como los aldehídos, cetonas, y ésteres son responsables del deterioro mayor y del sabor rancio durante el almacenamiento congelado (Pérez-Chabela, 2007). Incluso, la carne de ave alimentada con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados es más propensa a esta oxidación (Narciso-Gaytan *et al.*, 2011).

La oxidación proteica en carne se potencia en presencia de procesos térmicos, aumenta la carbonilación y reduce la retención de agua, al disminuir la capacidad de las proteínas para una interacción química con las moléculas de agua (Xiao *et al.*, 2011). Según Silva *et al.* (2016), la cocción en la carne se relaciona principalmente con la degradación del triptófano, la formación de enlaces bisulfuro y la pérdida de textura. Además, se pierden aminoácidos esenciales como resultado de la degradación oxidativa irreversible, y las proteínas se hacen menos digeribles (Estévez, 2011; Lund *et al.*, 2011).

Los procesos de oxidación de lípidos y proteínas en carne y productos cárnicos se pueden neutralizar con compuestos antioxidantes (Karre *et al.*, 2013), pero el uso de antioxidantes sintéticos genera efectos toxicológicos potenciales (Naveena *et al.*, 2008). Por lo tanto, en la industria alimentaria se requieren soluciones naturales y efectivas que puedan reemplazar estos antioxidantes, sin un efecto negativo en la calidad del producto terminado y la percepción de los consumidores (Karre *et al.*, 2013).

Los productos apícolas, por sus propiedades curativas, antibacterianas y antioxidantes (presencia de

INTRODUCTION

Oxidation is one of the main processes responsible for the reduction in quality and conservation of meat and derived products during storage and cooking, because compounds are generated that are related to meat turning rancid, affecting odor, color and texture of meat (Cortinas *et al.*, 2005). In the presence of oxygen and some oxidizing agents, free radicals or reactive oxygen species (ROSs) and nitrogen reactive species (NRSs) interact with lipids, proteins and nucleic acids of meat, speeding up oxidation processes (Falowo *et al.*, 2014).

Lipid oxidation is a complex process in which unsaturated fatty acids react with molecular O₂ through free radicals and form peroxides or other primary oxidation products (Argyri *et al.*, 2012). Secondary oxidation products, such as aldehydes, ketones and esters are responsible for even greater deterioration and the rancid flavor during frozen storage (Pérez-Chabela, 2007). Moreover, meat from birds fed with diet rich in fatty acids is prone to this oxidation (Narciso-Gaytan *et al.*, 2011).

Protein oxidation in meat is enhanced in the presence of thermal processes, carbonylation increases and water retention decreases, since the ability of proteins to engage in a chemical interaction with water molecules is reduced (Xiao *et al.*, 2011). According to Silva *et al.* (2016), the cooking process in meat is mainly related to the degradation of tryptophan, the formation of bisulfide bonds and a loss of texture. Additionally, essential amino acids are lost as a result of irreversible oxidative degradation and proteins become less digestible (Estévez, 2011; Lund *et al.*, 2011).

The lipid and protein oxidation processes in meat and meat products can be neutralized with antioxidative compounds (Karre *et al.*, 2013), yet the use of synthetic compounds produces potential toxicological problems (Naveena *et al.*, 2008). Therefore, food industry requires natural and effective solutions to replace these antioxidants, without a negative effect on the quality of the finished product and on perception of consumers (Karre *et al.*, 2013).

Due to their healing, antibacterial and antioxidant properties (presence of polyphenols, flavonoids and phenolic acids), bee products are considered natural antioxidants (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2016). Based on this, the aim of this study

polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos) se consideran antioxidantes naturales (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2016). En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*), sobre la calidad y conservación de la carne de pechuga de pollo (*Pectoralis major*), triturada y cocinada, durante su almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de carne de pollo y miel de abeja sin aguijón

La miel de abeja sin aguijón recién cosechada y usada en el estudio se obtuvo del meliponario ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. La miel se almacenó en refrigeración 15 d a 4 °C en frascos color ámbar hasta su inclusión en la carne de pollo. La miel presentó pH 3.85, humedad 22.35%, color 76.40 mm *pfound*, 6.80 mg kg⁻¹ hidroximetilfurfural, 72.10 °Bx, una acidez total de 65.40 meq kg⁻¹, 30.40 g 100g⁻¹ azúcares reductores directos, 42.60 g 100g⁻¹ azúcares reductores totales, polifenoles totales extraíbles 111.74 mg de eq. de ácido gálico (EAG) 100g⁻¹ y una actividad antioxidante de 1130.00 µmol eq. de trolox·100 g⁻¹ de miel.

La pechuga de pollo (*P. major*) usada se obtuvo de un mismo lote de producción con una condición normal de calidad (pH = 5.70, CRA = 75.30 mL 100 g⁻¹ y L* = 52.90); se limpió para quitar la piel, impurezas y exceso de grasa, se trocó y se trituró con un cedazo de 3/8" en un molino de carne. El lote de carne triturada se dividió en cuatro tratamientos: un testigo (0% de miel) y 1, 3 y 5% de miel aplicada directamente. La miel se homogenizó a mano en la carne y de cada tratamiento se moldearon muestras en forma de hamburguesa de 100 g cada una. Las muestras se cocieron en un horno de convección (Hobart HEC-5, México), precalentado a 100°C, hasta alcanzar 72 °C de temperatura interna (Naveena *et al.*, 2008) y se enfriaron a temperatura ambiente. Luego, las muestras se colocaron en bolsas de polietileno permeable al oxígeno y se analizaron fisicoquímicamente a los 0, 3, 6, 9 y 12 d de almacenamiento a 4 °C. Al término de cada periodo de almacenamiento, se evaluó el rendimiento por cocción (RC), el pH, la acidez, la actividad de agua (a_w), la humedad, el color, el perfil de textura (TPA), la oxidación lipídica mediante el método de TBARS y la oxidación proteica mediante el método de DNPH. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Rendimiento de cocción (RC)

El RC se realizó según el método propuesto por Johnston *et al.* (2005). Cada muestra de carne con y sin miel, se pesó antes

was to evaluate the effect of adding honey from stingless bees (*Scaptotrigona mexicana*) on the quality and conservation of ground and cooked chicken (*Pectoralis major*) breast meat, during refrigeration storage at 4 °C.

MATERIALS AND METHODS

Samples of chicken meat and stingless bee honey

The freshly harvested stingless bee honey used in the study was obtained from the handmade hive ("meliponary") located at Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. The honey was stored in refrigeration for 15 d at 4 °C in amber-colored jars until use on the chicken meat. The honey had a pH of 3.85, a humidity of 22.35%, a color 76.40 mm *pfound*, 6.80 mg kg⁻¹ 5-(hydroxymethyl)-furfural (HMF), 72.10 °Bx, a total acidity of 65.40 meq kg⁻¹, direct reducing sugars 30.40 g 100 g⁻¹, total reducing sugars 42.60 g 100 g⁻¹, total removable polyphenols 111.74 mg of eq. gallic acid (EAG) 100 g⁻¹ and an antioxidant activity of 1130.00 µmol eq. of trolox·100 g⁻¹ of honey.

The chicken (*P. major*) breasts used were obtained from one production lot with a standard quality condition (pH = 5.70, CRA = 75.30 mL 100 g⁻¹ and L* = 52.90); it was cleaned to remove skin, impurities and excess fat, then chopped and ground using a 3/8" sieve in a meat grinder. The batch of ground meat was divided into four treatments: a control (0% honey) and 1, 3 and 5% honey, applied directly. Honey was mixed by hand on the meat of each treatment forming patty-shaped samples 100g each, per treatment. The samples were cooked in a convection oven (Hobart HEC-5, Mexico), which was preheated at 100°C until an internal temperature of 72°C was reached (Naveena *et al.*, 2008) and they were cooled at room temperature. Samples were then placed in oxygen-permeable polyethylene bags and physiochemical analyzed after 0, 3, 6, 9 and 12 d of storage at 4°C. At the end of each storage period, the cooking performance (RC) was evaluated, along with the pH, acidity, water activity (a_w), moisture, color, texture profile (TPA), lipid oxidation using TBARS method and protein oxidation on DNPH method. All analyses were performed in triplicate.

Cooking performance (RC)

The RC was performed following the method proposed by Johnston *et al.* (2005). Each meat sample, with and without honey, was weighed before and after cooking, was calculated by difference in weight in comparison to initial weight (g) and it was expressed as a percentage.

y después de su cocción, se calculó por diferencia de peso con respecto a su peso inicial (g) y se expresó en porcentaje.

$$RC=1-\frac{\text{Peso antes de cocción} - \text{Peso después de cocción}}{\text{Peso antes de cocción}} \times 100$$

pH

El pH se midió con un potenciómetro (HANNA HI99163), para lo cual 10 g de muestra se homogenizó con 100 mL de agua bidestilada.

Acidez titulable

El análisis de acidez titulable se realizó según la metodología de AOAC (1990). Una muestra de 10 g se homogenizó con 200 mL de agua destilada, se filtró a través de una gasa y se aforó a 250 mL. Una alícuota de 25 mL se mezcló con 75 mL de agua bidestilada y se tituló con NaOH 0.1 N y como indicador se utilizó fenolftaleína. El porcentaje de ácido láctico se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{(v-vb) \times (N \text{ NaOH}) \times (\text{Meq}) \times (\text{fd})}{\text{Peso antes de la muestra}} \times 100$$

donde v: volumen de NaOH gastado; vb: volumen de NaOH gastado en el blanco; N NaOH: normalidad del hidróxido de sodio; Meq ácido láctico: miliequivalentes de ácido láctico y fd: factor de dilución.

Actividad de agua (aw)

La a_w se determinó con un medidor Pa_wKit® (Decagon Device USA) a 25 °C. Las muestras se colocaron en el contenedor del equipo y se registró la medición hasta su estabilización.

Color

El color se determinó con un colorímetro (Konica Minolta CR 400) en la escala CIELAB (L*, a* b*), se registraron los valores de L* (luminosidad), a* (- verde a + rojo) y b* (- azul a + amarillo). Las muestras se extrajeron de su envase, se expusieron a temperatura ambiente y se realizaron tres mediciones en la superficie de cada una.

Análisis de perfil de textura (TPA)

El TPA se realizó mediante el método establecido por Ganhão *et al.* (2010), con un texturómetro Shimadzu EZ-SX, a una

$$RC=1-\frac{\text{Weight before cooking} - \text{Weight after cooking}}{\text{Weight before cooking}} \times 100$$

pH

The pH value was measured using a potentiometer (HANNA HI99163), 10 g of sample was homogenized with 100 mL of double distilled water.

Titrateable acidity

The titrateable acidity analysis was carried out following the methodology by AOAC (1990). A 10 g sample was homogenized with 200 mL of distilled water, filtered using a gauze and adjusted to 250 mL. A 25 mL aliquot was mixed with 75 mL of double distilled water and titrated with NaOH 0.1 N and phenolphthalein was used as an indicator. The percentage of lactic acid was calculated using the following formula:

$$\% \text{ lactic acid} = \frac{(v-vb) \times (N \text{ NaOH}) \times (\text{Meq}) \times (\text{fd})}{\text{Sample weight}} \times 100$$

where v: volume of NaOH spent; vb: volume of NaOH spent on the target; N NaOH: sodium hydroxide normality; Meq ácido láctico: milliequivalents of lactic acid, and fd: dilution factor.

Water Activity (a_w)

The a_w was determined using a Pa_wKit® (Decagon Device, U.S.A.) gauge at 25 °C. Samples were placed on the container of the apparatus and the measurements were taken until stability.

Color

Color was determined with colorimeter (Konica Minolta CR 400) on CIELAB (L*, a* b*) scale, values L* (luminosity), a* (- green to + red) y b* (- blue to + yellow) were registered. Samples were extracted from container, exposed to ambient temperature and three measurements were recorded at the surface of each sample.

Texture profile analysis (TPA)

The TPA was carried out using the method established by Ganhão *et al.* (2010), with a Shimadzu EZ-SX texture meter at a speed of 60 mm min⁻¹. A cylindrical sample, 2.3 cm in diameter, was taken from the center of each sample using a hole puncher.

velocidad de 60 mm min⁻¹. De cada muestra se tomó un pedazo de 2.3 cm de diámetro de la parte central mediante un sacabocado.

Análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La oxidación de lípidos se midió con el método colorimétrico TBARS según Tarladgis *et al.* (1960). Una muestra de 10 g se mezcló con 15 mL de agua bidestilada a 50 °C y 5 mL de la disolución de PG-EDTA (0.5%). La mezcla se transfirió a un matraz Kjeldahl, ya rociado con un aerosol de silicona (Würth), se agregaron 77.5 mL de agua bidestilada, 2.5 mL de HCl 4 N y seis perlas de destilación. El matraz se colocó en una unidad de destilación y se recolectó 50 mL de condensado; 5 mL de este condensado se mezclaron con 5 mL de solución 2-TBA 0.02 M, la mezcla se agitó y se dejó en baño de agua a 100 °C por 35 min. Una vez atemperada la solución resultante, se midió la absorbancia a 532 nm. Como testigo se utilizó 5 mL de agua bidestilada con 5 mL de la solución 2-TBA. Los valores obtenidos se ajustaron por el factor de corrección de 7.8 y los valores de TBARS se expresaron como mg malondialdehído (MDA) kg⁻¹ de muestra.

Oxidación proteica

El análisis de la oxidación proteica por el método DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) se realizó mediante la cuantificación de carbonilos totales de acuerdo con la metodología de Oliver *et al.* (1987). Una muestra de 2 g se homogenizó en un Polytron con 20 mL de K₂HPO₄ 10Mm + NaCl 0.6 M a pH 6 durante 30 s. La mezcla se filtró en una gasa de algodón, se tomaron 2 alícuotas de 100 µL (una para cuantificar proteínas y otra para carbonilos) y se añadió 1 mL de HCl al 10%. La mezcla se centrifugó a 1800 x g durante 7 min para la precipitación de proteínas y se desechó el sobrenadante. Al tubo con el precipitado destinado para cuantificación de proteínas se adicionó 1 mL de HCl 2N y al de carbonilos se añadió una disolución de 1 mL de HCl 2 N + DNPH al 2%. Ambos tubos reposaron 1 h a temperatura ambiente agitando en un vórtex cada 15 min. Al finalizar el tiempo se añadió 1 mL de TCA 10%, con agitación y centrifugación a 1800 x g por 7 min y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1.5 mL de etil-acetato (1:1) hasta desaparecer el color amarillo, cada precipitado se evaporó a sequedad en una campana de extracción de gases y se resuspendió con 1.5 mL de una disolución de GndCl al 6M + K₂HPO₄ al 20 mM. La concentración de proteína se determinó a 280 nm y se usó BSA como blanco. El contenido de carbonilos se determinó a 370 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar para las hidrazonas de 21.0 mM cm⁻¹. Los resultados se expresaron en nmol de carbonilos mg⁻¹ de proteína.

Analysis of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Lipid oxidation was measured using the colorimetric TBARS method, following Tarladgis *et al.* (1960). A 10 g sample was mixed with 15 mL of double distilled water at 50 °C and 5 mL of the PG-EDTA solution (0.5%). The mixture was transferred into a Kjeldahl beaker, previously sprayed with a silicon aerosol (Würth); 77.5 mL of double distilled water were added, along with, 2.5 mL of HCl 4 N and six distillation beads. The beaker was placed in a distillation unit, and 50 mL of condensate were gathered; 5 mL of this condensate were mixed with 5 mL of 2-TBA 0.02 M solution, the mixture was stirred and left in a water bath at 100 °C for 35 min. Once the resulting solution temperature was mild, absorbance was measured at 532 nm. As a control, 5 mL of double distilled water with 5 mL of the 2-TBA solution were used. The values obtained were adjusted with a 7.8 correction factor and TBARS values were expressed as mg malondialdehyde (MDA) kg⁻¹ of sample.

Protein oxidation

The analysis of protein oxidation using the DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) method was carried out by quantifying the total carbonyls, following the method by Oliver *et al.* (1987). One 2 g sample homogenized in a Polytron with 20 mL of K₂HPO₄ 10Mm + NaCl 0.6 M at a pH 6 for 30 s. The mixture was filtered using a cotton gauze, two 100 µL aliquots were taken (one to quantify proteins and another for carbonyls) and 1 mL of 10 % HCl was added. The mixture was centrifuged at 1800 x g for 7 min for protein precipitation, and the supernatant was discarded. In the tube with the precipitate to be used for the quantification of proteins, we added 1 mL of HCl 2N, and in the one with carbonyls, a solution of 1 mL of HCl 2 N + 2% DNPH was added. Both tubes stood at room temperature, stirring in a vortex every 15 min. Afterwards, 1 mL of 10% TCA was added, stirred and centrifuged at 1800 x g for 7 min and the supernatant was discarded. The precipitate was washed with 1.5 mL of ethyl acetate (1:1) until the yellow color vanished; each precipitate was evaporated until dried in a gas extraction chamber and resuspended with 1.5 mL of a GndCl solution at 6M + K₂HPO₄ at 20 mM. Protein concentration was determined at 280 nm and BSA was used as a target. Carbonyl content was determined at 370 nm and the molar extinction coefficient was used for the 21.0 mM cm⁻¹ hydra zones. Results were expressed in nmol of carbonyls mg⁻¹ of protein.

Statistical analysis

Experiment was set as a completely randomized design, with a factorial arrangement of A x B as treatments; factor A

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, con un arreglo factorial A x B en los tratamientos; el factor A fue el porcentaje de adición de miel de abeja sin aguijón con cuatro niveles (0, 1, 3 y 5%), y el factor B fue el tiempo de almacenamiento con cinco niveles (0, 3, 6, 9 y 12 d). Los datos fisicoquímicos se analizaron con ANDEVA (GLIMMIX SAS 9.4). La comparación múltiple de medias se realizó con la prueba HSD ($p \leq 0.05$). Todos los datos se presentan como las medias \pm error estándar. Para las variables respuesta de oxidación lipídica y proteica se realizó un análisis de regresión lineal múltiple (PROC REG) con las variables independientes concentración de miel y tiempo de almacenamiento en refrigeración con SAS 9.4 (SAS Institute, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento en cocción (RC)

El RC fue directamente proporcional al porcentaje de miel; con la adición del 5% el rendimiento fue mayor (13.59%) respecto al testigo (0%), aspecto tecnológicamente favorable (Cuadro 1). Johnston *et al.*

was the percentage of addition of stingless bee honey with four levels (0, 1, 3 and 5%) and factor B was the time of storage with five levels (0, 3, 6, 9 and 12 d). The physicochemical data were analyzed using an ANOVA (GLIMMIX SAS 9.4). The multiple comparison of means was carried out using the HSD test ($p \leq 0.05$). All the data are presented as the means \pm standard error. For the lipid and protein oxidation response variables, a multiple lineal regression analysis (PROC REG) was carried out, with honey concentration and time in refrigeration storage as independent variables in SAS 9.4 (SAS Institute, 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

Cooking performance (RC)

The RC was directly proportional to the percentage of honey; with the addition of 5%, performance was higher (13.59%) than the control (0%), a technologically favorable side (Table 1). Johnston *et al.* (2005) reported similar performances at cooking of beef samples with an addition of 10% bee honey (*Apis mellifera*). This is a product highly hygroscopic, due to great content of sugars (Machado *et al.*, 2017)

Cuadro 1. Valores medios observados en variables fisicoquímicas de pechuga de pollo, adicionada con diferentes concentraciones de miel de abeja sin aguijón (*S. mexicana*) y diferentes tiempos de refrigeración.

Table 1. Mean values observed in physicochemical variables in chicken breast, with different added concentrations of stingless bee honey (*S. mexicana*) and different refrigeration storage times.

Variable respuesta	Nivel de inclusión de miel (%)				Trat	p \leq 0.05	
	0	1	3	5		Tiempo	Trat*tiempo
RC	73.72 \pm 2.20a	75.90 \pm 5.13a	80.47 \pm 4.97ab	87.31 \pm 3.67b			
pH	6.28 \pm 0.02a	6.28 \pm 0.02a	6.26 \pm 0.02a	6.24 \pm 0.02a	0.456	0.406	1.000
Acidez	0.48 \pm 0.02b	0.54 \pm 0.02ab	0.56 \pm 0.02ab	0.57 \pm 0.02a	0.035	0.014	0.995
a _w	0.951 \pm 0.003b	0.959 \pm 0.003ab	0.963 \pm 0.003a	0.969 \pm 0.003a	0.001	0.038	0.883
Dureza	69.04 \pm 4.36a	73.51 \pm 4.16a	70.68 \pm 4.16a	80.29 \pm 4.16a	0.2595	0.896	1.000
L*	76.99 \pm 0.38a	77.55 \pm 0.38a	77.13 \pm 0.38a	77.10 \pm 0.38a	0.7372	0.003	0.990
a*	3.83 \pm 0.20a	3.29 \pm 0.20ab	2.55 \pm 0.20bc	2.13 \pm 0.20c	< 0.0001	0.004	0.866
b*	36.24 \pm 1.18a	35.26 \pm 1.18a	35.34 \pm 1.18a	33.51 \pm 1.18a	0.4323	0.1543	0.990
Oxidación lipídica	1.49 \pm 0.018a	1.20 \pm 0.018b	0.93 \pm 0.018c	0.89 \pm 0.018c	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Oxidación proteica	4.05 \pm 0.063a	4.25 \pm 0.066a	4.26 \pm 0.066a	3.40 \pm 0.063b	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Medias con letra distinta en hilera indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$); Trat, Tiempo y Trat x Tiempo (interacción tratamiento con tiempo de almacenamiento) con $p \leq 0.05$: representan efecto significativo sobre las variables analizadas; RC: Rendimiento por cocción, medición única después del proceso de cocción, no se evaluó en el tiempo, expresada en %. Acidez en % ácido láctico. Dureza en Newton, N. Oxidación lipídica en mg MDA kg⁻¹ de carne cocida y Oxidación proteica en nmol de carbonilos por mg⁻¹ proteína. ❖ x

x
x
x
x

(2005) reportaron rendimientos similares de cocción en muestras de carne de res adicionadas con 10% miel de abeja (*Apis mellifera*). La miel es un producto con higroscopía alta debido al contenido elevado de azúcares (Machado *et al.*, 2017) y esta propiedad se asocia con la conservación de la integridad de las membranas de las fibras musculares en el proceso de cocción (EL-Kalyoubi, *et al.*, 2014), lo cual reduce la pérdida de humedad y explica rendimientos mayores después de la cocción.

pH y acidez titulable

El pH no mostró diferencias ($p=0.456$) entre los tratamientos, ni durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración. En cambio, en la acidez se encontró diferencia ($p=0.035$) entre las muestras testigo y las adicionadas con miel al 5%, con un aumento de 0.9% de ácido láctico (Cuadro 1). La miel de *S. mexicana*, se caracteriza por tener bajo pH y alta acidez, debido al contenido de ácidos orgánicos en la miel (Jiménez *et al.*, 2016), por lo cual el aumento en la acidez de las muestras se puede atribuir a las características propias de la miel.

Actividad de agua (a_w)

La adición de miel en la pechuga de pollo tuvo influencia significativa ($p=0.0009$) en la a_w ; en los tratamientos con 1 y 3% de miel aumentó 0.01 y 0.02 con 5%, comparada con el testigo $a_w = 0.951$ (Cuadro 1). Johnston *et al.* (2005) reportaron resultados similares, con una a_w en intervalo de 0.94 - 0.96 en carne de res adicionada con 5, 10 y 15% de miel de *A. mellifera*; de manera similar, no encontraron diferencias ($p>0.05$) entre los tratamientos durante 12 d de almacenamiento.

Dado que la a_w es la cantidad de agua disponible para los microorganismos, podría sugerirse que las muestras adicionadas con miel son más susceptibles a la descomposición por microorganismos. Sin embargo, la miel de abeja tiene efecto antimicrobiano debido a la acidez, la conversión de la glucosa en peróxido de hidrógeno, la presión osmótica producida por la concentración alta de azúcares, así como la presencia de ácidos fenólicos, terpenos, alcohol bencílico y sustancias volátiles (Machado *et al.*, 2017). A pesar de que en este estudio dicho efecto no se analizó, se espera que la adición de la miel de *S. mexicana* tenga una influencia positiva en la calidad y vida útil del producto.

and this property is related to the conservation of the integrity in membranes of the muscle fibers at the cooking process (EL-Kalyoubi, *et al.*, 2014), which reduces humidity losses that accounts for higher yields after cooking.

pH and titratable acidity

There were no differences ($p=0.456$) on pH among treatments or in the time of refrigeration storage. However, there was difference ($p=0.035$) between acidity in control samples and those with 5% added honey, with an increase of 0.9% of lactic acid (Table 1). The honey from *S. mexicana* is characterized by a low pH and a high acidity, due to the amount of fatty acids in honey (Jiménez *et al.*, 2016), and therefore the increase in the acidity of the samples can be attributed to honey intrinsic features.

Water Activity (a_w)

The addition of honey on the chicken breasts had a significant influence ($p=0.0009$) on the a_w ; in the treatments with 1 and 3% honey, it increased 0.01 and 0.02 with 5%, in comparison with the control $a_w = 0.951$ (Table 1). Johnston *et al.* (2005) reported similar results, with an a_w in an interval of 0.94 - 0.96 in beef with 5, 10 and 15% added *A. mellifera* honey; similarly, no differences were found ($p>0.05$) among the treatments for the 12 h of storage.

Given that a_w is the amount of water available for the microorganisms, it could be suggested that the samples with added honey are more susceptible to decomposition by microorganisms. However, bee honey has an antimicrobial effect due to its acidity, glucose conversion into hydrogen peroxide, and osmotic pressure produced by the high concentration of sugars, as well as contents of phenolic acids, terpenes, benzyl alcohol and volatile substances (Machado *et al.*, 2017). Despite such effects were not analyzed in this study, the *S. mexicana* was expected to have a positive influence on the quality and shelf life of the product.

The color in the samples with added honey showed no difference ($p=0.737$) in L^* between treatments. In index a^* there was a significant effect ($p\leq 0.0001$) of the treatments and time of storage; 3 and 5% honey showed lower values (2.55 and 2.13, respectively). Index b^* remained stable for the 12 d of refrigeration storage (Table 1).

El color en las muestras adicionadas con miel no mostró diferencia ($p = 0.737$) en L^* entre tratamientos. En el índice a^* hubo efecto significativo ($p \leq 0.0001$) de los tratamientos y del tiempo de almacenamiento; 3 y 5% de miel tuvieron un valor menor (2.55 y 2.13, respectivamente). El índice b^* permaneció estable durante los 12 d de almacenamiento en refrigeración (Cuadro 1).

La coloración de la carne se atribuye al proceso de cocción, y los lípidos actúan como agentes de transferencia de calor que reaccionan con los componentes de proteínas y carbohidratos de los alimentos, y generan un color marrón (Sikorski, 2006). Ávila *et al.* (2013) mencionan que la oxidación de los ácidos grasos afecta el color de la carne y los productos cárnicos. Por tanto, valores bajos en a^* en las muestras adicionadas con 3 y 5% de miel se relacionan con el proceso de cocción y también con una actividad menor en la oxidación lipídica; es decir, al efecto antioxidante de la miel de *S. mexicana*.

EL-Kalyoubi *et al.* (2014) registraron un aumento en la luminosidad en 3 a 4 unidades y una tonalidad más oscura a la carne de pollo cocida, comparada con el testigo durante 14 d de almacenamiento en carne de pollo adicionada con miel de *A. mellifera* (10, 15 y 20%). De manera similar, Alabdulkarim *et al.* (2012), encontraron una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en el color en muestras de carne de pollo adicionadas con miel de *A. mellifera* al 5 y 10% durante su almacenamiento por 60 d.

La dureza expresada como la fuerza máxima necesaria para comprimir la muestra, se observó con un incremento ligero en las muestras adicionadas con miel, pero estas diferencias no fueron significativas ($p = 0.259$) respecto al control (Cuadro 1). Otras variables del perfil de textura (TPA) tampoco mostraron diferencias ($p \geq 0.05$) por efecto de la adición de miel durante el almacenamiento en refrigeración a 4 °C

Oxidación lipídica

Los procesos de oxidación en la carne generan una pérdida del valor nutricional y disminución de la calidad total. Los resultados indicaron que la oxidación lipídica se produjo desde el inicio (0 d) debido principalmente a la exposición de las muestras al oxígeno. La tendencia de la oxidación lipídica en los diferentes tratamientos fue directamente proporcional

The color of the meat is due to the cooking process, and lipids act as heat-transfer agents that react with the food's protein and carbohydrate components, producing a brownish color (Sikorski, 2006). Ávila *et al.* (2013) mention that fatty acids oxidation affects the color of raw meat and meat products. Therefore, low a^* values in the samples with 3 and 5% added honey are related with the cooking process and with a lower activity in lipid oxidation; that is, with the antioxidant effect of *S. mexicana* honey.

EL-Kalyoubi *et al.* (2014) registered an increase of 3 to 4 units in the luminosity and a darker tone in the cooked chicken meat, in comparison with the control, during 14 h of storage of chicken meat with added *A. mellifera* honey (10, 15 and 20%). Similarly, Alabdulkarim *et al.* (2012) found a significant reduction ($p \leq 0.05$) in the color of chicken meat samples with added *A. mellifera* honey at 5 and 10% during a 60 d storage period.

Hardness, expressed as the maximum force needed to compress the sample, was observed with a slight increase in the samples with added honey, although these differences were not significant ($p = 0.259$) compared to control (Table 1). Other texture profile variables (TPA) showed no differences ($p \geq 0.05$) due to the effect of added honey during refrigeration storage at 4 °C.

Means with different letters per row indicate statistical differences ($p \leq 0.05$); Treat, Time and Treat x Time (interaction of treatment and time of storage) at $p \leq 0.05$: represent significant effect on analyzed variables; RC: Cooking performance (%), single measured after the cooking process, it was not evaluated through time. Acidity, % lactic acid. Hardness in Newtons, N. Lipid oxidation in mg MDA kg^{-1} of cooked meat and Protein oxidation in nmol de carbonyls per mg^{-1} protein.

Lipid oxidation

The oxidation processes in the meat lead to a loss in the nutritional value and a reduction in total quality. Results indicated that lipid oxidation was produced from the beginning (0 d), due mainly to oxygen exposure. Lipid oxidation trend in different treatments was directly proportional to refrigeration storage time. TBARS production was lower in meat added with 5% honey (Figure 1a), with a determination coefficient of 78.28%; which resulted

al tiempo de almacenamiento en frío. La producción de TBARS fue menor en la carne adicionada con 5% de miel (Figura 1a), con coeficiente de determinación del 78.28%; lo cual dio como resultado una producción

in an overall lower production of TBARS during 12 d of storage (55.73% less lipid oxidation). This means greater antioxidant ability during storage at 4 °C (Table 1).

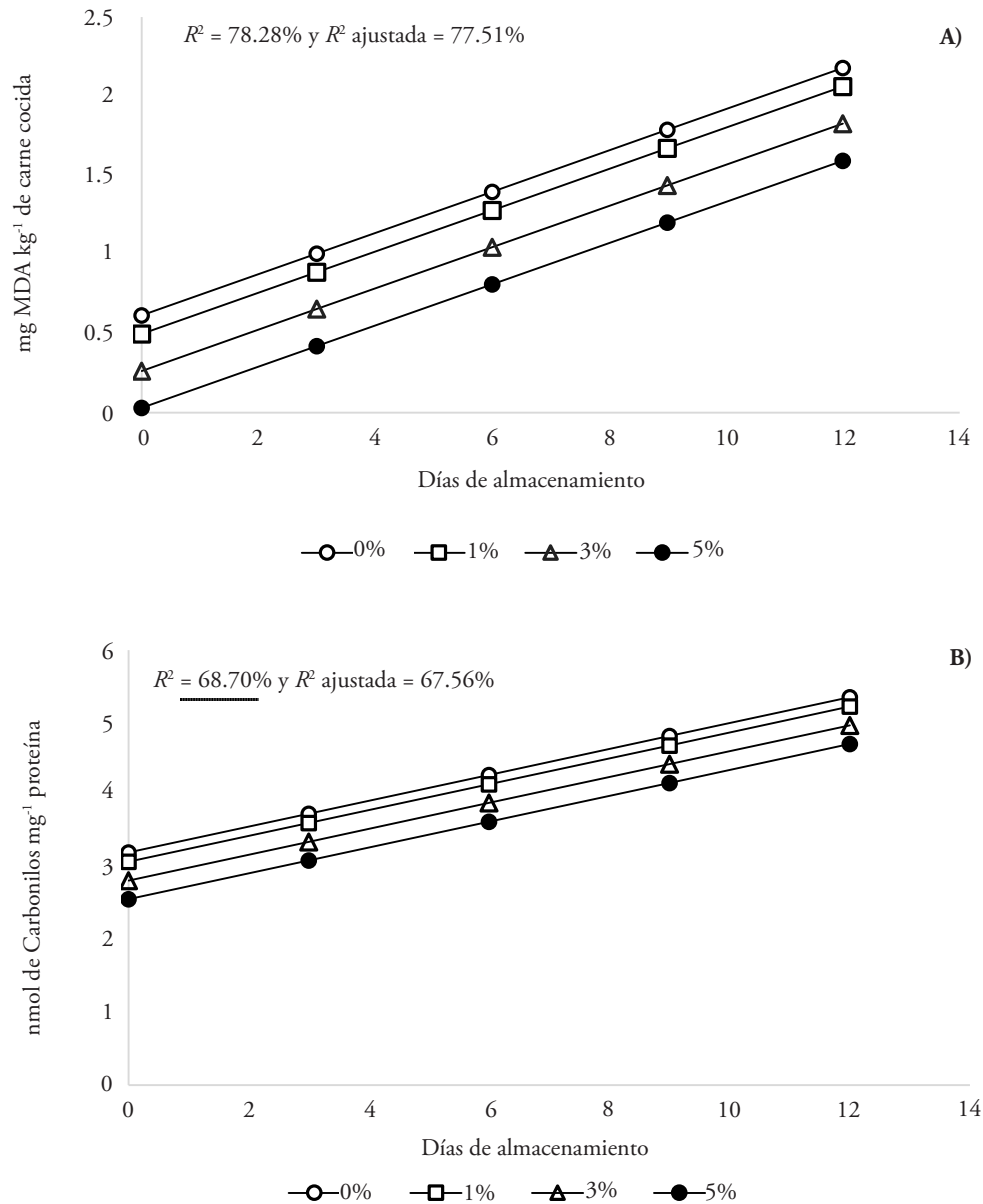


Figura 1. Evolución de la oxidación lipídica (A) y proteica (B) en pechuga de pollo (*Pectoralis major*), adicionada con cuatro concentraciones de miel de *S. mexicana* (0, 1, 3 y 5%) y cuatro periodos de tiempo de almacenamiento a 4 °C (0, 3, 6, 9 y 12 d). Análisis de regresión lineal múltiple: oxidación lipídica = $0.6149 - 0.1171X_1 + 0.13024X_2$ y oxidación proteica = $3.21 - 0.1292X_1 + 0.1785X_2$.

Figure 1. Trend in lipid (a) and protein oxidations (b) in chicken (*Pectoralis major*) breast, with four added concentrations of *S. mexicana* honey (0, 1, 3 y 5%) at four time periods of storage at 4 °C (0, 3, 6, 9 y 12 d). Multiple linear regression models: lipid oxidation = $0.6149 - 0.1171X_1 + 0.13024X_2$ y protein oxidation = $3.21 - 0.1292X_1 + 0.1785X_2$.

de TBARS menor durante los 12 d de almacenamiento (55.73% menos de oxidación lipídica). Esto significa una capacidad antioxidante mayor durante el almacenamiento a 4 °C (Cuadro 1).

La oxidación lipídica se atribuye a la interacción del oxígeno, la luz y la cocción como agentes prooxidantes, con los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la carne durante la refrigeración (Ahn *et al.*, 1993). Sárraga *et al.* (2002) indicaron que el daño oxidativo es mayor en carne cocida durante el almacenamiento en refrigeración por la liberación del hierro endógeno, hemoglobina, mioglobina, ferritina y hemosiderina que forman quelatos con aminoácidos, nucleótidos y fosfatos, lo que induce la oxidación de lípidos. La oxidación lipídica se afecta por valores bajos en pH y contenidos de agua bajos, lo cual potencializa la capacidad de los metales y las proteínas de las hemoproteínas para oxidar los lípidos (Gong *et al.*, 2010). Sin embargo, esto no es aplicable en nuestro estudio porque el pH permaneció estable y la a_w aumentó con la adición de la miel, al igual que el RC. Por lo tanto, la reducción de la oxidación lipídica se puede atribuir al efecto de los compuestos antioxidantes presentes en la miel de *S. mexicana* (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2016).

De acuerdo con los resultados en este estudio, Sampaio *et al.* (2012) documentaron una disminución en la oxidación lipídica en carne de pollo cocida y adicionada con una mezcla de 5% de miel, orégano y salvia. EL-Kalyoubi *et al.* (2014) encontraron que la inclusión de miel de *A. mellifera* al 20% en carne de pollo presentó valores de TBARS bajos durante 14 d de almacenamiento. Asimismo, Johnston *et al.* (2005) observaron una disminución de oxidación lipídica en hamburguesas de carne de res adicionada con miel de *A. mellifera* al 5, 10 y 15%.

Oxidación proteica

La oxidación proteica de las muestras de pechuga de pollo adicionada con miel, mostró una tendencia directamente proporcional al periodo de almacenamiento. En el testigo (0%) se observó un contenido de carbonilos mayor por mg de proteína, desde el inicio hasta el final del almacenamiento. Mientras que en las muestras adicionadas con miel la oxidación proteica fue menor y con un coeficiente de determinación de 68.70% (Figura 1b). Con 5% de miel se obtuvo 40% menos oxidación (2.33 nmol de

Lipid oxidation is attributed to the interaction of oxygen, light and cooking as oxidizing agents, with polyunsaturated fats present in the meat during refrigeration (Ahn *et al.*, 1993). Sárraga *et al.* (2002) indicated that oxidative damage is greater in cooked meat during refrigeration storage due to endogenous iron release, hemoglobin, myoglobin, ferritin and hemosiderin, forming chelates with amino-acids, nucleotides and phosphates, and inducing lipid oxidation. Lipid oxidation is affected by low pH values and low water contents, which boosts the ability of the metals and hemoproteins to oxidize lipids (Gong *et al.*, 2010). However, this does not apply to our study because the pH remained stable and a_w increased with the addition of honey, like RC. Therefore, the decrease in lipid oxidation can be attributed to the effect of the antioxidant compounds present in *S. mexicana* honey (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2016).

According to the results in this study, Sampaio *et al.* (2012) reported decrease in lipid oxidation in cooked chicken meat with an added mixture of 5% honey, oregano and sage. EL-Kalyoubi *et al.* (2014) found that addition of *A. mellifera* honey at 20% in chicken meat allowed lower TBARS values during 14 d at storage. Likewise, Johnston *et al.* (2005) observed a decrease in the lipid oxidation of beef hamburger patties with added *A. mellifera* honey at 5, 10 and 15%.

Protein oxidation

The protein oxidation of the chicken breast samples with added honey displayed a trend proportionally direct to storage period. In the control (0%), a higher content of carbonyls per mg of protein was observed from the beginning to the end of the storage period, whereas in the samples with added honey, protein oxidation was lower and with a 68.70% determination coefficient (Figure 1b). With 5% honey, 40% less oxidation (2.33 nmol of carbonyls mg^{-1} protein) than the control was obtained after 12 h of storage (Table 1).

The presence of carbonyl groups found in proteins is used as a marker of protein oxidation. Reactive to oxygen species trigger the oxidation of amino-acids residues from lateral chains, protein-protein bonds formation, and the oxidation of protein skeleton, resulting in protein fragmentation

carbonilos mg^{-1} proteína) que el testigo, después de 12 d de almacenamiento (Cuadro 1).

La presencia de grupos carbonilos en las proteínas se utiliza como marcador de la oxidación proteica. Las especies reactivas al oxígeno desencadenan la oxidación de residuos de aminoácidos de las cadenas laterales, la formación de uniones proteína-proteína y la oxidación del esqueleto de la proteína, lo cual da como resultado la fragmentación de proteínas (Berlett y Stadtman, 1997). Estévez y Cava (2004) mencionaron que el almacenamiento en refrigeración conduce a una carbonilación mayor de proteínas por la relación con el grado de oxidación lipídica y el aumento del hierro endógeno. Todo lo cual afecta la funcionalidad y solubilidad de la proteína, y causa un aumento en la pérdida de agua, geles proteicos más débiles o emulsiones menos estables. Estas modificaciones tienen un efecto negativo en la calidad de la carne en términos de textura, ternura y color (Ventanas *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio mostraron que la adición de miel *S. mexicana* (5%), aumentó RC y a_w , y retrasó la oxidación proteica en comparación con las muestras de carne sin miel.

CONCLUSIONES

La inclusión de miel de abeja sin aguijón (*S. mexicana*) permitió la conservación de la pechuga de pollo triturada y cocinada durante su almacenamiento en refrigeración hasta por 12 d. La dureza, el pH y el color no mostraron efectos con la adición de miel, estas variables de calidad se mantuvieron estables durante el almacenamiento.

La calidad tecnológica de la carne mejoró y disminuyeron las pérdidas de peso por efecto de la cocción. La oxidación, lipídica y proteica, de la carne fue directamente proporcional al tiempo de almacenamiento en refrigeración. Pero la adición de este tipo de miel causó una disminución significativa en dicha oxidación conforme aumentó el porcentaje añadido.

La miel de abeja sin aguijón se presenta entonces como un producto funcional, natural y alternativo para la conservación de la calidad de la carne, sobre todo como sustituto de antioxidantes sintéticos.

LITERATURA CITADA

Ahn, D. U., F. H. Wolfe, and J. S. Sim. 1993. Prevention of lipid oxidation in precooked turkey meat patties with hot

(Berlett and Stadtman, 1997). Estévez and Cava (2004) mentioned that refrigeration storage leads to a greater protein carbonylation, due to the relationship with lipid oxidation degree and with the increase of endogenous iron. Therefore, the functionality and the solubility of the protein is affected, causing an increase in water loss, weaker protein gels or less stable emulsions. Such modifications have a negative effect on meat quality in terms of texture, softness and color (Ventanas *et al.*, 2006). However, results in our study showed that adding *S. mexicana* honey (5%) increased RC and a_w and delayed protein oxidation compared to meat samples without honey.

CONCLUSIONS

The addition of honey from stingless bees (*S. mexicana*) helped preserve ground and cooked chicken breast during refrigeration storage for up to 12 d. The hardness, pH and color showed no effects with the addition of honey, and these variables remained stable during storage.

The technological quality of the meat increased, and weight losses caused by the cooking decreased. Lipid and protein oxidation in the meat were directly proportional to the time of refrigeration storage. However, the addition of this type of honey caused a significant reduction in these oxidations as the percentage added increased.

The honey from stingless bees is therefore presented as a functional, natural and alternative product for meat quality conservation, particularly as a substitute for synthetic antioxidants.

—End of the English version—

-----*-----

packaging and antioxidant combinations. *J. Food Sci.* 58: 283-287.

Alabdulkarim, B., Z. A. N. Bakeet, and S. Arzoo. 2012. Effect of frying oils on quality characteristics of frozen chicken patties incorporated with honey. *Afr. J. Biotechnol.* 11: 2985-2992.

AOAC. 1990. Acidez titulable. 947.05. In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist (AOAC)*. 15th, Edición. Washington DC.

Argyri, A. A., E. Z. Panagou, and G. J. Nychas. 2012. Advances in vacuum and modified atmosphere packaging of poultry products. *Adv. Meat Poult. Seaf. Packag.* pp. 205-247.

- Alvarez-Suarez, J. M., F. Giampieri, A. Brenciani, L. Mazzoni, M. Gasparri, A. M. González-Paramás, C. Santos-Buelga, G. Morroni, S. Simoni, T. Y. Forbes-Hernández, S. Afrin, E. Giovanetti, and M. Battino. 2018. *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* cuban polyfloral honeys: a comparison based on their physicochemical parameters, chemical, composition and biological properties. *LWT – Food Sci. and Tech.* 87: 272-279.
- Ávila, R., F. A. Pro-Martínez, E. Sosa-Montes, J. M. Cuca-García, C. M. Becerril-Pérez, J. L. Figueroa-Velasco, and C. Narciso-Gaytán, C. 2013. Dietary supplemented and meat-added antioxidants effect on the lipid oxidative stability of refrigerated and frozen cooked chicken meat. *Poultry Sci.* 92: 243-249.
- Berlett, B. S., and E. R. Stadtman. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316.
- Cortinas, L., A. Barroeta, C. Villaverde, J. Galobart, F. Guardiola, and M. D. Baucells. 2005. Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. *Poultry Sci.* 84: 48:55.
- El-Kalyoubi, M. H., M. M. Khalaf, A. S. Nadir, M. A. Wafaa, and M. E. Mansour. 2014. Bee honey effect against microbial and oxidation in chicken slices. *Middle East J. Appl. Sci.* 4: 884-893.
- Estévez, M. 2011. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci.* 89: 259-279.
- Estévez, M., and R. Cava. 2004. Lipid and protein oxidation, release of iron from hemo molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. *Meat Sci.* 68: 551-558.
- Falowo, A. B., P. O. Fayemi, and V. Muchenje. 2014. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* 64: 171-181.
- Ganhão, R., D. Morcuende, and M. Estévez. 2010. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Sci.* 85: 402-409.
- Gong, Y., R. S. Parker, and M. P. Richards. 2010. Factors affecting lipid oxidation in breast and thigh muscle from chicken, turkey and duck. *J. Food Biochem.* 34: 869-885.
- Jiménez, M., C. I. Beristain, E. Azuara, M. R. Mendoza, and L. A. Pascual. 2016. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *J. Apicult. Res.* 55: 151-160.
- Johnston, J. E., H. A. Sepe, C. L. Miano, R. G. Brannan, and A. L. Alderton. 2005. Honey inhibits lipid oxidation in ready-to-eat ground beef patties. *Meat Sci.* 70: 627-631.
- Karre, L., K. Lopez, and K. J. Getty. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Sci.* 94: 220-227.
- Lund, M. N., M. Heinonen, C. P. Baron, and M. Estévez. 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 83-95.
- Machado, A. A., L. Bicudo, M. T. Sancho, and A. Pascual-Mate. 2017. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J. Apicult. Res.* 57: 5-37.
- Narciso-Gaytan, C., D. Shin, A. R. Sams, J. T. Keeton, R. K. Miller, S. B. Smith, and M. X. Sánchez-Plata. 2011. Lipid oxidation stability of omega-3-and conjugated linoleic acid-enriched sous vide chicken meat. *Poultry Sci.* 90:473-480.
- Naveena, B. M., A. R. Sen, R. P. Kingsly, D. B. Singh, and N. Kondaiah. 2008. Antioxidant activity of pomegranate rind powder extract in cooked chicken patties. *Int. J. Food Sci. Tech.* 43: 1807-1812.
- Oliver, C. N., B-W Ahn, E. J. Moerman, S. Goldstein, and E. R. Stadtman. 1987. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262: 5488-5491.
- Pérez-Chabela, M. D. L. 2007. Shelf life of fresh and frozen poultry. *In: Nolle, L. M. L. (ed). Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality.* Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. pp: 467-474.
- Sampaio, G. R., T. Saldanha, R. A. M. Soares, and E. A. F. S. Torres. 2012. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. *Food Chem.* 135: 1383-1390.
- Sárraga, C., I. Carreras, and J. A. G. Regueiro. 2002. Influence of meat quality and NaCl percentage on glutathione peroxidase activity and values for acid-reactive substances of raw and dry-cured *Longissimus dorsi*. *Meat Sci.* 62: 503-507.
- SAS Institute. 2013. SAS/STAT® 12.3 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Sikorski, Z. E. 2006. Chemical and Functional Properties of Food Components. *Food Lipids.* 2a. ed. CRC press. pp: 123-140.
- Silva, F. A., V. C. Ferreira., M. S. Madruga, and M. Estévez. 2016. Effect of the cooking method (grilling, roasting, frying and sous-vide) on the oxidation of thiols, tryptophan, alkaline amino acids and protein cross-linking in jerky chicken. *J. Food Sci. Tech.* 53: 3137-3146.
- Tarladgis, B. G., B. M. Watts., M. T. Younathan, and L. Dugan. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37: 44-48.
- Ventanas, S., M. Estevez, J. F. Tejada, and J. Ruiz. 2006. Protein and lipid oxidation in *Longissimus dorsi* and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Sci.* 72: 647-655.
- Xiao, S., W. G. Zhang, E. J. Lee, C. W. Ma, and D. U. Ahn. 2011. Lipid and protein oxidation of chicken breast rolls as affected by dietary oxidation levels and packaging. *J. Food Sci.* 76:612-617.

BIOMETRÍA DEL CERDO CRIOLLO ECUATORIANO EN EL CONTEXTO DEL GANADO PORCINO IBEROAMERICANO

BIOMETRY OF ECUADORIAN CREOLE PIG IN THE CONTEXT OF IBEROAMERICAN SWINE

Kleber **Estupiñán-Véliz**¹, Amparo **Martínez-Martínez**², Angel Carmelo **Sierra-Vásquez**³, Eliecer **Pérez-Pineda**⁴,
Maricela Adelaida **Canul-Solis**³, Francisco **Velázquez-Rodríguez**⁴, Cecilio **Barba-Capote**^{5*}

¹Facultad de Ciencias Pecuarias. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo. Ecuador.
²Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. 14071. Córdoba. España. ³Tecnológico Nacional de México/IT de Conkal-División de Estudios de Postgrado e Investigación. Av. Tecnológico S/N 97345. Conkal, Yucatán. México. ⁴Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Granma. Bayamo. Cuba. ⁵Departamento de Producción Animal. Universidad de Córdoba. Edificio Producción Animal. Campus de Rabanales. 14071. Córdoba. España. (cjbarba@uco.es).

RESUMEN

A pesar de la importancia censal del ganado porcino criollo, Ecuador no tiene razas porcinas caracterizadas y reconocidas con carácter oficial. No se conocen las características morfológicas de las poblaciones criollas de la Zona de Planificación 5, tampoco si presentan diferencias con otras poblaciones americanas e ibéricas. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis biométrico en cerdos criollos ecuatorianos y relacionarlo con poblaciones Iberoamericanas. El estudio incluyó 338 hembras adultas elegidas al azar pertenecientes a cuatro poblaciones criollas ecuatorianas: Bolívar (75), Guayas (109), Los Ríos (95) y Santa Elena (59), además del Criollo cubano (50), Pelón mexicano (158), Entrepleado (149), Lampiño (77), Manchado de Jabugo (16), Portugués (20), Retinto (207) y Torbiscal (86). Con ocho variables zoométricas y cinco índices zoométricos (IZ) se realizó un estudio descriptivo, así como un análisis comparativo de los IZ con ANDEVA, con la población como factor de variación, además de un análisis discriminante canónico con las variables zoométricas. Las poblaciones ecuatorianas destacaron por su carácter braquicéfalo, índice pelviano mayor y línea dorsolumbar con inclinación caudal ascendente, y presentaron formato corporal menor respecto a las ibéricas y características similares al resto de las poblaciones evaluadas. Las diferencias estadísticas entre los IZ y las distancias de Mahalanobis y las euclidianas individuales permitieron sugerir un patrón zoométrico distinto para cada población. La formación de dos grandes grupos mostró un tipo americano que abarcó a las poblaciones ecuatorianas, y otro

ABSTRACT

Despite the importance of the creole pig census, Ecuador has not officially recognized and characterized pig breeds. The morphological characteristics of the creole populations in Planning Zone 5 are not known, nor whether they are different from other American and Iberian populations. The objective of this study was to carry out a biometric analysis in Ecuadorian creole pigs and relate it to Ibero-American populations. The study included 338 adult females randomly chosen from four Ecuadorian creole populations: Bolívar (75), Guayas (109), Los Ríos (95) and Santa Elena (59), in addition to Cuban Creole (50), Mexican Pelón (158), Entrepleado (149), Lampiño (77), Manchado de Jabugo (16), Portuguese (20), Retinto (207) and Torbiscal (86). A descriptive study was carried out with eight zoomometric variables and five zoomometric indexes (IZ), as well as a comparative analysis of the IZ with ANOVA, with the population as a factor of variation, in addition to a canonical discriminant analysis using the zoomometric variables. The Ecuadorian populations stood out for their brachicephalic character, greater pelvic index and dorsolumbar line with ascending caudal inclination, smaller corporal format with respect to the Iberian ones and similar characteristics to the rest of the evaluated populations. The statistical differences between the IZ and the distances of Mahalanobis and the individual Euclidians allowed suggesting a different zoometrical pattern for each population. The formation of two large groups displayed an American type that included Ecuadorian populations, and a Mediterranean type that included Iberian populations. The greatest proximity between Ecuadorian populations was found between Bolívar and Santa Elena, followed by Guayas and Los Ríos; Mexican Pelón and Cuban Criollo occupied intermediate positions. Although there is a historical relationship with the

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.
Recibido: junio, 2019. Aprobado: enero, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 897-909. 2020.

de tipo mediterráneo que englobó a las ibéricas. La proximidad mayor entre poblaciones ecuatorianas se encontró entre Bolívar y Santa Elena, le siguieron Guayas, y Los Ríos; Pelón mexicano y Criollo cubano ocuparon posiciones intermedias. Aunque hay relación histórica con el tronco ibérico, las poblaciones americanas se han diferenciado con el tiempo de acuerdo con la ubicación geográfica del ecosistema donde se desarrollan.

Palabras clave: zoometría, caracterización, recursos genéticos, conservación, especie porcina.

INTRODUCCIÓN

La cría de ganado porcino criollo se ha transmitido entre generaciones en Iberoamérica desde la época de la colonización hasta la actualidad (Gama *et al.*, 2017), y la carne y grasa producidas son una base de la seguridad alimentaria (Barba *et al.*, 2014). Esta práctica ganadera tradicional suele ser la fuente más importante de proteína de origen animal en comunidades marginadas y económicamente deprimidas, a través de los sistemas de traspatio y de ganadería familiar de subsistencia (Rodríguez *et al.*, 2018).

Las poblaciones porcinas criollas se caracterizan por su gran rusticidad y capacidad de adaptación a las condiciones de explotación extensivas, debido a la resistencia a enfermedades y al aprovechamiento de recursos naturales y subproductos agrícolas para su alimentación. También porque requieren adopción escasa de tecnología para su cría (Rodríguez-Galván *et al.*, 2018). Por todo ello, se pueden considerar como animales de costo bajo. Además, su ritmo productivo, prolificidad y velocidad de crecimiento confieren fortalezas importantes al utilizarlos en sistemas de producción compatibles con el desarrollo sostenible (Núñez-Domínguez *et al.*, 2016; Aparicio *et al.*, 2018).

En el ámbito iberoamericano, los estudios de caracterización morfológica del cerdo criollo son relativamente recientes (Linares *et al.*, 2011), en especial aquellos basados en aspectos descriptivos de los intervalos biológicos de variación dentro de cada población, como es el caso del Pelón mexicano (Sierra *et al.*, 2016), el Pampa Rocha en Uruguay (Castro *et al.*, 2012), así como estudios sobre el criollo de Guatemala (Lorenzo *et al.*, 2012), criollo costero de Argentina (Carpinetti *et al.*, 2016) y el criollo peruano (Céspedes *et al.*, 2016). De manera similar, se

Iberian trunk, American populations have been differentiated with time according to the geographical location of the ecosystem where they are developed.

Key words: zoometry, characterization, genetic resources, conservation, swine species.

INTRODUCTION

Creole pig breeding has passed down through generations in Iberoamerica from the colonization era to the present (Gama *et al.*, 2017), and the meat and fat produced are a basis for food security (Barba *et al.*, 2014). This traditional livestock practice is often the most important source of animal protein in marginalized and economically depressed communities through backyard and subsistence family livestock systems (Rodríguez *et al.*, 2018).

Creole pig populations are characterized by their great rusticity and capacity to adapt to extensive farming conditions, due to their resistance to diseases and the use of natural resources and agricultural by-products for their feeding. Also, they require simple technology for their breeding (Rodríguez-Galván *et al.*, 2018). For all these reasons, they can be considered as low-cost animals. In addition, their productive rate, prolificacy and growth speed confer important strengths when used in production systems compatible with sustainable development (Núñez-Domínguez *et al.*, 2016; Aparicio *et al.*, 2018).

In the case of Iberoamerica, morphological characterization studies of the creole pig are relatively recent (Linares *et al.*, 2011), especially those based on descriptive aspects of the biological intervals of variation found within each population, as is the case of the Mexican Pelón (Sierra *et al.*, 2016), Pampa Rocha in Uruguay (Castro *et al.*, 2012), as well as studies on Guatemalan creole (Lorenzo *et al.*, 2012), Argentinean coastal creole (Carpinetti *et al.*, 2016), and Peruvian creole (Céspedes *et al.*, 2016). Similarly, comparative analyses between populations were undertaken to quantify differences between racial groups within a country (Cabello *et al.*, 2007; Barrera *et al.*, 2007), or between breeds in Ibero-American countries compared to probable native breeds.

From the point of view of the conservation of animal genetic resources, the morphological

han realizado análisis comparativos entre poblaciones para cuantificar las diferencias entre los grupos raciales de un país (Cabello *et al.*, 2007; Barrera *et al.*, 2007), o entre las razas de países iberoamericanos en comparación con las probables razas originarias.

Desde el punto de vista de la conservación de los recursos zogenéticos, la caracterización morfológica es una de las primeras actividades a desarrollar sobre las poblaciones pecuarias a preservar, aunada a la caracterización demográfica, productiva y de genética molecular permitirían implementar un programa de rescate o preservación de cada población estudiada (Nieto *et al.*, 2019). Los caracteres morfológicos permiten describir e identificar individuos o grupos de individuos con características similares, además de posibilitar la diferenciación o el establecimiento de posibles relaciones entre distintas poblaciones (FAO, 2012).

Ecuador tiene pocos estudios de caracterización en la especie porcina (FAO, 2015), y es evidente la ausencia de estudios comparativos entre poblaciones. No hay referencias de la existencia de poblaciones porcinas criollas en la base de datos del Sistema de Información sobre la Diversidad de los Animales Domésticos (DAD-IS) de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, 2019). El objetivo del estudio fue comparar la biometría de cerdos criollos ecuatorianos con la de poblaciones iberoamericanas para su caracterización racial con vistas al desarrollo de un programa de rescate y preservación de los recursos genéticos porcinos americanos.

MATERIALES Y METODOS

Recopilación de información

El área de estudio fue la Zona de Planificación 5, en el centro-oeste de Ecuador (0° 50' y 3° 3' S y 78° 51' a 81° 1' O). El área la integran las provincias Bolívar (3945 km²), Guayas (10 847.8 km²), Los Ríos (7205.3 km²) y Santa Elena (3690.2 km²), con excepción del Archipiélago de Galápagos, y su superficie total es 25 688.7 km², distribuidos en 45 cantones. Esta zona está conformada por ecosistemas de sierra y de costa; así, la provincia de Bolívar está entre 180 y 4000 m de altitud, mientras que Guayas, Los Ríos y Santa Elena están en una gran llanura aluvial y a una altitud de 0 a 500 m. El intervalo de temperaturas medias varía de 13.5 y 25.7 °C, lo cual conforma diversas variantes climáticas, desde el tropical seco al tropical húmedo, templado, desértico frío y glacial (SENPLADES, 2015). Hay 1 193 052

characterization is one of the main activities to develop on the cattle populations to preserve, together with the demographic, productive and molecular genetic characterization, which would allow to implement a rescue or preservation program of each studied population (Nieto *et al.*, 2019). Morphological characters allow the description and identification of individuals or groups of individuals with similar characteristics, as well as making it possible to differentiate or establish possible relationships between different populations (FAO, 2012).

Ecuador has few characterization studies on swine species (FAO, 2015), and there is a clear lack of comparative studies between populations. There are no references to the existence of creole pig populations in the database of the United Nations Food and Agriculture Organization's Domestic Animal Diversity Information System (FAO, 2019) (DAD-IS). The aim of the study was to compare the biometrics of Ecuadorian creole pigs with those of Ibero-American populations for breed characterization with a view to developing a program to rescue and preserve American pig genetic resources.

MATERIALS AND METHODS

Gathering information

The area of study was Planning Zone 5, located at the center-west of Ecuador (0° 50' and 3° 3' S and 78° 51' to 81° 1' W). The area is made up of the provinces of Bolívar (3945 km²), Guayas (10 847.8 km²), Los Ríos (7205.3 km²) and Santa Elena (3690.2 km²), with the exception of the Galapagos Archipelago, and its total area is 25 688.7 km², distributed in 45 cantons. This zone is made up of mountain and coastal ecosystems; thus, Bolívar province is at an altitude of 80 and 4000 m, while Guayas, Los Ríos and Santa Elena are in a great alluvial plain and at an altitude of 0 to 500 m. The average temperature range varies from 13.5 to 25.7 °C, which conforms diverse climatic variants, from dry tropical to humid tropical, temperate, cold desert and glacial (SENPLADES, 2015). There are 1 193 052 creole pigs (INEC, 2019), of which 18.6% are within this area of study.

The sample for the study included 338 adult females from the Ecuadorian creole cattle population: Bolívar (B, n=75), Guayas (G, n=109), Los Ríos (LR, n=95) and Santa Elena (SE, n= 59). In addition, with 1101 adult females, a comparative and differentiation analysis was carried out between Ecuadorian creole pigs and two American pig populations: Cuban creole

porcinos criollos (INEC, 2019), de los cuales 18.6% están en dicha área de estudio.

La muestra para el estudio incluyó 338 hembras adultas de la población del ganado criollo ecuatoriano: Bolívar (B, n = 75), Guayas (G, n=109), Los Ríos (LR, n=95) y Santa Elena (SE, n= 59). Además, con 1101 hembras adultas se realizó un análisis comparativo y de diferenciación entre el ganado porcino criollo ecuatoriano y dos poblaciones porcinas americanas: Criollo Cubano (CC, n=50) y Pelón Mexicano (PM, n=158), y seis poblaciones porcinas ibéricas: Entrepelado (IB-E, n=149), Lampiño (IB-L, n= 77), Manchado de Jabugo (IB-MJ, n=16), Portugués (IB-P, n=20), Retinto (IB-R, n=207) y Torbiscal (IB-T, n=86).

Variables zoométricas

Las variables evaluadas fueron algunas de las recomendadas por Parés (2009): anchura de la cabeza (ACF), longitud de la cabeza (LCF), longitud de la cara (LR), alzada a la cruz (ACR), alzada a la entrada de la grupa (AEG), anchura de la grupa (AG), longitud grupa (LG) y perímetro de la caña (PC). Estos valores se obtuvieron con un bastón zoométrico Hauptner, compás de brocas y cinta métrica inextensible.

Índices zoométricos

Los índices zoométricos (IZ) de interés etnológico fueron: índice cefálico ($ICEF=ACF*100/LCF$) e índice pelviano ($IPEL=AG*100/LG$), el de interés productivo: índice de grueso relativo de la caña ($IGRC=PC*100/ACR$) y otros dos: índice facial ($IFAC=LR*100/LCF$) e índice morfológico de Alderson sobre alzada inclinada ($IALD1=ACR-AEG$). Los índices se calcularon con la metodología propuesta por Parés (2009).

Análisis estadístico

Estadística descriptiva se utilizó para las variables cuantitativas, y ANDEVA univariante para los índices zoométricos, con la población como efecto fijo único. Una vez identificada la diferencia significativa, se realizó análisis discriminante canónico con las variables morfométricas para reconocer las relaciones entre las 12 poblaciones porcinas. También se calcularon las distancias de Mahalanobis para estimar el grado de diferenciación entre dichas poblaciones. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistica for Windows, versión 10 (StatSoft, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estadísticos descriptivos de las variables morfométricas estudiadas en las 12 poblaciones porcinas iberoamericanas (Cuadro 1) mostraron valores

(CC, n=50) and Mexican Pelón (PM, n=158) and six Iberian pig populations: Entrepelado (IB-E, n=149), Lampiño (IB-L, n=77), Manchado de Jabugo (IB-MJ, n=16), Portuguese (IB-P, n=20), Retinto (IB-R, n=207) and Torbiscal (IB-T, n=86).

Zoometric variables

The variables evaluated were some of those recommended by Parés (2009): head width (ACF), head length (LCF), face length (LR), height at withers (ACR), height at the entrance of the rump (AEG), rump width (AG), rump length (LG) and rump perimeter (PC). These values were obtained with a Hauptner measuring cane, a drill compass and an inextensible measuring tape.

Zoometric indexes

The zoometric indexes (IZ) of ethnological interest were: cephalic index ($ICEF=ACF*100/LCF$) and pelvic index ($IPEL=AG*100/LG$), the one of productive interest: cane's relative thickness index ($IGRC=PC*100/ACR$) and two others: facial index ($IFAC=LR*100/LCF$) and Alderson's morphological index on inclined height ($IALD1=ACR-AEG$). The indices were calculated with the methodology proposed by Parés (2009).

Statistical analysis

Descriptive statistics were used for quantitative variables, and univariate ANOVA for zoometric indexes, with population as the single fixed effect. Once the significant difference was identified, a canonical discriminant analysis was carried out with the morphometric variables to recognize the relationships among the 12 pig populations. Mahalanobis distances were also calculated to estimate the degree of differentiation between these populations. All statistical analyses were performed with the Statistica for Windows software, version 10 (StatSoft, 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

The descriptive statistics of the morphometric variables studied in the 12 Ibero-American pig populations (Table 1) showed lower values than the European breeds as a whole (Bozzi *et al.*, 2018), although the highest averages were found in the Iberian varieties with respect to the American populations, with the exception of ACF, where CC, SE, LR and PY were higher than the other populations. The variables related to the head: ACF, LCF, and LR, showed B as the population with the lowest values: 12.81, 25.25, and 13.80 cm, respectively; while the

Cuadro 1. Valores promedio para las variables zoométricas en las diferentes poblaciones porcinas iberoamericanas.
Table 1. Average values for zoomometric variables in the 12 Ibero-American pig populations.

	ACF	DE	LCF	DE	LR	DE	ACR	DE	AEG	DE	AG	DE	LG	DE	PC	DE
B	14.00	3.54	25.81	4.67	14.19	2.95	61.63	9.00	67.97	8.79	18.48	4.10	25.44	4.62	11.49	1.59
G	12.81	2.78	25.35	4.78	13.80	2.74	62.63	9.31	67.40	9.97	18.73	7.13	24.63	3.63	12.78	2.04
LR	15.16	2.16	29.07	3.17	20.42	3.21	62.14	7.36	68.83	7.44	21.75	2.86	26.65	3.63	13.16	1.47
SE	14.43	2.71	27.83	3.54	16.19	3.71	58.91	9.43	64.00	9.54	18.05	4.32	23.46	4.74	11.43	1.43
CC	14.40	1.51	31.40	2.54	17.26	1.87	61.22	5.69	66.65	6.28	18.82	3.38	25.35	2.91	14.93	1.70
PY	16.23	2.49	28.75	3.69	16.67	2.89	59.22	6.89	64.60	7.48	18.88	3.18	25.88	3.45	13.65	2.38
E	13.85	1.38	32.06	3.91	20.48	2.17	78.14	4.36	81.08	3.54	22.25	2.46	29.43	2.82	15.75	0.72
L	13.87	1.34	31.21	3.55	20.50	1.86	77.46	5.27	81.08	4.96	24.42	3.19	32.58	3.75	15.96	0.85
R	13.55	1.18	30.87	1.81	20.94	1.76	77.33	4.47	81.53	4.46	22.64	2.93	30.67	3.61	15.90	0.81
T	14.09	1.62	31.61	1.96	22.15	1.91	78.17	3.43	82.33	2.43	22.21	2.59	32.16	3.87	16.38	0.74
P	13.20	1.37	29.87	3.70	19.45	2.71	70.84	5.36	75.68	4.58	18.44	2.45	30.32	4.31	14.64	1.38
MJ	12.97	1.37	26.47	2.13	17.06	1.68	72.91	7.14	77.06	6.49	24.20	5.76	29.25	5.41	15.22	1.45

B: Bolívar; G: Guayas; LR: Los Ríos; SE: Santa Elena; CC: Criollo Cubano; PY: Pelón Mexicano de Yucatán; E: Entrepelado; L: Lampiño; R: Retinto; T: Torbiscal; P: Portugués; MJ: Manchado de Jabugo; DE: destivación típica; ACF: anchura de la cabeza, LCF: longitud de la cabeza, LR: longitud de la cara, ACR: alzada a la cruz, AEG: alzada entrada grupa; AG: Anchura de la grupa; LG: longitud grupa y PC: perímetro de la caña. Todos los valores se expresaron en cm. ♦ B: Bolívar; G: Guayas; LR: Los Ríos; SE: Santa Elena; CC: Cubano creole; PY: Mexican Pelón from Yucatán; E: Entrepelado; L: Lampiño; R: Retinto; T: Torbiscal; P: Portugués; MJ: Manchado de Jabugo. DE: Standard deviation; ACF: head width; LCF: head length; LR: face length; ACR: height at withers; AEG: height at the entrance of the rump; AG: rump width; LG: rump length; PC: cane perimeter. All values are expressed in cm.

inferiores al conjunto de razas europeas (Bozzi *et al.*, 2018), si bien los promedios más altos se encontraron en las variedades ibéricas respecto a las poblaciones americanas, con excepción de ACF donde CC, SE, LR y PY fueron superiores a las otras poblaciones. Las variables relativas a la cabeza ACF, LCF y LR, evidenciaron a B como la población con los menores valores: 12.81, 25.25 y 13.80 cm, respectivamente; mientras que los valores mayores correspondieron con PY (ACF: 16.23), E (LCF: 32.06) y T (LR: 22.15). ACR y AEG presentaron un comportamiento similar: mínimo para SE con 58.91 y 64.00, respectivamente; máximo para T con 78.17 y 82.33, respectivamente. De forma similar, AG y LG reflejaron mínimos en SE, con 18.05 y 23.46, respectivamente, y máximo para L con 24.42 y 32.58, respectivamente. Respecto a PC, la variación osciló entre el valor mínimo en B (11.49) y el máximo en T (16.38). Todo ello confirma que los porcinos de la península ibérica presentaron un formato corporal mayor que los criollos, en especial los ecuatorianos.

Las diferencias de tamaño se explican al considerar los mecanismos adaptativos de esta especie en distintos ecosistemas, de manera que las poblaciones localmente adaptadas en climas tropicales tienden a presentar tamaño y peso vivo menores frente a las poblaciones animales de climas templados o fríos, las cuales se caracterizan por formatos corporales mayores (Cuadro 1). Asimismo, las diferencias de tamaño corporal podrían deberse al tipo y disponibilidad de alimento en el hábitat natural de las poblaciones porcinas americanas y, además, al efecto de la depresión consanguínea en los casos de gestión de cría endogámica en núcleos de reducido tamaño efectivo de la población.

El Cuadro 2 incluye la comparación de medias para los índices zoométricos en las poblaciones estudiadas y debe destacarse que los índices zoométricos fueron significativos (Cuadro 2). El ICEF varió entre un mínimo de 43.58 (E) y 57.14 (PY), el cual mostró valores dolicocefalos (< 50) en las poblaciones ibéricas junto a CC (45.93), para conformar un grupo de homogeneidad entre ellas; MJ (48.97) compartió agrupamiento con G (51.17), SE (52.17), LR (52.56) y B (54.33) con proximidad a la mesocefalia (50) junto a G, SE y LR, mientras que las otras poblaciones se encuadraron en valores braquicéfalos (>50), en especial en el caso de B y PY.

Estos resultados indican la analogía morfoestructural del CC respecto a las poblaciones ibéricas en el

highest values corresponded to PY (ACF: 16.23), E (LCF: 32.06), and T (LR: 22.15). ACR and AEG showed similar behavior: minimum for SE with 58.91 and 64.00, respectively; maximum for T with 78.17 and 82.33, respectively. Similarly, AG and LG reflected minimums in SE, with 18.05 and 23.46, respectively, and maximums for L with 24.42 and 32.58, respectively. With respect to PC, the variation ranged from the minimum value in B (11.49) to the maximum in T (16.38). All this confirms that pigs from the Iberian Peninsula presented a larger body format than creoles, especially Ecuadorians.

The differences in size are explained by considering the adaptive mechanisms of this species in different ecosystems, so that locally adapted populations in tropical climates tend to have smaller size and live weight compared to animal populations in temperate or cold climates, which are characterized by larger body shapes (Table 1). Likewise, differences in body size could be due to the type and availability of food in the natural habitat of American pig populations and, in addition, to the effect of inbreeding depression in cases of endogamic breeding management in nuclei of reduced effective population size.

Table 2 includes the mean comparison for zoomometric indexes in the populations studied and it should be noted that they were significant (Table 2). The ICEF varied between a minimum of 43.58 (E) and 57.14 (PY), which showed dolichocephalic values (<50) in the Iberian populations together with CC (45.93), to conform a group of homogeneity among them; MJ (48.97) shared grouping with G (51.17), SE (52.17), LR (52.56) and B (54.33) with proximity to mesocephaly (50) together with G, SE and LR, while the other populations were grouped in brachycephalic values (>50), especially in the case of B and PY.

These results indicate the morphological-structural analogy of the CC with respect to the Iberian populations in the main zoomometric index of ethnological characterization (Parés, 2009). Therefore, if this population was influenced by others during its history (Revidatti *et al.*, 2014), it still shares common characters to the original Mediterranean trunk as a consequence of the introduction of pigs from the Iberian Peninsula, which arrived to Cuba since Columbus' second expedition, and this could also be due to the geographical isolation of the insular population, unlike other populations distributed in the continental territory (Gama *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Comparación de medias para los índices zoométricos en las poblaciones porcinas iberoamericanas.
Table 2. Mean comparison for zoometric indexes in the 12 Ibero-American populations.

Raza	ICEF	DE	IPEL	DE	IGRC	DE	IFAC	DE	ALD1	DE
Entrepelado (E)	43.58a	4.57	75.67c	6.81	20.20a	1.20	64.26b	5.72	-2.90a	2.16
Lampiño (L)	44.78a	5.08	75.12c	6.98	20.65b	1.06	66.07c	6.08	-3.62a,b	2.33
Retinto (R)	43.94a	3.32	74.06c	9.02	20.63a,b	1.29	67.85c	4.73	-4.21b,c	2.60
Torbiscal (T)	44.74a	4.60	69.66b	8.63	20.99b	1.03	70.16c	4.83	-4.25b,c	2.01
Portugués (P)	44.48a	3.72	60.10 ^a	8.61	21.00b	1.78	65.50c	4.60	-8.37d	5.18
M. Jabugo (MJ)	48.97a,b	3.02	85.65d	18.48	20.90b	0.99	64.45b,c	3.58	-4.16b,c	1.91
Criollo Cubano (CC)	45.93a	4.07	74.05b,c	9.22	24.40d	1.75	55.03a	4.63	-5.43c,d	1.73
Bolívar (B)	54.33b,c	9.55	72.56b,c	8.03	18.79a	1.88	55.39a	9.25	-6.44d	1.86
Guayas (G)	51.17b	0.37	76.20c	7.13	20.67b	3.65	54.97a	7.81	-4.76c	1.68
Los Ríos (LR)	52.56b	8.36	81.9d	6.22	21.32b	2.39	70.18c	7.74	-6.59d	1.56
Santa Elena (SE)	52.17b	9.21	77.02c	9.56	19.67a	2.66	58.03a,b	10.68	-5.09c	1.15
Pelón Yucatán (PY)	57.14c	10.50	73.21b,c	9.55	23.09c	3.21	58.91b	15.53	5.38c	3.00

ICEF: índice cefálico. IPEL: índice pelviano. IGRC: índice de grueso relativo de la caña. IFAC: índice facial; IALD1: índice morfológico de Alderson sobre alzada inclinada; medias con letra distinta en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ ICEF: cephalic index; IPEL: pelvic index; IGRC: cane relative thickness index; IFAC: facial index; IALD1: Alderson's morphological index on height at withers. Means with different letter in each column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

principal índice zoométrico de caracterización etnológica (Pares, 2009). Por lo tanto, si esta población recibió influencia de otras durante su historia (Revidatti *et al.*, 2014), todavía comparte caracteres comunes al tronco mediterráneo originario como consecuencia de la introducción de cerdos procedentes de la Península Ibérica, que llegaron a Cuba desde el segundo viaje de Colón, y esto también podría deberse al aislamiento geográfico de la población insular, a diferencia de otras poblaciones distribuidas en el territorio continental (Gama *et al.*, 2017).

En otras poblaciones americanas existe evidencia de influencia mayor de otras poblaciones ajenas al tronco mediterráneo, tal vez derivadas de la introducción de cerdos de origen asiático a través de las rutas marítimas comerciales del Pacífico, como el caso del Galeón de Manila que conectó las Islas Filipinas con Acapulco (Barba *et al.*, 2014), lo que explicaría el carácter braquicéfalo de PY y de las poblaciones ecuatorianas.

Por su conformación, las poblaciones criollas porcinas ecuatorianas pudieron evolucionar de forma paralela a la descrita para las razas bovinas de Ecuador, en la cual la introducción de bovinos foráneos ocurrió por vía marítima desde Panamá y se extendió por la costa ecuatoriana (Barba *et al.*, 2014). Esto explica el porqué los caracteres cefálicos son muy constantes en cada población y les afecta muy poco el ambiente (Parés, 2009), mientras que los otros índices

In other American populations there is evidence of greater influence from other populations outside the Mediterranean trunk, perhaps derived from the introduction of pigs of Asian origin through the commercial maritime routes of the Pacific, as in the case of the Manila Galleon that connected the Philippine Islands with Acapulco (Barba *et al.*, 2014), which would explain the brachycephalic character of PY and the Ecuadorian populations.

Given their conformation, Ecuadorian creole pig populations were able to evolve in parallel to that described for Ecuadorian cattle breeds, in which the introduction of foreign cattle occurred by sea from Panama and spread along the Ecuadorian coast (Barba *et al.*, 2014). This explains why the cephalic characteristics are very constant in each population and are affected very little by the environment (Parés, 2009), while the other zoomometric indexes are always subject to the adaptation of the animals to the different existing environmental and climatic conditions (Cabello *et al.*, 2007).

The IPEL reflected intermediate values for the Ecuadorian populations with respect to the other populations, where B (72.56), G (76.20) and SE (77.02) formed a homogeneity group with CC (74.05), PY (73.21), E (75.67), L (75.12) and R (74.06), and LR (81.90) leaned towards the highest values with a homogeneity group together with MJ (85.65). At the lower end was P (60.10) as the only

zoométricos se supeditan siempre a la adaptación de los animales a las diferentes condiciones ambientales y climáticas existentes (Cabello *et al.*, 2007).

El IPEL reflejó valores intermedios para las poblaciones ecuatorianas respecto a las demás poblaciones, donde B (72.56), G (76.20) y SE (77.02) conformaron un grupo de homogeneidad con CC (74.05), PY (73.21), E (75.67), L (75.12) y R (74.06), y LR (81.90) se inclinó hacia los mayores valores con un grupo de homogeneidad junto a MJ (85.65). En el extremo inferior quedó el P (60.10) como grupo único, y T (69.66) con homogeneidad compartida con B, PY y CC. De todo ello se deduce una aptitud positiva hacia la facilidad de parto en la mayor parte de las poblaciones consecuente con la relación de la anchura de la pelvis respecto a su longitud (Parés, 2009).

El IGRC ofreció resultados muy variables en las poblaciones ecuatorianas, desde la integración de B (18.79) y SE (19.67) en el mismo grupo de homogeneidad de E (20.20) y R (20.63), con el menor valor promedio, seguido de un agrupamiento múltiple conformado por L (20.65), G (20.67), MJ (20.90), T (20.99), P (21.00) y LR (21.32) en el cual también entró R (20.63). En el extremo superior están las poblaciones de PY (23.09) y CC (24.40) al constituir sendos grupos de homogeneidad independientes entre sí. Este IZ de tipo funcional explica la inexistencia de criterios selectivos uniformes en las distintas poblaciones. Lo anterior, en cada caso pudo ser consecuencia de las adaptaciones funcionales específicas de cada población en sus respectivas áreas o ecosistemas de difusión natural (Gama *et al.*, 2017).

El IFAC mostró diferencias significativas entre las 12 poblaciones. Los valores dolico prosopios se evidenciaron en todos los casos, si bien G (54.97) y B (55.39) tienden a posiciones más próximas a la mesoprosopia junto a CC (55.03) y SE (58.03), mientras que MJ (64.45), P (65.50), L (66.07), R (67.85) y T (70.16) ocuparían los valores máximos de dolico prosopía, y las otras poblaciones en posiciones intermedias. Estos resultados informan de cerdos con la región facial bien desarrollada, lo cual facilita la búsqueda, recolección y consumo de alimentos en condiciones de explotación extensiva.

En las poblaciones ecuatorianas, el IALD1 mostró valores promedio mayores a la media del conjunto, en especial en LR (-6.59) y B (-6.44), que se agruparon

group, and T (69.66) with homogeneity shared with B, PY and CC. From all this, we can deduce a positive aptitude towards the ease of birth in most of the populations that is consequent to the relation of the pelvis width with respect to its length (Parés, 2009).

The IGRC offered highly variable results in the Ecuadorian populations, from the integration of B (18.79) and SE (19.67) in the same homogeneity group of E (20.20) and R (20.63), with the lowest average value, followed by a multiple grouping made up of L (20.65), G (20.67), MJ (20.90), T (20.99), P (21.00) and LR (21.32), in which R (20.63) also entered. At the top end are the populations of PY (23.09) and CC (24.40), as they each constitute independent groups of homogeneity. This functional IZ explains the lack of uniform selective criteria in the different populations. In each case, this could be a consequence of the specific functional adaptations of each population in their respective areas or ecosystems of natural diffusion (Gama *et al.*, 2017).

IFAC showed significant differences among the 12 populations. Dolico prosopic values were evidenced in all cases, although G (54.97) and B (55.39) tend to positions closer to mesoprosopia, next to CC (55.03) and SE (58.03), while MJ (64.45), P (65.50), L (66.07), R (67.85) and T (70.16) would hold the maximum values of dolico prosopia, and the other populations tend to intermediate positions. These results report pigs with well-developed facial region, which facilitates the search, collection and consumption of food under extensive exploitation conditions.

In Ecuadorian populations, the IALD1 showed average values higher than the overall mean, especially in LR (-6.59) and B (-6.44), which were grouped together with P (-8.37) and CC (-5.43), compared with G (-4.76) and SE (-5.09) together with CC (-5.43), PY (-5.38), R (-4.21), T (-4.25) and MJ (-4.16), although CC overlapped in both groupings. These results showed the importance of this adaptive type of character in Ecuadorian agriculture, given the importance of the upward slope of the pigs' dorsolumbar line, which favors their functional gymnastics in difficult orography, a situation to be taken into account since on many occasions pigs are exploited in marginal lands, where other livestock species are not competitive.

junto a P (-8.37) y CC (-5.43), en comparación con G (-4.76) y SE (-5.09) en unión a CC (-5.43), PY (-5.38), R (-4.21), T (-4.25) y MJ (-4.16), si bien CC se solapó en ambos agrupamientos. Estos resultados evidenciaron la importancia de este carácter de tipo adaptativo en el agro ecuatoriano, dada la importancia de la inclinación caudal ascendente de la línea dorsolumbar de los cerdos, al favorecer su gimnástica funcional en terrenos de difícil orografía, situación para tener en cuenta porque en muchas ocasiones los cerdos se explotan en terrenos marginales donde otras especies ganaderas no resultan competitivas.

El carácter estadístico significativo de las tres primeras funciones discriminantes obtenidas se probó por Wilk's Lambda (λ), con valores 0.07; 0.30 y 0.49, respectivamente, así como la prueba de Chi cuadrado (χ^2), donde los valores fueron 2746.04; 1252.84 y 733.90 ($p \leq 0.001$), respectivamente. Las funciones 1 y 2 explicaron 69.06 y 14% de la variación total, respectivamente, y la función 3 con 7.70% quedó a gran distancia de la varianza explicada. Las otras funciones se consideraron testimoniales porque la varianza explicada fue inferior al 4% (Cuadro 3). Estos resultados proporcionaron validez para el análisis discriminante, al destacar que la función 1 tuvo la mejor combinación lineal de rasgos que permitió discriminar entre las 12 poblaciones.

Las distancias de Mahalanobis (sobre la diagonal, Cuadro 4) evidenciaron la gran proximidad entre las cuatro variedades ibéricas reconocidas oficialmente y son las poblaciones explotadas mayoritariamente en España. Después destacó la cercanía de las poblaciones P y MJ con las variedades raciales ibéricas anteriores. De modo similar, en las poblaciones ecuatorianas, también se manifestó la relación entre las

The statistically significant character of the first three discriminant functions obtained was tested by Wilk's Lambda (λ), with values of 0.07; 0.30 and 0.49, respectively, as well as the Chi-square test (χ^2), where the values were 2746.04; 1252.84 and 733.90 ($p \leq 0.001$), respectively. Functions 1 and 2 explained 69.06 and 14% of the total variation, respectively, and function 3 with 7.70% was far from the explained variance. The other functions were considered testimonial because the explained variance was less than 4% (Table 3). These results provided validity for the discriminant analysis, highlighting that function 1 had the best linear combination of traits that allowed discrimination among the 12 populations.

The Mahalanobis distances (on the diagonal, Table 4) showed the great proximity between the four officially recognized Iberian varieties, which are the most exploited populations in Spain. Afterwards, the proximity of the P and MJ populations to the previous Iberian varieties stood out. Similarly, in the Ecuadorian populations, the relationship between the populations of B, G and SE was also evident. The proximity of the PY stood out from these three Ecuadorian populations. CC was very close to PY and less so to the Ecuadorian populations. The distances between the Iberian and Ibero-American populations were greatest in the cases of T and SE, as well as in T and B. CC and PY occupied intermediate positions between the Iberian and Ecuadorian populations, where CC was closer to the former, while PY showed greater proximity to the latter. The individual Euclidean distances (below the diagonal, Table 4), confirmed the behavior of the different populations with respect to each other, similar to that already described.

Cuadro 3. Funciones discriminantes canónicas en poblaciones porcinas iberoamericanas estudiadas.
Table 3. Canonical discriminant functions in 12 Ibero-American pig populations studied.

Función	Valor propio	Varianza explicada (%)	Correlación canónica	λ	X^2	Probabilidad significativa
1	3.17	69.06	0.87	0.07	2746.04	$p < 0.001$
2	0.64	14.00	0.63	0.30	1252.84	$p < 0.001$
3	0.35	7.70	0.51	0.50	733.91	$p < 0.001$
4	0.17	3.68	0.38	0.67	417.40	$p < 0.001$
5	0.14	3.07	0.35	0.78	254.13	$p < 0.001$
6	0.07	1.54	0.26	0.89	116.54	$p < 0.001$
7	0.03	0.63	0.17	0.96	45.00	$p < 0.01$

λ = Wilks' - Lambda; X^2 . = Chi-cuadrada. ♦ λ = Wilks' - Lambda; X^2 . = Chi-square.

Cuadro 4. Distancias de Mahalanobis (sobre la diagonal) y distancias euclidianas individuales (bajo la diagonal) entre las poblaciones porcinas iberoamericanas estudiadas.**Table 4. Mahalanobis distances (above the diagonal) and individual Euclidean distances (below the diagonal) among the 12 Ibero-American pig populations studied.**

Raza	R	E	P	MJ	CC	T	L	SE	G	B	LR	PY
R		0.98	4.62	5.79	12.34	0.86	0.66	17.37	13.33	18.93	9.72	16.45
E	74		6.34	6.72	10.93	2.56	1.49	15.52	12.34	18.37	11.00	15.69
P	193	203		13.37	10.12	4.09	6.12	13.90	12.44	14.10	9.85	12.35
MJ	235	230	262		12.57	10.16	4.67	13.20	6.58	12.73	8.77	13.59
CC	411	385	305	314		14.92	12.38	7.68	7.90	12.48	7.62	3.37
T	112	155	221	310	458		1.86	22.04	18.43	23.92	12.33	19.03
L	57	85	202	210	399	139		16.99	12.50	18.19	9.85	15.79
SE	542	516	426	391	250	596	527		3.11	2.40	5.90	4.04
G	463	439	367	288	235	530	445	154		2.23	8.84	5.78
B	570	550	449	406	323	618	553	130	168		9.77	7.01
LR	366	360	282	261	212	422	354	253	253	323		5.99
PY	521	500	399	387	170	566	505	157	204	229	235	

R: Retinto; E: Entrepelado; P: Portugués; MJ: Manchado de Jabugo; CC: Criollo Cubano; T: Torbiscal; L: Lampiño; SE: Santa Elena; G: Guayas; B: Bolívar; LR: Los Ríos; PY: Pelón Mexicano de Yucatán. Todos los valores de las distancias de Mahalanobis, fueron significativos ($p \leq 0.001$). ♦ R: Retinto; E: Entrepelado; P: Portuguese; MJ: Manchado de Jabugo; CC: Cubano creole; T: Torbiscal; L: Lampiño; SE: Santa Elena; G: Guayas; B: Bolívar; LR: Los Ríos; PY: Mexican Pelón from Yucatán. All distance values of Mahalanobis were significant ($p \leq 0.001$).

poblaciones de B, G y SE. La cercanía del PY destacó de esas tres poblaciones ecuatorianas. CC estuvo muy próximo a PY y menos a las poblaciones ecuatorianas. Las distancias entre las poblaciones ibéricas y las iberoamericanas destacaron con los máximos en los casos de T y SE, así como en T y B. CC y PY ocuparon posiciones intermedias entre las poblaciones ibéricas y ecuatorianas, donde CC resultó más próximo a las primeras mientras que PY mostró mayor vecindad con el segundo agrupamiento. Las distancias euclidianas individuales (debajo de la diagonal, Cuadro 4), confirmaron el comportamiento de las distintas poblaciones entre sí, de manera similar a lo ya descrito.

El árbol de relaciones obtenido para las 12 poblaciones con base en las distancias euclidianas individuales (Figura 1) corroboró la existencia de dos conglomerados raciales claramente diferenciados entre sí. El primero agrupó a las razas europeas y el segundo bloque a las poblaciones americanas. En el conjunto racial ibérico, la mayor proximidad entre poblaciones se encontró entre R, L y E, como poblaciones originarias de España, mientras que la posición de T se reveló por su procedencia polivarietal derivada del cruzamiento de dos antiguas estirpes ibéricas es-

The relationship tree obtained for the 12 populations based on individual Euclidean distances (Figure 1) corroborated the existence of two clearly differentiated racial clusters. The first one grouped the European breeds and the second one the American populations. In the Iberian breeds cluster, the closest proximity between populations was found between R, L and E, like populations originating from Spain, while the position of T was revealed by its polyvarietal origin derived from the crossing of two ancient Spanish Iberian varieties with two other Portuguese varieties during the first half of the 20th century (Ruiz-Tena and Barba, 2009). Afterwards, P was segregated, which is obvious because it is a population, originally from Portugal, that has maintained greater reproductive isolation with the Spanish populations compared to the other Iberian varieties. In the end, MJ was segregated in line with its polyphilic origin based on different crosses of foreign breeds on an initial Iberian type basis (Ruiz-Tena and Barba, 2009).

In the Ecuadorian breeds cluster, the proximity between SE and B was evident, followed closely by G, while LR was further away, because PY and CC occupied intermediate positions between those three

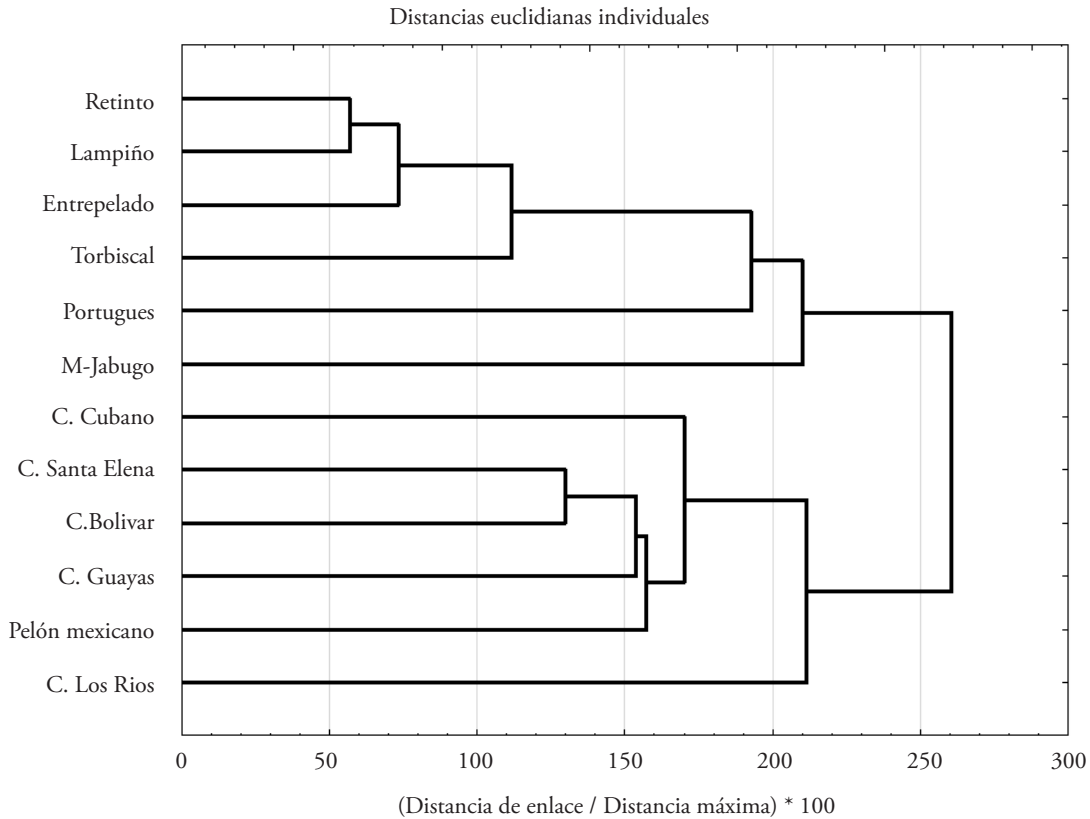


Figura 1. Representación gráfica de las distancias euclidianas individuales entre las poblaciones porcinas iberoamericanas.
Figure 1. Graphic representation of the individual Euclidean distances between the 12 Ibero-American pig populations.

pañolas con otras dos estirpes portuguesas durante la primera mitad del siglo XX (Ruiz-Tena y Barba, 2009). A continuación, se segregó P lo cual es lógico por ser una población, originaria de Portugal, que ha mantenido mayor aislamiento reproductivo con las poblaciones españolas comparada con las otras variedades ibéricas. Al final, se separó MJ en consonancia con su origen polifilético basado en cruzamientos distintos de razas extranjeras sobre una base inicial de tipo ibérico (Ruiz-Tena y Barba, 2009).

En el conglomerado racial ecuatoriano se evidenció la proximidad entre SE y B, seguida a poca distancia de G, mientras que LR quedó más alejada, porque PY y CC ocuparon posiciones intermedias entre esas tres poblaciones ya citadas y LR. En cualquier caso, las distancias entre las poblaciones americanas en general, y las ecuatorianas en particular, fueron mayores a las observadas en el caso de las variedades genuinas del cerdo ibérico, con excepción del distanciamiento de P y MJ.

populations already mentioned and LR. In any case, the distances between the American populations in general, and the Ecuadorian populations in particular, were greater than those observed in the case of the genuine varieties of the Iberian pig, with the exception of the distance between P and MJ.

CONCLUSIONS

The Ecuadorian pig populations of Bolivar, Guayas, Los Rios and Santa Elena fall within a medium to small body format within the swine species, with morphometric characteristics similar to the other American populations analyzed, but smaller than the Iberian ones; brachycephalic type, with high pelvic index and dorsolumbar line with ascending caudal inclination.

The populations studied have morphometric differences. There are two large groups, the population of American creole pigs and the population of

CONCLUSIONES

Las poblaciones porcinas ecuatorianas de Bolívar, Guayas, Los Ríos y Santa Elena se encuadran dentro de un formato corporal de mediano a pequeño dentro de la especie porcina, de características morfométricas similares a las otras poblaciones americanas analizadas, pero de tamaño menor que las ibéricas. De tipo braquicefálico, con índice pelviano alto y línea dorsolumbar con inclinación caudal ascendente.

Las poblaciones estudiadas tienen diferencias morfométricas. Existen dos grandes grupos, la población de cerdos criollos americanos y la población de cerdos de tipo ibérico. Aunque hay una relación histórica entre las poblaciones tipo ibérico con las poblaciones americanas, estas últimas se han diferenciado de las primeras por el aislamiento geográfico y reproductivo a lo largo de los siglos.

LITERATURA CITADA

- Aparicio M. A., F. González, J. A. Andrada, and J. D. Vargas. 2018. The Mediterranean pig breeds and their environmental impact. Arch. Zootec. Proceedings IX Simposio Internacional sobre el Cerdo Mediterráneo: 1 - 3.
- Barba C., C., J. M. León J. P. Gámiz R., y J. V. Delgado B. 2014. Historia de los cerdos en Iberoamérica y el Caribe. In: Silva F., O. L. (ed). Las Razas Porcinas Iberoamericanas: un Enfoque Etnozootécnico. IF. Baiano Salvador, BA. Brasil. pp: 23-36.
- Barrera G.P., R.A. Martínez, Y. Oregón, A. Ortiz, F. Moreno, H. Velásquez, J. Esteban P., y Y. Abuabara. 2007. Cerdos Criollos Colombianos: Caracterización racial, productiva y genética. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica. Bogotá, Colombia. 40 p.
- Bozzi, R., M. Sklep, H. Lenoir, B. Leuret, J. M. García-Casco, M. Petig, R. Charcena, H. Paixim, D. Karolyi, C. Radovic, M. Gallo, C. Geraci, G. Usai, R. Quintanilla, J. P. Araujo, V. Razmaite, and K. Gnozdanovic. 2018. Survey of demographic and phenotypic data of local pig breeds of Treasure project. Arch. Zootec. Proceedings IX Simposio Internacional sobre el Cerdo Mediterráneo. pp: 1 - 4.
- Cabello R., A. J. M. León J., y C. Barba C. 2007. Contribución a la diferenciación morfológica de las variedades del cerdo ibérico como base para su conservación. In: El cerdo ibérico: caracterización de sus variedades. Diputación de Córdoba. España. pp: 31- 88.
- Carpinetti B., G. Guromalo, J. V. Delgado, y M. Martínez. 2016. El cerdo criollo costero: Valioso recurso zoogenético local de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Arch. Zootec. 65: 403 - 407.
- Castro, G., M. Montenegro, N. Barlocco, A. Vadell, R. Gagliardi, y S. Llambí. 2012. Caracterización zoométrica en el cerdo Pampa Rocha de Uruguay (descriptiva primaria). AICA. 2: 83-86.

Iberian-type pigs. Although there is a historical relationship between Iberian-type populations and American-type populations, the latter have differed from the former because of their geographical and reproductive isolation over the centuries.

—End of the English version—

-----*-----

- Céspedes, R. D., L. D. Huamán, F. Ticona, C. L. Hurtado, J. W. Gómez, y N. C. Gómez. 2016. Caracterización morfológica morfoestructural y faneróptica del porcino criollo (*Sus scrofa*) de Apurímac-Perú. AICA. 7: 48 - 52.
- FAO. 2012. Realización de Encuestas y Seguimiento de los Recursos Zoogenéticos. Directrices FAO: Producción y sanidad animal. N° 7. Roma, Italia. 170 p.
- FAO. 2015. The Second Reporto on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Scherf, B. D. and D. Piling (eds). FAO Comission on Genetic Resources for Food Agriculture Assessments. Rome. 562 p.
- FAO. 2019. Domestical Animal Diversity Information System (DAD-IS.) <http://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/es/> (Consulta: marzo 2019)
- Gama T. L., A. Martínez, J. Cañon, C. Ginja, I. Martín-Burriel, M. A. Revidatti, M. N. Ribeiro, J. Jordana, O. Cortes, N. Sevane, e J. V. Delgado. 2017. Diversidade, identidade e influência de outras razas na formazao das populacoes Crioulas de animais domésticos. Arch. Lat. Prod. Anim. 25: 133 - 139.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). 2019. Censo Nacional Agropecuario 2010. Ecuador. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/> (Consulta: marzo 2019).
- Linares, V., L. Linares, y G. Mendoza. 2011. Caracterización etnozootécnica y potencial carnípero de *Sus scrofa* "cerdo criollo" en Latinoamérica. Ciencia Agropec. 2: 97-100.
- Lorenzo, M., J. Jáuregui, y Ch. Vásquez. 2012. Caracterización del cerdo criollo de la región Cho'rti' el Departamento de Chiquimula, Guatemala. AICA. 2: 103 - 108.
- Nieto, R., J. M. García-Casco, L. Lara, P. Palma-Granados, M. Izquierdo, F. Fernández, E. Diéguez, J. L. Duarte, and N. Batorck-Lukac. 2019. Ibérico (Iberian) pig. European Local Pig Breeds-Diversity and performance. A study of Project Treasure. IntechOpen 1 - 25.
- Núñez-Domínguez, R., R. Ramírez-Valverde, L. A. Saavedra-Jiménez, y J. G. García-Muñiz. 2016. La adaptabilidad de los recursos zoogenéticos Criollos, base para enfrentar los desafíos de la producción animal. Arch. Zootec. 65: 461 - 468.
- Parés, P. M. 2009. Zoometría. In: Valoración Morfológica de los Animales Domésticos. Sañudo, C. (ed). Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Madrid. España. pp: 167 - 198.
- Revidatti, M. A., J. V. Delgado, L. T. Gama, V. Landi, C. Ginja, L. A. Alvarez, J. L. Vega-Pla, and A. M. Martínez. BioPig

- Consortium. 2014. Genetic characterization of local Criollo pig breeds from the Americas using microsatellite markers. *J. Anim. Sci.* 92: 4823 – 4832
- Rodríguez-Galván, G., L. Zaragoza-Martínez, R. Chirino-Ovando, P. Zaragoza-Martínez, P. Ubierno-Corvalán, P. E. Sánchez-Gómez, P. Ponce-Díaz, A. E. Silva-Gómez, y M. E. Camacho-Vallejo. 2018. Los animales domésticos locales para el estar-bien de la familia rural. *Actas Iberoam. Conserv. Anim.* 12: 52 – 58
- Ruiz-Tena, J. L. y C. Barba. 2009. Razas Ganaderas Españolas Porcinas. Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino. Madrid. 171 p.
- SENPLADES (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo). 2015. Agenda Zonal 5-Litoral Centro. Quito. Ecuador. 172 p.
- Sierra V., A. C., J. R. Ortiz O., J. C. Bojórquez C., M. A. Canul S., J. R. Tamayo C., J. C. Rodríguez P., J. R. Sanginés G., M. A. Magaña M., R. C. Montes P., y J. Segura C. 2016. Conservación y uso sustentable del cerdo pelón en Yucatán. *Quehacer Científico en Chiapas* 11: 13-28.
- StatSoft, Inc. 2011. STATISTICA (data analysis software system), version 10. Tulsa, USA.

CRECIMIENTO Y TASA DE INTERCAMBIO DE CO₂ DE MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) OBTENIDO POR SEMILLA

GROWTH AND CO₂ EXCHANGE RATE OF MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) OBTAINED BY SEED

Sonia Teresa Cruz-Vasconcelos¹, Lucero del Mar Ruiz-Posadas^{1,2*}, Edmundo García-Moya²,
Manuel Sandoval-Villa³, Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Fisiología Vegetal, ²Botánica, ³Edafología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados.
56230. Montecillo, Estado de México. (lucpo@colpos.mx)

RESUMEN

La reproducción por semilla promueve la diversidad genética en el maguey (*Agave salmiana*), si la fertilización es la adecuada, podría incrementarse el crecimiento. En el maguey pulquero es una práctica poco común que es necesario estudiar, por lo cual los objetivos de esta investigación fueron: 1) evaluar el efecto del abono y la fertilización en el crecimiento; 2) determinar la tasa de intercambio de CO₂ (TIC) en dos condiciones de humedad del suelo, de tres variantes de *A. salmiana* (subsp. *crassispina*, var. *salmiana* y var. *ferox*) obtenidas de semilla y plantadas en San Bartolomé Actopan, municipio de Temascalapa, Estado de México. La hipótesis fue que las plantas tratadas con fertilización química tendrán mayor crecimiento que las abonadas y el testigo; y las plantas fertilizadas y abonadas tendrán mayor TIC en las dos condiciones de humedad del suelo. El diseño experimental fue completamente al azar con n=11 para variables de crecimiento, n=3 para contenido nutrimental y tasa de intercambio de CO₂. El crecimiento se midió cada mes en plantas de 2.9 a 3.6 años; la tasa de intercambio de CO₂ se midió en plantas de 3.6 años con riego y 3.75 años con estrés hídrico. El abono con cerdaza favoreció la altura, el diámetro de la planta y el número de pencas. La subespecie *crassispina* mostró los valores más altos en las variables evaluadas y *A. salmiana* var. *salmiana* cultivada con fertilización destacó por los hijuelos emitidos. La tasa máxima de intercambio de CO₂ ocurrió entre las 22:00 y 02:00 h y fue mayor en plantas con humedad abundante en el suelo (riego) que en las plantas con humedad por debajo de marchitez permanente (PMP); en esta última condición, las plantas abonadas y fertilizadas tuvieron 60% más de asimilación que en el testigo.

ABSTRACT

Reproduction by seed promotes genetic diversity in maguey (*Agave salmiana*), and if fertilization is adequate, it can increase growth. In pulque maguey, although reproduction by seed is not a common practice, its study is necessary. For this reason, the objectives of this study were 1) to evaluate the effect of organic and chemical fertilization on growth and 2) to determine the CO₂ exchange rate (CER) in two conditions of soil moisture in three variants of *A. salmiana* (subsp. *crassispina*, var. *salmiana* and var. *ferox*) obtained from seed in San Bartolomé Actopan, municipality of Temascalapa, State of Mexico. The hypothesis was that plants treated with chemical fertilizer will have greater growth than those treated with organic fertilizer and the control, and plants fertilized with organic and chemical fertilizer will have a higher CER in two conditions of soil moisture. The experimental design was completely randomized with n=11 for growth variables, n=3 for nutrient content and CO₂ exchange rate. Growth was measured every month in 2.9- to 3.6-year-old plants, and CO₂ exchange rate was measured in 3.6-year-old plants with irrigation and in 3.75-year-old plants under water stress. Organic fertilizer from pig manure favored plant height and diameter and number of leaves. The subspecies *crassispina* had the highest values of the evaluated variables, and *A. salmiana* var. *salmiana* cultivated with chemical fertilization was outstanding for the number of shoots emitted. The highest CO₂ exchange rate occurred between 22:00 and 02:00 h and was higher in plants with abundant soil moisture (irrigated) than in plants with moisture below permanent wilting point. In the latter condition, the plants grown with organic and chemical fertilizer assimilated 60% more CO₂ than the control.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 911-926. 2020.

Key words: organic fertilizer, fertilization, CO₂ assimilation, *A. salmiana* subsp. *crassispina*, *A. salmiana* var. *salmiana* and *A. salmiana* var. *ferox*.

Palabras clave: abono, fertilización, asimilación de CO₂, *A. salmiana* subsp. *crassispina*, *A. salmiana* var. *salmiana* y *A. salmiana* var. *ferox*.

INTRODUCCIÓN

El maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) se cultiva desde la época prehispánica, principalmente para la producción de aguamiel, mezcal y fibra (Mora-López *et al.*, 2011). En el altiplano mexicano (Tlaxcala, Hidalgo, Puebla y Estado de México) el pulque es el principal producto de esta planta y es parte fundamental de la gastronomía, participa en la economía y la cultura de los pueblos. Sin embargo, la superficie plantada disminuyó más de 80% entre 1940 y 2012 (Aguilar *et al.*, 2014). Entre las principales causas que desmotivaron a los productores de magueyes estuvo el desprestigio del pulque, el robo del mixiote y pencas, la longevidad del ciclo de las plantas, la comercialización y la falta de tecnología en la industrialización del pulque (José-Jacinto y García-Moya, 2000; Aguilar *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2018). A pesar del escenario drástico del descenso en la superficie cultivada de maguey, el consumo de pulque es cada vez más popular (Erlwein *et al.*, 2013). Para impulsar el consumo nacional del pulque y atraer ingresos a los productores de maguey, se organizan ferias anuales en honor al pulque en los estados del altiplano mexicano (Nieto *et al.*, 2016).

La propagación de esta especie es un aspecto polémico, ya que por lo general se emplean hijuelos por la facilidad en su manejo agronómico (Gentry, 1982; Álvarez *et al.*, 2018), aunque esto amenace la diversidad genética en las plantaciones. La reproducción permite la recombinación genética de las plantas (Ramírez-Tobías *et al.*, 2011) les proporciona ventajas adaptativas y, además, el productor puede obtener individuos homogéneos en edad.

La fertilización es fundamental en las plantas cultivadas, porque podría disminuir el ciclo del cultivo requerido para la madurez fisiológica, que en el caso del maguey pulquero se estima en 9 a 20 años (Erlwein *et al.*, 2013; Madrigal *et al.*, 2014). Hasta el momento, la fertilización es poco común en este cultivo. Álvarez *et al.* (2018) mencionan que sólo 38.4% de los productores de Tlaxcala y Puebla abona sus plantas; además, Aguilar *et al.* (2014) refieren que al momento del trasplante se aplican 2-3 kg de abono, por lo general estiércol de ovinos, bovinos, caprinos

INTRODUCTION

The pulque maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) is cultivated since pre-Hispanic times, mainly to produce aguamiel, mezcal and fiber (Mora-López *et al.*, 2011). On the Mexican high plateau (Tlaxcala, Hidalgo, Puebla and the state of Mexico), pulque is the main product of this plant and is a major part of the cuisine, the economy and the culture of the people of the region. However, between 1940 and 2012 the cultivated area decreased more than 80% (Aguilar *et al.*, 2014). Among the main causes that have discouraged maguey growers is the low of prestige of pulque, theft of the leaves and mixiote (leaf peel), length of the plant life cycle, commercialization, and the lack of technology for industrializing the pulque (José-Jacinto and García-Moya, 2000; Aguilar *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2018). Despite the drastic reduction in the area cultivated with maguey, pulque consumption is increasingly popular (Erlwein *et al.*, 2013). To boost domestic consumption of pulque and to attract income for maguey growers, annual fairs honoring pulque are organized in the states of the Mexican high plateau (Nieto *et al.*, 2016).

Propagation of this species is a polemic issue since shoots, or hijuelos, have generally been used because they facilitate agronomic management (Gentry, 1982; Álvarez *et al.*, 2018), even though it also threatens genetic diversity in the plantations. Reproduction by seed allows plant genetic recombination (Ramírez-Tobías *et al.*, 2011), which provides adaptive advantages, and the grower can also obtain even-aged individuals.

Fertilization is fundamental in cultivated plants because it can decrease the growing cycle required for physiological maturity, which in the case of the pulque maguey is estimated to be 9 to 20 years (Erlwein *et al.*, 2013; Madrigal *et al.*, 2014). To date, fertilizing this crop is not common. Álvarez *et al.* (2018) mention that only 38.4% of the growers in Tlaxcala and Puebla fertilize their plants. Moreover, Aguilar *et al.* (2014) report that 2 to 3 kg of organic fertilizer is applied at transplant, usually sheep, cattle, or goat manure that is incorporated into the soil, and commonly there are no further applications.

Agaves have crassulacean acid metabolism (CAM) that allows them to absorb CO₂ at night. In these plants the formation of C₄ acids is separated in time

que se incorporan a la tierra y es común que no se hagan aplicaciones posteriores.

Los agaves poseen metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) que les permite tomar CO₂ en la noche. En estas plantas la formación de ácidos C₄ está separada en tiempo y espacio. Por la noche, el CO₂ es fijado por la PEP carboxilasa en el citosol y el malato resultante u otro ácido orgánico de cuatro carbonos es transportado a la vacuola. Al día siguiente la luz estimula el metabolismo fotosintético C₃ en los cloroplastos que fijan CO₂ durante el día, pero gran parte de éste proviene de la descarboxilación del malato y otros ácidos almacenados durante la noche anterior y el CO₂ liberado es fijado por el ciclo de Calvin y el NADPH se utiliza para convertir la triosa fosfato en almidón (Nobel, 1998; Taiz y Zeiger, 2010).

Este metabolismo MAC permite a los agaves crecer donde la precipitación es escasa, las temperaturas son extremas o los suelos son someros y con baja fertilidad; el cultivo de esta planta debería retomarse frente al panorama del cambio climático global como una alternativa de producción. Para motivar a los productores a incrementar la superficie cultivada de maguey, la mejora en las labores agrícolas es fundamental. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del abono orgánico y la fertilización química sobre el crecimiento; además, determinar la tasa de intercambio de CO₂ (TIC) en dos condiciones de humedad del suelo de tres variantes de *Agave salmiana* obtenidos por semilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las parcelas experimentales se establecieron en San Bartolomé Actopan, municipio de Temascalapa, Estado de México, ubicado en 99° 42' 03" O y 19° 43' 35" N, a una altitud de 2400 m. El clima predominante es Bs₁ kw (w) seco, con precipitación de 500 a 700 mm (INEGI, 2009). Las temperaturas oscilan de 5 a 25 °C, enero es el mes más frío y abril-mayo los meses más calurosos (Weather Spark, 2018). El suelo es franco arcilloso con un pH de 8.1 y 2.7% de materia orgánica. La humedad en el suelo a capacidad de campo fue 28% y a punto de marchitez permanente fue 17%. El contenido nutrimental fue Ca 520 mg kg⁻¹, K 35.2 mg kg⁻¹ y Mg 61.9 mg kg⁻¹.

Las tres variantes de *A. salmiana* (subsp. *crassispina*, var. *salmiana* y var. *ferox*) de 18 meses de edad se obtuvieron por semilla y las donó la Protectora de Bosques del Estado de México. Las variantes de *A. salmiana* se establecieron con distribución aleatoria en cada una de las 3 ha en agosto de 2016. La técnica de tras-

and space. During the night, CO₂ is fixed by PEP carboxylase in the cytosol and the resulting malate or other four-carbon organic acid is transported to the vacuole. The following day, light stimulates photosynthetic C₃ metabolism in the chloroplasts that fix CO₂ during the day, but a large part of this comes from the decarboxylation of malate and other acids stored during the previous night. The released CO₂ is fixed by the Calvin cycle, and NADPH is used to convert triose phosphate into starch (Nobel, 1998; Taiz and Zeiger, 2010).

CAM metabolism allows agaves to grow where precipitation is scarce, temperatures are extreme, or soils are shallow and unfertile. In the context of global climate change, cultivation of this plant should be revisited as a production alternative. To motivate growers to increase the area cultivated under maguey, improving agricultural practices is fundamental. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the effect of organic and chemical fertilization on growth and to determine the CO₂ exchange rate (CER) in two conditions of soil moisture and three variants of *Agave salmiana* obtained by seed.

MATERIALS AND METHODS

Experimental plots were established in San Bartolomé Actopan, municipality of Temascalapa, State of Mexico, located at 99° 42' 03" W and 19° 43' 35" N, at an altitude of 2400 m. Predominant climate is Bs₁ kw (w) dry, with precipitation of 500 to 700 mm (INEGI, 2009). Temperatures oscillate between 5 and 25 °C; January is the coldest month, and April and May are the hottest (Weather Spark, 2018). Soil is clay loam with a pH of 8.1 and 2.7% organic matter. Soil moisture at field capacity was 28% and permanent wilting point was 17%. Nutrient content was Ca 520 mg kg⁻¹, K 35.2 mg kg⁻¹ and Mg 61.9 mg kg⁻¹.

The three *A. salmiana* variants (subsp. *crassispina*, var. *salmiana* and var. *ferox*), obtained by seed and donated by Protectora de Bosques of the State of Mexico, were 18 months old. They were established under random distribution in each of the 3 ha in August 2016. The plants were transplanted using the common technique to pits spaced 3 m apart in rows 4 m apart, at a density of 750 plants ha⁻¹.

In each hectare, one of three nutrient treatments was applied: organic fertilizer, chemical fertilizer and no fertilizer (control). Fertilization was applied in two stages, one at transplant (August 2016) and the other in September 2017. Chemical fertilizer was applied as follows: 100 g triple 17 (17-17-17), 121 g urea (46-00-00) and 182 g Yara Star (21-17-3) to each plant. Organic

plante fue cepa común, con un espaciado de 3 m entre plantas y 4 m entre hileras, a una densidad de 750 plantas ha⁻¹.

En cada hectárea se aplicó un tratamiento de nutrición: abono, fertilización y testigo. El abono y la fertilización se efectuaron en dos etapas, una al momento del trasplante (agosto de 2016) y la otra en septiembre de 2017. El tratamiento de fertilización química fue aplicaciones de: 100 g de triple 17 (17-17-17), 121 g de urea (46-00-00) y 182 g de Yara Star (21-17-3) a cada planta; el abono orgánico se aplicó en razón de 3.0 kg de cerdaza por planta, en dos aplicaciones de 1.5 kg. El pH de la cerdaza fue 6.9 y el contenido nutrimental fue: 2.2 g de N, 11.6 g de P y 23.7 g de K por planta.

De enero a septiembre de 2018 se cuantificaron cada mes altura, diámetro de planta (de la espina terminal de una penca a otra, en orientación N-S), longitud de penca (última desplegada), pencas desplegadas, número de pencas vivas e hijuelos. Para medir la tasa de intercambio de CO₂ (TIC), a finales de agosto de 2018 se extrajeron nueve plantas por tratamiento de nutrición (tres plantas de cada variante de *A. salmiana*), se trasplantaron en bolsas de polietileno de 4 kg con suelo circundante a cada planta, se mantuvieron en invernadero durante cinco semanas y se aplicaron tres riegos durante ese tiempo. La caracterización del suelo se realizó en el laboratorio de física de suelos del Colegio de Posgraduados y se determinó la Capacidad de Campo (CC) en 28% y el Punto de Marchitez Permanente en 17%.

Las mediciones a CC se realizaron el 8 y 10 de octubre del 2018 después 48 h de drenaje. Posterior al último riego (6 de octubre de 2018), las plantas se sometieron a estrés hídrico por 7 semanas, se hizo un muestreo del suelo el 25 de noviembre para determinar la humedad del mismo, la cual fue 10%. Las mediciones de la TIC, realizadas el 26 y 27 de noviembre, fueron con ese porcentaje y acorde a la curva de retención de humedad, se encontraba por abajo del PMP. Las mediciones de la TIC se hicieron cada 4 h, durante 20 h en la segunda porción (punta) de la tercera hoja a partir de la última desplegada debido a que por la edad de la hoja (4 a 6 meses) se considera hoja madura con cloroplastos desarrollados y, por lo tanto, fotosíntesis máxima. Para este propósito se usó un equipo portátil para medir fotosíntesis marca LI-COR, modelo 6400XT, con una cámara de 1 cm², la cual incorpora sensores de humedad, transpiración, conductancia, temperatura del aire y de la hoja, radiación fotosintéticamente activa (PAR, siglas en inglés), etc. Con los datos de cada 4 h se calculó el área bajo la curva (Leal, 1999) para definir el porcentaje de asimilación de CO₂ nocturna y diurna.

Los datos se analizaron con el programa SAS® v. 9.0 y el Modelo Lineal Generalizado (MLG); las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Para analizar las variables fisiológicas y de crecimiento hubo 9 y 11 repeticiones por tratamiento.

fertilizer was applied at the rate of 3.0 kg pig manure per plant in two applications of 1.5 kg. pH of the manure was 6.9 and nutrient content was 2.2 g N, 11.6 g P and 23.7 g K per plant.

Each month, from January to September 2018, plant height and diameter (from the terminal spike of a north leaf to another of a south leaf), leaf length (of the last unfurled leaf), unfurled leaves, number of live leaves and number of shoots were calculated. To measure CO₂ exchange rate (CER), in late August 2018, nine plants per nutrition treatment were extracted (three plants of each *A. salmiana* variant) and transplanted to 4-kg polyethylene bags containing soil of that surrounding each plant. They were kept in a greenhouse for five weeks during which they were irrigated three times. Characterization of the soil was carried out in the soil physics laboratory of the Colegio de Postgraduados. Field capacity (FC) was determined at 28% and permanent wilting point (PWP) at 17%.

Measurements at FC were performed on October 8 and 10, 2018, after 48 h of drainage. Later, at the last irrigation (October 6, 2018), the plants were subjected to water stress for seven weeks. After this time, on November 25, the soil was sampled to determine moisture, which was 10%. CER measurements, on November 26 and 27, were done with this percentage and, according to the moisture retention curve, it was below PWP. CER measurements were taken every 4 h for 20 h in the second portion (tip) of the third leaf from the last unfurled leaf since, because of its age (4 to 6 months), it was considered to be mature with developed chloroplasts and, therefore, carrying out maximum photosynthesis. Portable equipment LI-COR®, model 6400XT, was used to measure photosynthesis; this equipment included a 1-cm² chamber which incorporated sensors of moisture, transpiration, conductance, air temperature and leaf temperature, photosynthetically active radiation (PAR), etc. With the data taken every 4 h, the area under the curve was calculated (Leal, 1999) to define the percentage of nocturnal and diurnal CO₂ assimilation.

The data were analyzed with SAS® v. 9.0 and the Generalized Linear Model (GLM); means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). To analyze the physiological and growth variables, there were 9 and 11 replications per treatment.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth variables

During the evaluation period (9 months), total precipitation was 722 mm; the driest month was February with 9.0 mm and the wettest month was July with 182.88 mm. The highest temperature was

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables de crecimiento

Durante el periodo de evaluación (9 meses), la precipitación total fue 722 mm, el mes más seco fue febrero con 9.0 mm y el más lluvioso fue julio con 182.88 mm. En este periodo, la temperatura máxima fue 25 °C de marzo a mayo y la mínima 6 °C en enero (Weather Spark, 2018).

Las variables de crecimiento, excepto pencas desplegadas, tuvieron efectos por la fertilización, variantes de *A. salmiana* y mes de medición. La interacción tratamiento* variante de *A. salmiana* fue estadísticamente significativa en las variables: diámetro de la planta, longitud de penca y número de pencas; la interacción tratamiento*mes fue significativa en altura, diámetro de planta, longitud de pencas y número de pencas; la interacción variante de *A. salmiana**mes no fue significativa (Cuadro 1), por lo que las variantes respondieron de manera similar durante el tiempo de evaluación.

Las plantas de *A. salmiana* con aplicación de abono orgánico destacaron en las variables altura, diámetro y número de pencas. Las plantas que crecieron con fertilización química obtuvieron los valores más altos en altura, longitud de penca y porcentaje de

25 °C from March to May, and the lowest was 6 °C in January (Weather Spark, 2018).

The growth variables, except for unfurled leaves, were affected by fertilization, *A. salmiana* variant and month of measurement. The interaction treatment**A. salmiana* variant was statistically significant in the variables plant diameter, leaf length and number of leaves. The interaction treatment*month was significant in height, plant diameter, leaf length and number of leaves. The interaction *A. salmiana* variant*month was not significant (Table 1): the variants responded in a similar way during the entire evaluation period.

Agave salmiana plants with organic fertilization were outstanding in the variables: height, diameter and number of leaves. The plants that grew with chemical fertilizer reached the highest values in height, leaf length and percentage of plants with shoots. The control plants had higher values in number of leaves, like the plants that received organic fertilizer. There were no statistical differences in number of unfurled leaves among the treatments.

The analysis of *A. salmiana* variants by nutrition treatment shows that the highest values of the evaluated variables were observed in the subsp. *crassispina* and var. *salmiana* cultivated with organic or chemical fertilizer.

Cuadro 1. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos de nutrición, variantes de *Agave salmiana*, mes de muestreo y sus interacciones sobre variables de crecimiento.

Table 1. Analysis of variance of the effect of the nutrition treatments, *Agave salmiana* variants, sampling month and their interactions on growth variables.

FV	GL	h	D	Lp	Np	Pd ^{ns}	pch (%)
Tratamiento (T)	2	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.55	0.0001
Variante (Vr)	2	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.43	0.22
Mes (M)	8	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
T*Vr	4	0.0127	0.0001	0.0002	0.0001	0.97	0.60
T*M	16	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.41	0.0001
Vr*M ^{ns}	16	0.25	0.07	0.06	0.81	0.91	0.20
T*Vr*M	32	0.68	0.71	0.06	0.06	0.99	0.59
Error	890						
CV		9.67	8.84	11.85	14.74	15.34	11.59
r ²		0.87	0.79	0.78	0.39	0.28	0.23

FV: fuente de variación; GL: todas las variables y sus interacciones fueron significativas ($p \leq 0.05$); excepto ns: no significativo; h: altura; D: diámetro de planta; Lp: longitud de penca; Np: número de pencas vivas; Pd: pencas desplegadas; pch: porcentaje de plantas con hijuelos. ♦ FV: source of variation; GL: all the variables and their interactions were significant ($p \leq 0.05$), except ns: not significant; h: height; D: plant diameter; Lp: leaf length; Np: number of live leaves; Pd: unfurled leaves; pch: percentage of plants with shoots.

plantas con hijuelos. Las plantas testigo destacaron sólo en número de pencas al igual que las plantas que recibieron abono. No hubo diferencias estadísticas en el número de pencas desplegadas entre tratamientos. El análisis por variantes de *A. salmiana* por tratamiento de nutrición muestra que en la subsp. *crassispina* y var. *salmiana* cultivadas con abono o con fertilización se observaron los valores más altos en las variables evaluadas (Cuadro 2).

El 81.8% de las plantas de la var. *salmiana* que recibieron fertilización emitieron de uno a cinco hijuelos a los 2 años de establecimiento en campo; las variantes subsp. *crassispina* y var. *ferox* también tuvieron un porcentaje alto de emisión de hijuelos (72%). El número de hijuelos por planta podría rebasar lo reportado por Silos-Espino *et al.* (2011) de que una planta puede producir entre ocho a 10 hijuelos en su vida. Le siguen las plantas abonadas con un promedio de 48%, lo cual indica que una nutrición adecuada permite a la planta emitir rizomas de los que emergen los hijuelos. En cambio, en las plantas testigo la emisión de hijuelos fue baja (9%) por la deficiencia de N, P, K. Sánchez *et al.* (2013) mencionan que la deficiencia de N reduce el crecimiento de las raíces.

La mayor tasa de despliegue de pencas se presentó en los meses más lluviosos (agosto y septiembre) con precipitación de 172 y 144 mm, respectivamente.

Of the var. *salmiana* plants that received chemical fertilizer, 81.8% emitted one to five shoots after two years of establishment in the field. The variants subsp. *crassispina* and var. *ferox* had a high percentage (72%) of shoot emission. The number of shoots per plant could surpass that reported by Silos-Espino *et al.* (2011), that one plant can produce between eight and ten shoots during its lifetime. Plants that received organic fertilizer followed, with an average of 48%, indicating that adequate nutrition allows the plant to emit rhizomes from which shoots emerge. In contrast, emission of shoots of the control plants was low (9%) due to N, P, and K deficiencies. Sánchez *et al.* (2013) mention that N deficiency reduces root growth.

The high rate of leaf unfurling occurred in the rainiest months (August and September) with 172 and 144 mm of rainfall, respectively. This observation agrees with that observed by Nobel (2011), who reported a higher rate of unfurling during the rainy season for *A. deserti* and *A. fourcroydes*. Over nine months, one plant unfurled an average of four leaves, coinciding with that reported by Nobel (2011) and García-Moya *et al.* (2011) for *A. salmiana* with five leaves per year. Therefore, when availability of water for these plants is substantial, it eliminates the limitation of CO₂ absorption and, thus, of growth.

Cuadro 2. Efecto del tratamiento de nutrición sobre las variables de crecimiento en las tres variantes de *Agave salmiana*.

Table 2. Effect of the nutrition treatment on growth variables of the three *Agave salmiana* variants.

Tratamiento	Variantes de <i>A. salmiana</i>	h (cm)	D (cm)	Lp (cm)	Np	Pd	pch (%)
Abono orgánico	subsp. <i>crassispina</i>	28.7 a	37.5 a	29.6 a	8.3 bc	3.9 a	54.5 b
	var. <i>salmiana</i>	27.9 a	35.1 b	29.4 a	9.0 a	4.1 a	54.5 b
	var. <i>ferox</i>	25.5 b	34.3 bc	26.0 c	7.9 cd	3.7 a	36.4 c
Fertilización química	subsp. <i>crassispina</i>	28.7 a	34.0 bc	30.8 a	8.3 bc	4.1 a	72.7ab
	var. <i>salmiana</i>	28.0 a	33.7 c	29.4 a	7.4 de	3.7 a	81.8 a
	var. <i>ferox</i>	26.3 b	33.1 c	27.3 b	7.1 e	3.6 a	72.7ab
Testigo	subsp. <i>crassispina</i>	19.0 c	26.6 d	20.2 d	8.4 bc	3.7 a	0.0 d
	var. <i>salmiana</i>	17.9 d	26.3 d	19.7de	8.6 ab	3.6 a	9.1 d
	var. <i>ferox</i>	17.0 d	25.9 d	18.8 e	8.6 ab	3.3 a	9.1 d
DHS		1.07	1.19	1.29	0.53	0.08	18

h: altura, D: diámetro de planta, Lp: longitud de penca, Np: número de pencas, Pd: pencas desplegadas de enero a septiembre, pch: porcentaje de plantas con hijuelos; DHS: diferencia honesta significativa. Los valores reportados son el promedio de nueve mediciones mensuales, excepto Pd que correspondió al promedio al final del periodo. Letra distintas en una columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ h: height; D: plant diameter; Lp: leaf length; Np: number of leaves; Pd: unfurled leaves from January to September; pch: percentage of plants with shoots; DHS: honest significant difference. The values reported are the averages of nine monthly measurements, except for Pd, which was the average at the end of the period. Different letters in a column indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

Esta observación concuerda con lo observado por Nobel (2011) de una mayor tasa de despliegue en la temporada de lluvias para *A. deserti* y *A. fourcroydes*. En el transcurso de 9 meses, una planta desplegó en promedio cuatro pencas, lo cual concuerda con lo reportado por Nobel *et al.* (1992) y García-Moya *et al.* (2011) para *A. salmiana*, con cinco pencas desplegadas al año. Por lo tanto, la disponibilidad de agua para estas plantas es sustancial porque elimina la limitación de la absorción de CO₂ y por ende, del crecimiento.

La mayoría de las variables evaluadas fueron favorecidas por la cerdaza, por sus componentes lábiles o de fácil mineralización: N, P y K₂O, lo que permitió la liberación del nitrógeno aprovechable en las primeras semanas (Figuroa-Barrera *et al.*, 2012), ya que pese a su bajo contenido nutrimental, la planta aprovechó los nutrientes.

Tasas de intercambio de CO₂

Tasa de intercambio de CO₂ en condiciones de riego

Las mediciones de la tasa de intercambio de CO₂ (TIC) se realizaron con humedad del suelo a capacidad de campo. El clima se caracterizó como días con nublado parcial, con presencia de precipitación. La humedad relativa en el periodo diurno osciló de 28 a 70% y nocturno de 53 a 95%. La temperatura del aire dentro del invernadero varió de 18 a 40 °C, con la mínima a las 06:00 h y la máxima a las 14:00 h. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) promedio durante el día: a las 10:00 h, 344 μmol m⁻² s⁻¹; a las 14:00 h, 285 μmol m⁻² s⁻¹; y a las 18:00 h, 1.6 μmol m⁻² s⁻¹.

El análisis de varianza mostró que fue significativo (p ≤ 0.05) el efecto de los tratamientos de nutrición, variantes de *A. salmiana* y la interacción tratamiento* variante de *A. salmiana*, durante el período nocturno (18:00, 22:00 y 02:00 h), y en el período diurno (10:00 y 14:00 h) sólo hubo significancia en el tratamiento (Cuadro 3).

La TIC tuvo dos picos máximos dentro del ciclo circadiano, a las 22:00 h y entre las 10:00 y las 14:00 h. En los intervalos nocturnos (22:00, 02:00 y 06:00 h), la máxima TIC fue a las 22:00 h; sobresalen las plantas que crecieron con fertilización química y testigo con 24.7 y 24.1 μmol m⁻² s⁻¹, respectivamente. A las

Most of the variables evaluated were favored by the pig manure because of its labile, or easily mineralized, components: N, P, and K₂O, permitting release of available nitrogen during the first weeks (Figuroa-Barrera *et al.*, 2012). Thus, despite the low nutrient content of the manure, the plants were able to use the nutrients.

CO₂ exchange rates

CO₂ exchange rate in conditions of irrigation

CO₂ exchange rates (CER) were measured with soil moisture at field capacity. Weather was partly cloudy with precipitation. Relative humidity during the day oscillated from 28 to 79% and at night it was 53 to 95%. Air temperature in the greenhouse changed from 18 to 40 °C, with the low temperature at 06:00 h and the high at 14:00 h. Average photosynthetically active radiation (PAR) during the day was: at 10:00 h, 344 μmol m⁻² s⁻¹; at 14:00 h, 285 μmol m⁻² s⁻¹; and at 18:00 h, 1.6 μmol m⁻² s⁻¹.

The analysis of variance showed that the effect of the nutrition treatments, *A. salmiana* variants, and the interaction treatment**A. salmiana* variant was significant (p ≤ 0.05) during the nocturnal period (18:00, 22:00 and 02:00 h) and in the diurnal period (10:00 and 14:00 h) only treatment was significant (Table 3).

CER had two maximum peaks in the circadian cycle, at 22:00 h and between 10:00 and 14:00 h. In the nocturnal intervals (22:00, 02:00 and 06:00 h), the highest CER occurred at 22:00 h, and the plants that grew with chemical fertilization and the control were outstanding with 24.7 and 24.1 μmol m⁻² s⁻¹, respectively. At 06:00 h, the lowest values occurred. And in the diurnal intervals (10:00 and 14:00 h), the control with the highest CO₂ exchange rates (20.2 μmol m⁻² s⁻¹) at 14:00 h, followed by plants that grew with chemical fertilization, with a maximum CER of 13.1 μmol m⁻² s⁻¹ at 10:00 h.

The *A. salmiana* plants in conditions of field capacity assimilated CO₂ mainly during the night, but also significantly during the day. By integrating the area under the curve by treatment, we found that of the total CO₂ assimilated over 20 h (Figure 1), diurnal assimilation was 23, 37 and 45% for plants with organic fertilizer, chemical fertilization and the control, respectively. Therefore, soil moisture was the

Cuadro 3. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos de nutrición, variantes de *Agave salmiana* y su interacción sobre las horas evaluadas, con humedad en el suelo a CC.

Table 3. Analysis of variance of the effect of the nutrition treatments, *Agave salmiana* variants and their interaction on the hours evaluated with soil moisture at field capacity.

FV	GL	18:00	22:00	02:00	06:00 ^{ns}	10:00	14:00
Tratamiento (T)	2	0.0001	0.0171	0.0063	0.11	0.0001	0.0001
Variante (Vr)	2	0.0001	0.0307	0.0138	0.46	0.0352	0.15
T*Vr	4	0.0305	0.0013	0.0016	0.48	0.18	0.35
Error	26						
CV		14.35	9.52	14.12	24.04	25.19	38.18
r ²		0.88	0.72	0.74	0.36	0.84	0.79

FV: fuente de variación; GL: significativo ($p \leq 0.05$); excepto ns: no significativo. ♦ FV: source of variation; GL: significant ($p \leq 0.05$); except ns: not significant.

06:00 h se presentaron los valores más bajos. Y en los intervalos diurnos (10:00 y 14:00 h), el testigo con las tasas de intercambio de CO₂ más elevadas (20.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a las 14:00 h, seguido de las plantas que crecieron con fertilización química, con una TIC máxima de 13.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a las 10:00 h.

Las plantas de *A. salmiana* en condiciones de capacidad de campo asimilaron CO₂ principalmente durante la noche, pero también de manera significativa durante el día. Al integrar el área bajo la curva por tratamiento se encontró que del total de CO₂ asimilado durante 20 h (Figura 1), la asimilación diurna fue 23, 37 y 45% para plantas con abono orgánico, fertilización química y testigo, respectivamente. Por lo tanto, la humedad del suelo fue el factor determinante en la apertura estomática independiente de la fertilización en las variantes de *A. salmiana* evaluadas. La fase III del ciclo MAC que se presenta en las horas de mayor iluminación, 10:00 a 14:00 h, cuando la resistencia estomática es alta en condiciones de poca a nula humedad en el suelo, no se manifestó debido a que este elemento no fue un factor limitativo, por lo que parte del CO₂ requerido por la planta se fijó en el periodo de luz.

Las variantes crecidas con abono orgánico, tuvieron el pico máximo de la TIC a las 22:00 h, la var. *salmiana*, la var. *ferox* y subsp. *crassispina* obtuvieron en promedio 23.7, 21.5 y 19.4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Las plantas que crecieron con fertilización química tuvieron el pico máximo de la TIC a las 22:00 h; la subsp. *crassispina*, var. *ferox* y la var. *salmiana* obtuvieron 28.9, 25.4 y 19.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

determining factor in stomatic opening regardless of fertilization to the *A. salmiana* variants evaluated. Phase III of the CAM cycle, which occurs during the hours of highest illumination 10:00 to 14:00 h, where stomatic resistance is high in conditions of little to no moisture in the soil, was not manifested because water was not a limiting factor. Therefore, part of the CO₂ required by the plant was fixed during the period of light.

The variants grown with organic fertilizer had a maximum CER peak at 22:00 h; var. *salmiana*, var. *ferox* and subsp. *crassispina* had on average 23.7, 21.5 and 19.4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. Plants grown with chemical fertilizer had maximum CER peaks at 22:00 h; subsp. *crassispina*, var. *ferox* and var. *salmiana* reached 28.9, 25.4 and 19.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. At 06:00 h there was a decrease, with values of 6 to 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a spike at 10:00 h; var. *ferox* with 15.6 and subsp. *crassispina* with 13.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were outstanding. The control plants also reached maximum CER at 22:00 h, subsp. *crassispina* with 26.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and the varieties *ferox* and *salmiana* with 24.3 and 21.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. During the day, there was a major spike between 10:00 and 14:00 h, with values of 19.5 to 20.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

The three *A. salmiana* variants reached an average maximum CER of 23.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, similar to the results of Nobel *et al.* (1992) with *A. salmiana* and *A. mapisaga* in field conditions, with maximum peaks of CO₂ capture at 20:00 h with 29 and 34 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In another study with 4-year-old *A. angustifolia*, the peak occurred between 20:00 and 02:00 h, with

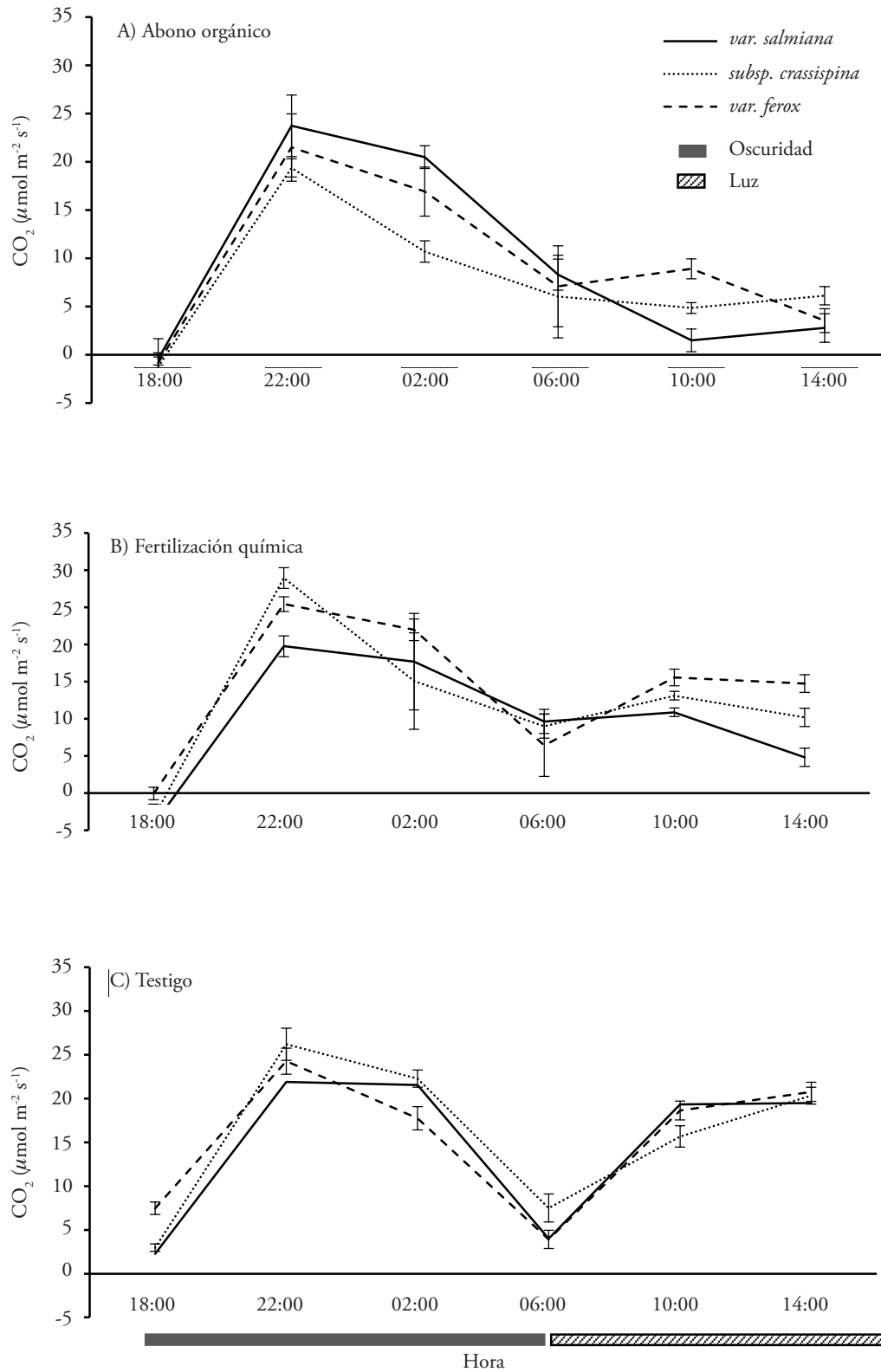


Figura 1. Tasa de intercambio de CO₂ (TIC) en tres variantes de *Agave salmiana* con humedad en el suelo a capacidad de campo. Las barras verticales indican el error estándar, n=3.

Figure 1. CO₂ exchange rate (CER) in three *Agave salmiana* variants with soil moisture at field capacity. Vertical bars indicate standard error, n=3.

respectivamente. A las 06:00 h hubo un descenso con valores de 6 a $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un repunte a las 10:00 h, y sobresalen la var. *ferox* con 15.6 y la subsp. *crassispina* con $13.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas testigo, también alcanzaron la TIC máxima a las 22:00 h; la subsp. *crassispina* con $26.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y las variedades *ferox* y *salmiana*, 24.3 y $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el periodo diurno hubo un repunte importante entre las 10:00 y las 14:00 h, con valores de 19.5 a $20.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las tres variantes de *A. salmiana* alcanzaron una TIC máxima promedio de $23.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo cual es semejante al estudio de Nobel *et al.* (1992) en *A. salmiana* y *A. mapisaga* en condiciones de campo, con picos máximos de captura de CO_2 a las 20:00 h con 29 y $34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En otro estudio en *A. angustifolia* de cuatro años de edad, el pico se presentó entre 20:00 y 02:00 h con una tasa máxima de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (José-Jacinto y García-Moya, 1995) y *A. tequilana* las tasas máximas reportadas fueron de 8 a $19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el periodo nocturno durante el año (Nobel, 1998; Pimienta-Barrios *et al.*, 2006).

La TIC diurna fue algo inesperado del metabolismo MAC típico, en específico para las plantas fertilizadas y testigo en las cuales la TIC diurna fue 37 % y 45%, respectivamente. Sin embargo, en *A. tequilana* en condiciones de campo, con asimilación diurna y nocturna de CO_2 , más del 80% ocurrió en la noche (Pimienta-Barrios *et al.*, 2005). La asimilación nocturna en *A. angustifolia* bajo condiciones de riego, contribuyó 70-85 % del total diario (Winter *et al.*, 2014). Además, en plantas jóvenes de *A. salmiana* con limitaciones de humedad se presenta plasticidad fotosintética (Ramírez *et al.*, 2013).

Los factores ambientales más relacionados con la TIC son la temperatura y la humedad relativa (Pimienta-Barrios *et al.*, 2006). Hartsock y Nobel (1976) informaron que cuando la humedad del suelo no fue un factor limitante en *A. deserti*, la apertura de estomas se registró durante el día y 97% del CO_2 requerido por la planta se fijó en el periodo de luz. Por lo tanto, es posible que las condiciones favorables de invernadero con alta humedad relativa diurna (28 a 70%) y nocturna (53-95%), temperaturas del aire mínima y máxima de 18 y 40 °C, favorecieron la asimilación neta de CO_2 durante el día y la noche. La TIC diurna, además de optimizar la ganancia de carbono, también podría ser un mecanismo de enfriamiento de la planta a través de la transpiración,

a maximum rate of $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (José-Jacinto and García-Moya, 1995), and with *A. tequilana* the maximum rates reported were 8 to $19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the nocturnal period during the year (Nobel, 1998; Pimienta-Barrios *et al.*, 2006).

Diurnal CER differed somewhat unexpectedly from typical CAM metabolism, specifically for the fertilized plants and the control where diurnal CER was 37% and 45%, respectively. However, in *A. tequilana* in field conditions, with diurnal and nocturnal CO_2 assimilation, more than 80% occurred at night (Pimienta-Barrios *et al.*, 2005). Nocturnal assimilation in *A. angustifolia* under conditions of irrigation contributed 70-85% of the daily total (Winter *et al.*, 2014). Moreover, in young *A. salmiana* plants with limited moisture, photosynthetic plasticity occurs (Ramírez *et al.*, 2013).

The environmental factors most related to CER are temperature and relative humidity (Pimienta-Barrios *et al.*, 2006). Hartsock and Nobel (1976) reported that when soil moisture was not a limiting factor in *A. deserti*, stoma aperture was registered during the day, and 97% of the CO_2 required by the plant was fixed during the period with light. Therefore, it is possible that the favorable conditions in the greenhouse, with high diurnal (28 to 70%) and nocturnal (53-95%) relative humidity and minimum and maximum air temperatures of 18 and 40 °C, favored net CO_2 assimilation during the day and night. Diurnal CER, besides optimizing carbon gain, could also be a cooling mechanism for the plant through transpiration when there is sufficient water available in the soil and in the leaves (Lujan *et al.*, 2009). The control plants, which grew with nutritional limitations, took advantage of the seasonal rainfall to maximize CO_2 assimilation because plants synthesize their metabolic and structural compounds with determined chemical elements that are found in their surroundings. Carbon is obtained from the CO_2 in the air, which is incorporated into the organic matter through the process of photosynthesis (Alcántar *et al.*, 2013). However, it is not clear why plants provided with organic and chemical fertilizers had lower diurnal CER than the control plants under these conditions of moisture.

The CO_2 captured during the night is stored in the vacuole and is released during the day to enter the chloroplasts where it is fixed by RuBisCO by means

mientras haya suficiente agua disponible en el suelo o dentro de las pencas (Lujan *et al.*, 2009). En las plantas testigo, que crecieron con limitaciones nutricionales, se aprovechó la humedad temporal para la máxima asimilación de CO₂, porque las plantas sintetizan sus compuestos metabólicos y estructurales con determinados elementos químicos que se encuentran en el medio que las rodea. El carbono proviene del CO₂ de aire, el cual se incorpora en la materia orgánica a través del proceso de fotosíntesis (Alcántar *et al.* 2013). Sin embargo, no está claro porqué las plantas abonadas y fertilizadas presentaron menor TIC diurna que el testigo bajo estas condiciones de humedad.

El CO₂ capturado durante la noche se almacena en la vacuola y se libera durante el día para entrar en los cloroplastos en los que se fija por RuBisCO mediante el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Borland *et al.*, 2009). Sin embargo, la incorporación del CO₂ capturado en el día, pudo ingresar de manera directa al ciclo de Calvin como ocurre con las plantas C₃.

Tasa de intercambio de CO₂ en condiciones de baja humedad en el suelo

Las evaluaciones se realizaron en plantas de *A. salmiana* en una baja humedad del suelo (menor al PMP). Esos días presentaron nublados parciales, humedad relativa diurna entre 35 a 82% y nocturna entre 54 a 95%. La temperatura del aire osciló en la noche de 12 a 18 °C y en el día de 16 a 35 °C. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) promedio durante el día: a las 10:00 h, 0.17 μmol m⁻² s⁻¹; a las 14:00 h, 310 μmol m⁻² s⁻¹; y a las 18:00 h, 105.9 μmol m⁻² s⁻¹.

El análisis de varianza mostró que fue significativo (p≤0.05) el efecto de los tratamientos de nutrición en el periodo nocturno (18:00, 22:00 y 02:00 h) y en el diurno, a las 10:00 h. El efecto de variantes de *A. salmiana* y la interacción tratamiento* variante de *A. salmiana* durante el periodo nocturno sólo fue significativo (p≤0.05) a las 18:00 h, y en el período diurno el efecto del tratamiento fue significativo a las 10:00 h (Cuadro 4).

La mayor TIC fue a las 02:00 h, sin diferencia entre plantas que recibieron abono y fertilización con 13.8 y 13.1 μmol m⁻² s⁻¹, pero sí hubo diferencia con plantas testigo (8.7 μmol m⁻² s⁻¹). A las 22:00 h la mayor TIC fue en plantas que recibieron abono con 12.3 μmol m⁻² s⁻¹. Durante el periodo diurno (10:00

of the Calvin-Benson-Bassham cycle (Borland *et al.*, 2009). However, the incorporation of CO₂ captured during the day could enter directly into the Calvin cycle as occurs with C₃ plants.

CO₂ exchange rate in conditions of low soil moisture

Agave salmiana plants grown with low soil moisture (lower than PWP) were evaluated. During evaluations, the days were partly cloudy with diurnal relative humidity between 35 and 82% and nocturnal RH between 54 and 95%. Air temperature oscillated from 12 to 18 °C at night and 16 to 35 °C during the day. Average photosynthetically active radiation (PAR) during the day was: at 10:00 h, 0.17 μmol m⁻² s⁻¹; at 14:00 h, 310 μmol m⁻² s⁻¹; and at 18:00 h, 105.9 μmol m⁻² s⁻¹.

The analysis of variance showed that the effect of the nutrition treatments was significant (p≤0.05) in the nocturnal period (18:00, 22:00 and 02:00 h) and in the diurnal period, at 10:00 h. The effect of *A. salmiana* variants and the interaction treatment**A. salmiana* variant during the nocturnal period was significant (p≤0.05) only at 18:00 h, and in the diurnal period the effect of treatment was significant at 10:00 h (Table 4).

The highest CER occurred at 02:00 h, with no difference between plants that received organic fertilizer and those that received chemical fertilizer with 13.8 and 13.1 μmol m⁻² s⁻¹, but there were differences with control plants (8.7 μmol m⁻² s⁻¹). At 22:00 h, the highest CER occurred in plants that received organic fertilizer with 12.3 μmol m⁻² s⁻¹. During the day (10:00 to 18:00 h), CER values were negative, -0.4 to -5.5 μmol m⁻² s⁻¹, contrasting with the nocturnal period.

The plants cultivated with organic fertilizer had a maximum CER peak between 22:00 h and 02:00 h. The var. *salmiana*, var. *ferox* and subsp. *crassispina* had averages of 15.04, 12.6 and 12.2 μmol m⁻² s⁻¹. In contrast, the variants cultivated with chemical fertilizer had maximum CER at 02:00 h. The subsp. *crassispina* and the varieties *salmiana* and *ferox* reached values of 16.7, 13.5 and 11.3 μmol m⁻² s⁻¹, respectively. The control plants had a maximum CER at 02:00 h: the subsp. *crassispina* and var. *salmiana* with 9.0 and 8.8 μmol m⁻² s⁻¹ and var. *ferox* with 8.2 μmol m⁻² s⁻¹. Unlike the plants fertilized with

Cuadro 4. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos de nutrición, variantes de *Agave salmiana* y su interacción sobre las horas evaluadas, con humedad en el suelo por debajo del PMP.

Table 4. Analysis of variance of the effect of the nutrition treatments, *Agave salmiana* variants and their interaction at the evaluated hours with soil moisture below permanent wilting point.

	FV	GL	18:00	22:00	02:00	06:00 ^{ns}	10:00	14:00 ^{ns}
Tratamiento (T)	2		0.0080	0.0002	0.0073	0.75	0.0046	0.41
Variante (Vr)	2		0.0217	0.0705	0.57	0.13	0.14	0.11
T*Vr	4		0.0452	0.0670	0.48	0.11	0.26	0.41
Error		26						
CV			8.24	10.91	11.89	20.67	21.85	-8.38
r ²			0.65	0.71	0.49	0.43	0.57	0.37

FV: fuente de variación; GL: significativo $p \leq 0.05$; excepto *ns*: no significativo. ♦ FV: source of variation; GL: significant $p \leq 0.05$; except *ns*: not significant.

a 18:00 h) todos los valores de TIC fueron negativos, con valores de -0.4 a $-5.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en contraste con el periodo nocturno.

Las plantas cultivadas con abono orgánico tuvieron el pico máximo de TIC entre 22:00 y 02:00 h. La var. *salmiana*, la var. *ferox* y subsp. *crassispina* obtuvieron en promedio 15.04, 12.6 y $12.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En contraste, las variantes cultivadas con fertilización tuvieron la máxima TIC a las 02:00 h. La subsp. *crassispina*, las variedades *salmiana* y *ferox* obtuvieron valores de 16.7, 13.5 y $11.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Las plantas testigo presentaron un máximo de TIC a las 02:00 h; la subsp. *crassispina* y var. *salmiana* con 9.0 y $8.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la var. *ferox* de $8.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A diferencia de las plantas abonadas y fertilizadas, en las plantas testigo la TIC a las 06:00 h tuvo una ligera disminución ($\approx 23\%$) en comparación con la de 02:00 h.

Los valores obtenidos en la TIC máxima posterior a una restricción en la humedad del suelo durante 7 semanas causó tasas menores, comparadas a las presentadas en la primera medición con humedad del suelo, lo cual concuerda con lo observado por Nobel (1985) para *A. fourcroydes* y por Winter *et al.* (2014) para *A. angustifolia* después de 11 d para la primera especie y dos semanas para la segunda especie, del cese de la irrigación. El estrés por sequía se manifestó como una disminución continua en la tasa de intercambio de CO_2 . La respuesta inmediata de la planta por la falta del agua en el suelo fue la captación de CO_2 solo durante la noche, típico de plantas MAC,

organic and chemical fertilizer, the CER of control plants at 06:00 h had a slight decrease ($\approx 23\%$) relative to that at 02:00 h.

The maximum CER values obtained after a restriction of soil moisture for seven weeks caused lower rates, compared with those of the first measurement with soil moisture, coinciding with that observed by Nobel (1985) in *A. fourcroydes* and by Winter *et al.* (2014) in *A. angustifolia*, 11 d for the former species and two weeks for the latter species after irrigation ceased. Drought stress was manifested as a continuous decrease in the CO_2 exchange rate. The immediate response of the plant to lack of water in the soil was CO_2 capture only during the night, typical of CAM plants, which open stomata during the hours of darkness to minimize loss of water through transpiration, as reported by Casierra and González (2009) and Nobel (2011).

The average maximum CO_2 exchange rate in plants cultivated with organic fertilizer was $13.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and, with chemical fertilizer, it was $13.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 2), while the control plants had on average $8.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\approx 40\%$ less). These results suggest that organic and chemical fertilization is important for productivity of *A. salmiana* variants in conditions of drought. Nobel *et al.* (1988) found that nitrogen and phosphorus applied separately to *A. lechuguilla* cultivated in the field increased the net CO_2 exchange rate, while fertilization with potassium and boron generated differences in nocturnal assimilation of CO_2 .

en las cuales la apertura de estomas en las horas de oscuridad minimiza la pérdida de agua por transpiración, como lo reportaron Casierra y González (2009) y Nobel (2011).

El promedio de la tasa de intercambio de CO₂ máxima en plantas cultivadas con abono orgánico fue 13.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con fertilización química 13.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2), mientras que las plantas testigo tuvieron en promedio 8.7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (\approx 40% menos). Estos resultados sugieren que el abono y la fertilización son importantes en la productividad de las variantes de *A. salmiana* en condiciones de sequía. Nobel *et al.* (1988) encontraron que la aplicación de nitrógeno y fósforo, por separado, en *A. lechuguilla* cultivada en campo, aumentó la tasa neta de intercambio de CO₂; la fertilización con potasio y con boro generó diferencias en asimilación nocturna de CO₂.

Las plantas fertilizadas no mostraron síntomas de estrés cuando la humedad del suelo fue inferior al PMP, mientras que en plantas C3 y C4, una vez que se alcanza el PMP (-1.5 MPa), sólo algunas plantas pueden recuperarse (Nobel, 2005), lo cual también está relacionado con la succulencia foliar y el espesor de la cutícula, lo que refuerza la importancia de este suministro interno de agua para garantizar un alto rendimiento fotosintético durante todo el año (Pimienta-Barrios *et al.*, 2001).

El MAC demuestra una eficiencia alta de uso del agua y permite que estas plantas colonicen ambientes precarios por falta de humedad, altas temperaturas y suelos pobres en nutrientes. Las cactáceas logran incluso valores de productividad elevados en estos lugares (Matiz *et al.*, 2013; Winter *et al.*, 2014), lo cual es importante considerar ante el panorama del cambio climático mundial que advierte la intensificación de la aridez, con la posible desertificación en el mundo (Matiz *et al.*, 2013), y donde los agaves tienen una función importante por su resistencia a las condiciones extremas de temperatura y su productividad alta en condiciones de escasez de agua.

CONCLUSIONES

El abonado orgánico o fertilización química mejoró el crecimiento de la planta de maguey pulquero, por lo cual el uso del abono orgánico es una alternativa ecológica que favoreció el crecimiento de las tres variantes de *A. salmiana* estudiadas. El crecimiento

The fertilized plants did not show symptoms of stress when soil moisture was below PWP, while only some C₃ and C₄ plants, once PWP is reached (-1.5 MPa), can recover (Nobel, 2005). This is also related to leaf succulence and cuticle thickness, reinforcing the importance of this internal water supply to guarantee high photosynthetic yield during the entire year (Pimienta-Barrios *et al.*, 2001).

CAM is highly efficient in water use and allows these plants to colonize environments that are precarious because of the lack of moisture, high temperatures and nutrient-poor soils. Cactaceae can achieve high productivity in these places (Matiz *et al.*, 2013; Winter *et al.*, 2014). This is important to consider in the face of world climate change that forewarns intensification of aridity, with possible desertification worldwide (Matiz *et al.*, 2013). Agaves have an important function because of their resistance to extreme temperature conditions and their high productivity in conditions of water scarcity.

CONCLUSIONS

Both organic and chemical fertilization improved growth of the pulque maguey. Thus, the use of organic fertilizer is an ecological alternative that can favor growth of the three *A. salmiana* variants studied. Growth of the subspecies *crassispina* cultivated with organic fertilizer was favored, and the var. *salmiana* cultivated with chemical fertilizer had a high percentage of shoot emission.

Soil moisture was the most limiting factor in *A. salmiana* variants for CO₂ exchange rates because at field capacity photosynthetic metabolism was modified and assimilation occurred during both nocturnal and diurnal periods. In contrast, *A. salmiana* in conditions of soil moisture below permanent wilting point assimilated CO₂ only during the night. Plants that received organic or chemical fertilizer assimilated 60% more than the control, indicating that nutrition is fundamental for plant growth in conditions of drought.

—End of the English version—

-----*-----

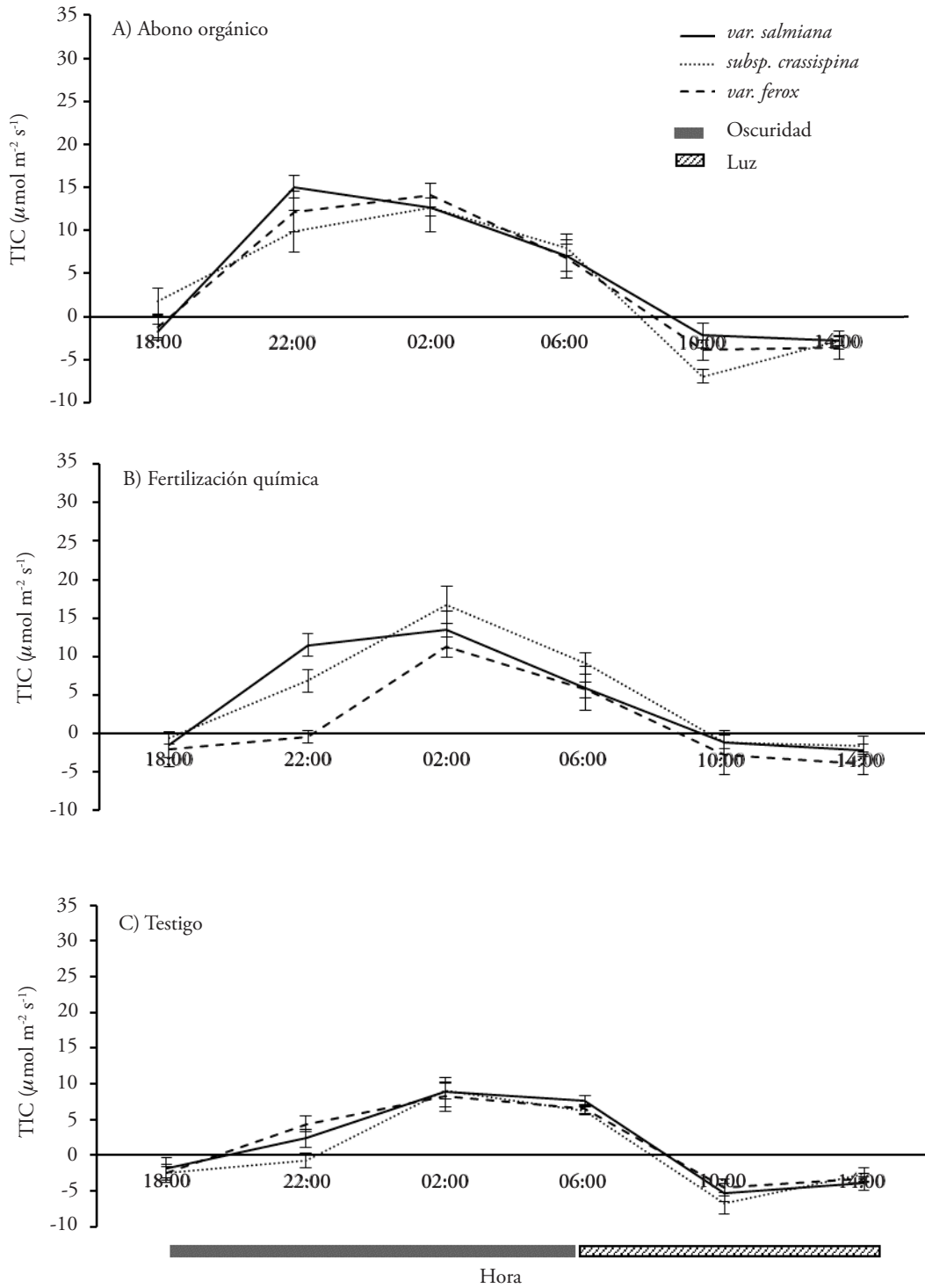


Figura 2. Tasa de intercambio de CO₂ en tres variantes de *A. salmiana* con humedad en el suelo por debajo de PMP. Las barras verticales indican el error estándar, n=3.

Figure 2. CO₂ exchange rate in three *A. salmiana* variants with soil moisture below PWP. Vertical bars indicate standard error, n=3 error.

de la subespecie *crassispina* cultivada con abono orgánico se favoreció y la var. *salmiana* cultivada con fertilización química tuvo un porcentaje alto de emisión de hijuelos.

El agua en el suelo fue el factor más limitativo en variantes de *A. salmiana* para la tasas de intercambio de CO₂, porque a capacidad de campo modificó el metabolismo fotosintético y causó asimilación durante el periodo nocturno y diurno. En cambio, las variantes de *A. salmiana* en condiciones de humedad menores al PMP sólo realizaron asimilación de CO₂ durante la noche; y las plantas abonadas o fertilizadas tuvieron 60% más de asimilación que el testigo, lo cual indica que la nutrición es fundamental para el crecimiento de las plantas en condiciones de sequía.

LITERATURA CITADA

- Aguilar J. B., J. R. Enríquez del Valle, G. Rodríguez-Ortiz, D. Granados S., y B. Martínez C. 2014. El estado actual de *Agave salmiana* y *A. mapisaga* del Valle de México. *Rev. Mex. Agroecosistemas* 1: 106-120.
- Alcántar, G. G., L. Trejo-Téllez, P. Fernández L., y M. N. Rodríguez M. 2013. Cap. 2 Elementos esenciales. *In: Nutrición de cultivos*. Alcántar, G. G., y L. Trejo-Téllez (eds). Colegio de Posgraduados. pp: 8-47.
- Álvarez, D., M. C., E. García-Moya, J. Suárez-Espinosa, M. Luna-Cavazos, y M. Rodríguez-Acosta. 2018. Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala, México. *Polibotánica* 45: 205-222.
- Borland A., M. Griffiths, H. Hartwell, J., and J. A. C. Smith. 2009. Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *J. Exp. Bot.* 60: 2879-2896.
- Casierra P, F., y M. González D. 2009. Cambio circadiano de pH y acidez titulable en la savia de fique (*Furcraea castilla* y *F. macrophylla*). *Rev. Orinoquia* 13: 5-13.
- Erlwein, S., R. J. Mira T., y A. Velasco P. 2013. Proceso de elaboración del pulque, su importancia económica y concepción social en Apan, Hidalgo. *In: Ramos R., J. L. (ed). Ejercicios Etnográficos, Aprendiendo a Investigar*. Ciudad de México, México. ENAH-INAH. pp: 59-103.
- Figueroa B., A., J. G. Álvarez H., A. F. Forero, C. Salamanca, y L. P. Pinzón. 2012. Determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable y la tasa de mineralización de nitrógeno en materiales orgánicos. *Rev. Temas Agrarios* 17: 32 - 43.
- García-Moya, E., A. Romero-Manzanares, and P. S. Nobel. 2011. Highlights for Agave productivity. *CGB Bioenergy* 3: 4-14.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 670 p.
- Hartsock, L. T., and P. S. Nobel. 1976. Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature*. 262: 574-576.
- INEGI. 2009. *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*, Temascalapa, México. Clave Geoestadística 15084.
- José-Jacinto, R., y E. García-Moya, E. 1995. Fijación de CO₂ en *Agave angustifolia* Haw. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 57: 5-10.
- José-Jacinto, R. y García-Moya, E. 2000. Remoción cuticular ("Mixiote") y desarrollo foliar en los Agaves Pulqueros (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*). *Bol. Soc. Bot. Méx.* 66: 73-79.
- Leal L., V. M. Estudio fisiológico y anatómico de la proliferación en maíz (*Zea mays* L.). 1999. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. pp: 26-51.
- Lujan R., F. Lledías, L. Martínez, R. Barreto, G. Cassab, and J. Nieto S. 2009. Small heat-shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. Weber. *Plant, Cell & Environ.* 32: 1791-1803.
- Madrigal L., R., A. Velázquez L., E. García-Moya, O. Sánchez-Lozada, and X. Ramírez-González, 2014. El maguey, cultivo y cultura en la región centro del país; primera etapa. México. Fideicomiso de Desarrollo Regional Centro País. pp: 1-24.
- Matiz, A., P. Tamaso, A. Yepes, L. Freschi, and H. Mercier. 2013. Chapter 4. CAM Photosynthesis in Bromelias and Agaves: What Can We Learn from These Plants? *In: Photosynthesis*. Dubinski Z (ed). London, United Kingdom. pp: 91-134.
- Mora-López, J. L., J. Reyes-Agüero A., J. Flores-Flores L., C. B. Peña-Valdivia, y J. Aguirre-Rivera R. 2011. Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género Agave. *Agrociencia* 45: 465-477.
- Nieto, A., R. J. Vargas M., J. C. Nieto A., A. Rodríguez O., V. M. Jiménez P., J. Hernández C., M. Ortiz B. 2016. El cultivo de maguey pulquero (*Agave salmiana*) en el valle del mezquital. Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Hidalgo. 52 p.
- Nobel, P. S. 1985. PAR, water, and temperature limitations on the productivity of cultivated *Agave fourcroydes* (henequen). *J. Appl. Ecol.* 22: 157-173.
- Nobel, P. S. 1989. A nutrient index quantifying productivity of agaves and cacti. *J. Appl. Ecol.* 26: 635-645.
- Nobel, P. S. 1998. *Los Incomparables Agaves y Cactus*. Editorial Trillas. México. 211 p.
- Nobel, P. S. 2005. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Third Edition. Elsevier Academic Press. San Diego, USA. 571 p.
- Nobel, P. S. 2011. *Sabiduría del Desierto, Agaves y Cactus: CO₂, Agua, Cambio Climático*. García M., E. 2ed. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 160 p.
- Nobel, P. S., E. Quero, and H. Linares. 1988. Differential growth responses of agaves to nitrogen, phosphorus, potassium, and boron applications. *J. Plant Nutr.* 11:1683-1700.
- Nobel, P. S., E. García-Moya, and E. Quero. 1992. High annual productivity of certain agaves and cacti under cultivation. *Plant Cell Environ* 15: 329-335.
- Pimienta-Barrios, E., C. Robles M., and P. S. Nobel. 2001. Net, CO₂ uptake for *Agave tequilana* in a warm and temperate environment. *Biotropica* 33: 312-318.
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo H., P. S. Nobel, y J. García G. 2005. Respuesta fisiológica a factores ambientales del agave azul (*Agave tequilana* Weber). *Scientia-CUCBA* 7: 85-97.
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo H., y J. García G. 2006. Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *AGRO* 40: 699-709.

- Ramírez-Tobías, H. M., C. B. Peña-Valdivia, J. R. Aguirre R., J. A. Reyes-Agüero, A. B. Sánchez-Urdaneta, and S. Valle-Guadarrama, 2011. Seed germination temperatures of eight Mexican Agave species with economic importance. *Plant Species Biol.* 27:124-137.
- Ramírez-Tobías, H. M., C. B. Peña-Valdivia, y R. Aguirre J. 2014. Respuestas bioquímico-fisiológicas de especies de Agave a la restricción de humedad. *Bot. Sci.* 92: 131-139.
- Sánchez, G. P., C. Molinos da S., G. Alcántar G., y M. Sandoval V. 2013. Cap. 6 Diagnóstico nutrimental en plantas. *In: Nutrición de cultivos.* Alcántar, G. G. y L. Trejo-Téllez (eds). Colegio de Posgraduados. pp: 202-247.
- Silos-Espino, H., C. L. Tovar-Robles, N. González-Cortés, S. J. Méndez-Gallegos, y D. Rossel-Kipping. 2011. Estudio integral del maguey (*Agave salmiana*): propagación y valor nutricional. *Rev. Salud Pública y Nutrición* 5: 75-82.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2010. Chapter 8: Photosynthesis. *In: Plant Physiology.* 5th ed. underland: Sinauer Associates Inc., Publishers. pp: 200-235.
- Weather Spark.* 2018. El clima promedio en Temascalapa, México. Fecha de consulta 20/09/2018. <https://es.weatherspark.com/y/6604/Clima-promedio-en-Temascalapa-M%C3%A9xico-durante-todo-el-a%C3%B1o#Sections-Precipitation>
- Winter, K., M. Garcia, and A. M Holtum J. 2014. Nocturnal versus diurnal CO₂ uptake: how flexible is *Agave angustifolia*? *J. Exp. Bot.* 65: 3695–3703.

CONFIRMATION OF GRAIN AMARANTH (*Amaranthus* spp.) LANDRACES BY CANONICAL DISCRIMINANT ANALYSIS

CONFIRMACIÓN DE RAZAS GEOGRÁFICAS DE AMARANTO (*Amaranthus* spp.) POR ANÁLISIS DISCRIMINANTE CANÓNICO

Eduardo Espitia-Rangel¹, Diana Escobedo-López², Carlos A. Núñez-Colín³, Miriam J. Aguilar-Delgado¹, Patricia Rivas-Valencia^{1*}, Luisa F. Sesma-Hernández¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. Km.13.5 de la Carretera los Reyes-Texcoco, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, 56250, México. (rivas.patricia07@gmail.com). ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío. Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Roque, Celaya, Guanajuato, 38110, México. ³Universidad de Guanajuato, Programa de Ingeniería en Biotecnología. Mutualismo #303 Esquina Prolongación Río Lerma, Colonia La Suiza, Apartado Postal 91, Celaya, Guanajuato, 38060, México.

ABSTRACT

Grain amaranth refers to three species of genus *Amaranthus* (*Amaranthus cruentus*, *A. hypochondriacus*, and *A. caudatus*), which show a high morphological diversity, which is why it is treated since the 1990s to differentiate landraces and to contribute to the breeding programs. The aim of this investigation was to evaluate 53 genotypes within the native landraces: Aztec, Mercado, Mixtec, Nepal (*A. hypochondriacus*), African, Guatemalan, Mexican (*A. cruentus*), and South American (*A. caudatus*) using morphological and phenological traits. INIFAP-CEVAMEX accessions were used and planted at Santa Lucía de Prías, México (2013 spring-summer growing cycle) in order to record phenological and morphological data. Seeds were digitalized and analysed on ImageTool. Then, the Mahalanobis distance, a canonical discriminant analysis using landraces as classificatory variable, a MANOVA, and a Tukey mean comparison for canonical roots were performed; all analyses were processed on SAS. The canonical discriminant analysis perfectly distinguished the landraces, which was grouped according to the species. The main traits to distinguish the groups for Canonical Root 1 were traits related to phenology and plant morphology; for Canonical Root 2, traits related to shape of the seed, and for Canonical Root 3, traits related to size of the seed. Classification by landraces of the Mexican species of grain amaranth may be an alternative for systematics, conservation, management, and germplasm ordination for crop improvement.

RESUMEN

El amaranto comprende tres especies del género *Amaranthus* (*Amaranthus cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*), que presentan una diversidad morfológica alta, razón por la cual desde la década de 1990 se ha tratado de clasificarlas en razas para diferenciarlas y contribuir a los programas de mejoramiento genético. El objetivo de esta investigación fue evaluar 53 genotipos de razas nativas: Azteca, Mercado, Mixteca, Nepal (*A. hypochondriacus*), Africana, Guatemalteca, Mexicana (*A. cruentus*) y Sudamericana (*A. caudatus*), utilizando rasgos morfológicos y fenológicos. Las accesiones utilizadas se plantaron en el Campo Experimental Valle de México ubicado en Santa Lucía de Prías, estado de México (ciclo de cultivo primavera-verano 2013) para registrar las variables fenológicas y morfológicas. Las semillas se digitalizaron y analizaron con ImageTool. Después se realizó un análisis discriminante canónico con la distancia de Mahalanobis y las razas como variable clasificatoria; también se realizó un MANOVA y una comparación de medias de Tukey para raíces canónicas; todos los análisis se procesaron en SAS. El análisis discriminante canónico distinguió perfectamente las razas, las cuales se agruparon de acuerdo con su especie. Los rasgos principales para distinguir los grupos de la Raíz Canónica 1 fueron los relacionados con la fenología y la morfología de las plantas; para la Raíz Canónica 2, los rasgos relacionados con la forma de la semilla; y para la Raíz Canónica 3, los rasgos relacionados con el tamaño de la semilla. La clasificación por razas de las especies mexicanas de amaranto dan alternativas para sistemática, conservación, manejo y ordenación del germoplasma para el mejoramiento del cultivo.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: December, 2019. Approved: August, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 927-937. 2020.

Palabras clave: razas de *Amaranthus*, morfología, caracterización de germoplasma, análisis discriminante canónico, sistemática.

Key words: *Amaranthus* landraces, morphology, germplasm characterization, canonical discriminant analysis, systematics.

INTRODUCTION

The genus *Amaranthus* consists of approximately 70 species, of which 40 are native to the Americas, 30 are from Australia, Africa, Asia, and Europe (Espitia *et al.*, 2012). However, *A. cruentus* L., *A. hypochondriacus* L., and *A. caudatus* L. are the grain amaranth species of major interest as an agricultural crop in many regions of the world (Kaufmann, 1992), since their seeds have an exceptionally high nutritional value (Espitia *et al.*, 2012). *Amaranthus cruentus* L. and *A. hypochondriacus* L. were domesticated by some pre-hispanic groups within Mexico's territory that used this plant in their diet and for religious rituals (Moran *et al.*, 2012). The cultivation of grain amaranth is concentrated in highland regions such as the Sierra Madre and the Trans-Mexican Volcanic Belt in Mexico, as well as in the Andean highlands and the Himalayan foothills (Escobedo *et al.*, 2014).

The availability of genetic diversity is a fundamental requirement for the crop improvement, which can be concentrated in a germplasm bank that also will help conserve the plant genetic resources (Massawe *et al.*, 2016). In Mexico, the germplasm collection of amaranth grains was used since the arrival of foreign missions from United States to search for this resource in 1982; collection of the available genetic variability of amaranth from Mexico began, together with those foreign groups. Nowadays, cultivated genotypes of the species *A. hypochondriacus* and *A. cruentus* are collected almost exclusively; they are also the most widely distributed in Mexico to produce grain amaranth (Espitia, 2018).

Regarding the wide variability shown by the main three species of amaranth and some other wild relatives, and based on the morphological groups described by Kaufmann (1992), Espitia (2018) described landraces of each amaranth species: *A. hypochondriacus* has five landraces (Aztec, Mercado, Mixtec, Nepal, and Spike), *A. cruentus* has three landraces (African, Guatemalan, and Mexican), and *A. caudatus* has three landraces (South American, Edulis, and Ornamental). Nonetheless, these landraces were classified mainly by their use and where they were commonly grown. There are no

INTRODUCCIÓN

El género *Amaranthus* consta de aproximadamente 70 especies, de las cuales 40 son nativas de América, 30 son de Australia, África, Asia y Europa (Espitia *et al.*, 2012). Sin embargo, *A. cruentus* L., *A. hypochondriacus* L. y *A. caudatus* L. son las especies de amaranto de mayor interés como cultivo agrícola en muchas regiones del mundo (Kaufmann, 1992), ya que sus semillas tienen un valor nutricional excepcionalmente alto (Espitia *et al.*, 2012). Grupos prehispánicos dentro del territorio de México domesticaron *Amaranthus cruentus* L. y *A. hypochondriacus* L. porque usaban esta planta en su dieta y para rituales religiosos (Moran *et al.*, 2012). El cultivo del amaranto se concentra en regiones de tierras altas como la Sierra Madre y el Cinturón Volcánico Transmexicano en México, así como en la sierra andina y en las faldas del Himalaya (Escobedo *et al.*, 2014).

La disponibilidad de diversidad genética es un requisito fundamental para el mejoramiento de cultivos, que puede concentrarse en un banco de germoplasma que también ayudará a conservar los recursos fitogenéticos (Massawe *et al.*, 2016). En México, la colección de germoplasma de granos de amaranto se utilizó desde la llegada de misiones extranjeras de Estados Unidos que buscaban este recurso en 1982; se inició la recolección de la variabilidad genética disponible del amaranto de México, conjuntamente con esos grupos extranjeros. Actualmente se recolectan casi exclusivamente genotipos cultivados de las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*; también son los más ampliamente distribuidos en México para la producción de grano de amaranto (Espitia, 2018).

Respecto a la variabilidad amplia mostrada por las tres especies principales de amaranto y algunos otros parientes silvestres, y con base en los grupos morfológicos descritos por Kaufmann (1992), Espitia (2018) describió las razas de cada especie de amaranto: *A. hypochondriacus* tiene cinco razas (Azteca, Mercado, Mixteca, Nepal y Espinosa), *A. cruentus* tiene tres razas (Africana, Guatemalteca y Mexicana) y *A. caudatus* tiene tres razas (Sudamericana, Edulis y Ornamental). No obstante, estas razas se clasificaron principalmente por su uso y el lugar donde se cultivaban comúnmente. No existen estudios de caracterización morfológica para distinguir razas, debido a que en México solo se vende grano mezclado y también se mezclan las plantas en parcelas agrícolas,

morphological characterization studies to distinguish these landraces, because only mixture grain for sale and mixture plants in agricultural plots are reported in Mexico, mainly of landraces Mercado and Mexican (Espitia *et al.*, 2010).

The hypothesis of this research is that the knowledge of amaranth variability and the grouping of under species will allow acquiring a better understanding and management of amaranth germplasm. The aim of this investigation was to carry out a characterization of germplasm of the South American (2), Aztec (12), Mercado (8), Mixtec (7), Nepal (10), African (4), Guatemalan (4), and Mexican (4) landraces by means of phenological traits, morphological traits, morphometric and micro-morphological traits of the seed and flower morphology, using canonical discriminant analysis (CDA).

MATERIALS AND METHODS

In the study, 53 accessions of the germplasm bank of the Campo Experimental Valle de México of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Mexico were used (Table 1). Accessions were planted at Santa Lucía de Prías, estado de México, during the spring-summer growing cycle in 2013, under a single series without replicates. Phenological and morphological data were taken from 10 plants in each experimental plot.

Phenological traits such as days to inflorescence emergence, days to first anthesis, and days to maturity of the grain were

en especial de las razas Mercado y Mexicana (Espitia *et al.*, 2010).

La hipótesis de esta investigación es que el conocimiento de la variabilidad del amaranto y la agrupación en subespecies permitirá adquirir un mejor conocimiento y manejo del germoplasma del amaranto. El objetivo de esta investigación fue realizar una caracterización del germoplasma de las variedades Sudamericana (2), Azteca (12), Mercado (8), Mixteca (7), Nepal (10), Africana (4), Guatemalteca (4), y Mexicana (4) por medio de rasgos fenológicos, rasgos morfológicos, rasgos morfométricos y micro-morfológicos de la semilla y flor, y el uso del análisis canónico discriminante (CDA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la investigación se utilizaron 53 accesiones del banco de germoplasma del Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México (Cuadro 1). Las accesiones se sembraron en Santa Lucía de Prías, estado de México, durante el ciclo de cultivo primavera-verano de 2013, en serie sencilla sin repeticiones. Los datos fenológicos y morfológicos se registraron a partir de 10 plantas en cada parcela experimental.

Los rasgos fenológicos que se evaluaron son los días hasta la emergencia de la inflorescencia, los días hasta la primera antesis y días hasta la madurez del grano. Además, se observaron rasgos morfológicos: altura de la planta (cm), longitud de la inflorescencia (cm), longitud de la panícula (cm), número de panículas por inflorescencia, número de ramas por panícula, proporción

Table 1. The fifty-three amaranth germplasm accessions used in this study were obtained from Germplasm Bank of INIFAP, Mexico.

Cuadro 1. Las 53 accesiones de germoplasma de amaranto utilizadas en este estudio se obtuvieron del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México.

Species	Landrace	Number of accessions	Name of accessions
<i>A. caudatus</i>	South American	2	A572, A575
<i>A. cruentus</i>	African	4	78S-575, 79S-1038, 80S-409, 80S-624
<i>A. cruentus</i>	Guatemalan	4	80S-538, 80S-618, 80S-627, 81S-K112
<i>A. cruentus</i>	Mexican	6	654, 656, 660, 661, 662, 664
<i>A. hypochondriacus</i>	Aztec	12	146-1, 155, 156, 655, 665, 666, 667, 684, 685, 686, 687, 688
<i>A. hypochondriacus</i>	Mercado	8	81S-1024, 10-2-1, 10-4-2, 28, 137-1, 137-3, 141-7, 153-5-3
<i>A. hypochondriacus</i>	Mixtec	7	Opopeo, AG-73, 121, 122, 123, 124, 125
<i>A. hypochondriacus</i>	Nepal	10	A002, A004, A011, A021, A030, A1297, A1305, A1313, AG-21, AG-225

evaluated. In addition, morphological traits such as plant height (cm), inflorescence length (cm), panicle length (cm), number of panicles per inflorescence, number of branches per panicle, sexual ratio, glomeruli density per cm², and 1000-seeds weight were evaluated. Also, based on Hernández *et al.* (2011), 50 seeds were digitalized using a HP Scanjet G2710 scanner with a ruler scaled to millimetre. Digitalized images were then analysed using the software ImageTool ver. 3.00 (Wilcox *et al.*, 1995). In this software calculated traits were major axis length (MaAL), minor axis length (MiAL, it is the higher perpendicular length of the major axis), area (A), and perimeter (P) of the seed were obtained, as well as the Feret diameter ($FD=\sqrt{(4\cdot A)/\pi}$), roundness index ($RI=(4\cdot \pi\cdot A)/P^2$), elongation index ($EI=MaAL / MiAL$), and compactness index ($CI=FD / MaAL$). Also, the flower morphology traits of bract length (mm), utricule length (mm), inner tepal length (mm), and outer tepal length (mm) were obtained using a digital Vernier Mitutoyo 500 and a stereoscopic Leica model S4.

Descriptive statistics (mean and standard deviation) were calculated per landrace. The Mahalanobis distance was estimated to evaluate the similarity between different landraces. Also, a canonical discriminant analysis was performed using the landraces as classificatory variable; as well as a MANOVA with Tukey mean comparison test for the canonical roots. All statistical analyses were processed using SAS version 9.3 (SAS Institute, 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

Basic statistics for all traits evaluated in eight landraces of grain amaranth are shown (Table 2) as a reference of each landrace and to the better understanding of the results of this research. Values reflect the high variability of amaranth reported before (Josh *et al.*, 2018; Thapa and Blair 2018; Sha *et al.*, 2018). Mixtec, Aztec and South American landraces showed the highest values in morphological traits (plant height, inflorescence length, panicles per inflorescence, panicle length); as well as in phenological traits (inflorescence emergence, anthesis and maturity). The smallest plant size and precociousness are from the Nepal and Mercado grain landraces; similar data for grain landraces were reported before (Espitia, 2018). In floral morphology, it is evident that *A. hypochondriacus* showed greater values in relation to *A. cruentus*; *A. caudatus* stands between them. Regarding seed size and morphology, larger seeds are those of Aztec, Mexican, Mercado, and South American grain landraces, while the smallest

sexual, densidad de glomérulos por cm² y peso de 1000 semillas. Además, con base en Hernández *et al.* (2011), se digitalizaron 50 semillas utilizando un escáner HP Scanjet G2710 con una regla milimétrica. Las imágenes digitalizadas se analizaron luego usando el software ImageTool ver. 3.00 (Wilcox *et al.*, 1995). En este software, los rasgos calculados fueron la longitud del eje mayor (MaAL), la longitud del eje menor (MiAL, que es la longitud perpendicular más alta del eje mayor), el área (A) y el perímetro (P) de la semilla. También el diámetro de Feret ($FD=\sqrt{(4\cdot A)/\pi}$), el índice de redondez ($RI=(4\cdot \pi\cdot A)/P^2$), el índice de alargamiento ($EI=MaAL / MiAL$) y el índice de compacidad ($CI=FD / MaAL$). Además, los rasgos de morfología de la flor de longitud de bráctea (mm), la longitud de utriculo (mm), la longitud del tépalo interno (mm) y la longitud del tépalo externo (mm) se obtuvieron utilizando un Vernier Mitutoyo 500 digital y un estereoscopio modelo S4 Leica.

Cálculos de estadística descriptiva (media y desviación estándar) se hicieron por raza local. La distancia de Mahalanobis se estimó para evaluar la similitud entre diferentes razas. Además, se realizó un análisis discriminante canónico con las razas como variable clasificatoria; así como un MANOVA y una prueba de comparación de medias para las raíces canónicas (Tukey=0.05). Todos los análisis estadísticos se procesaron con la versión 9.3 del programa estadístico SAS (SAS Institute, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estadísticos básicos de todos los rasgos evaluados en ocho razas de grano de amaranto constan (Cuadro 2) como referencia sobre cada raza y para la mejor comprensión de los resultados de esta investigación. Los valores reflejan la variabilidad alta del amaranto reportada anteriormente (Josh *et al.*, 2018; Thapa y Blair 2018; Sha *et al.*, 2018). Las razas Mixteca, Azteca y Sudamericana mostraron los valores más altos en rasgos morfológicos (altura de la planta, longitud de la inflorescencia, panículas por inflorescencia, longitud de la panícula); como también en los rasgos fenológicos (aparición de inflorescencia, anthesis y madurez). El tamaño y la precocidad de las plantas más pequeñas provienen de las razas Nepal y Mercado; datos similares sobre estas razas se reportaron antes (Espitia, 2018). En morfología floral, es evidente que *A. hypochondriacus* mostró valores más altos que *A. cruentus*; y que *A. caudatus* se ubicó entre ambas. Respecto al tamaño y morfología de las semillas, las más grandes son las de las razas Azteca, Mexicana, Mercado y Sudamericana, mientras que las semillas más pequeñas son las de las razas Afri-

**Table 2. Mean ± standard deviation of 23 traits evaluated in eight landraces of grain amaranth (*Amaranthus* spp.).
Cuadro 2. Media ± desviación estándar de 23 rasgos evaluados en ocho razas de tres especies de amaranto (*Amaranthus* spp.).**

Trait	<i>A. cruentus</i>				<i>A. hypochondriacus</i>				<i>A. caudatus</i> South American
	African	Guatemalan	Mexican	Aztec	Mercado	Mixtec	Nepal		
Inflorescence emergence	71.50 ±7.14	66.20 ±6.24	61.33±1.97	76.08±3.78	59.00±3.42	86.00±8.98	52.50±10.09	71.00±1.41	
Anthesis	90.50 ±5.97	80.80 ±5.68	72.33±3.61	95.25±5.46	68.88±1.55	103.86±8.36	65.10±9.70	89.50±0.71	
Maturity	172.00±2.45	174.75±1.50	163.33±2.07	178.00±2.30	142.13±9.80	192.14±2.48	130.30±8.10	173.00±1.41	
1000-seeds weight	0.74 ±0.08	0.78 ±0.15	0.93±0.07	0.98±0.13	0.94±0.02	0.82±0.10	0.90±0.11	0.95±0.04	
Plant height	194.80±27.33	202.73±28.25	185.15±24.38	231.98±9.37	187.96±17.59	268.54±24.55	178.20±10.08	220.00±0.00	
Inflorescence length	62.23±8.03	54.20±13.49	51.89±5.34	66.07±3.65	59.33±4.08	86.06±11.39	60.63±6.46	65.00±0.00	
Panicles per inflorescence	69.20±6.96	60.00±15.77	38.17±5.78	111.25±27.90	53.56±10.47	143.61±23.69	46.66±6.83	95.00±0.00	
Panicles length	12.10±5.55	11.25±2.67	15.57±3.31	17.33±2.89	16.29±1.71	24.16±4.14	16.16±2.87	17.60±0.00	
Branches per panicle	6.48±0.89	7.08±2.43	1.93±0.89	8.22±3.04	6.29±1.39	14.67±6.95	2.20±0.92	8.35±0.07	
Sexual ratio	14.83±5.26	28.65±12.62	54.37±12.81	29.33±8.21	43.00±16.95	17.80±10.26	58.03±37.27	57.35±18.88	
Glomeruli density	6.60±1.66	4.65±1.34	2.53±0.73	5.87±0.82	3.63±1.14	7.71±2.59	2.88±0.56	3.10±0.42	
Pxyis length	3.10±0.61	3.03±0.13	3.77±0.23	3.63±0.33	3.58±0.43	2.97±0.38	3.50±0.51	2.45±0.49	
Bract length	1.98±0.17	2.23±0.39	2.02±0.10	3.59±0.52	2.94±0.17	3.27±0.68	2.86±0.82	2.65±0.64	
External tepal length	2.13±0.13	2.35±0.40	2.47±0.34	3.43±0.41	2.81±0.33	2.44±0.41	3.08±0.48	2.10±0.14	
Inner tepal length	1.93±0.10	1.80±0.29	1.90±0.25	2.32±0.33	2.30±0.29	2.01±0.04	2.46±0.42	2.10±0.14	
Area of the seed	0.94±0.15	0.90±0.22	1.76±0.76	1.39±0.11	1.46±0.08	1.10±0.13	1.27±0.16	1.23±0.01	
Perimeter of the seed	3.80±0.36	3.89±0.62	4.76±1.01	4.19±0.19	4.40±0.18	3.81±0.17	4.16±0.45	4.00±0.02	
Major axis length of the seed	1.17±0.10	1.18±0.15	1.51±0.32	1.36±0.06	1.42±0.05	1.21±0.05	1.32±0.13	1.29±0.00	
Minor axis length of the seed	0.91±0.08	0.87±0.16	1.32±0.27	1.16±0.05	1.19±0.04	1.01±0.09	1.10±0.05	1.07±0.00	
Elongation index of the seed	1.30±0.11	1.40±0.13	1.15±0.01	1.18±0.02	1.20±0.04	1.21±0.11	1.21±0.09	1.21±0.01	
Roundness index of the seed	0.85±0.11	0.77±0.05	0.96±0.03	0.99±0.02	0.96±0.03	0.96±0.10	0.94±0.08	0.96±0.02	
Feret diameter of the seed	1.08±0.08	1.06±0.14	1.47±0.28	1.33±0.05	1.36±0.04	1.18±0.07	1.26±0.08	1.24±0.01	
Compactness index of the seed	0.93±0.04	0.90±0.01	0.98±0.01	0.97±0.01	0.96±0.01	0.97±0.04	0.96±0.04	0.97±0.01	

seeds are from African, Guatemalan, and Mixtec grain landraces, which are the least domesticated.

The landraces showed significant differences among all of them in the Mahalanobis distance test (Table 3). In *A. hypochondriacus* the most distant landraces were Mixtec to Nepal, and Mercado and Aztec to Nepal. The most closely related landraces were Mercado to Nepal; and Aztec to Mixtec, although they showed significant differences. In *A. cruentus* the most distant landraces were Mexican to Guatemalan; while the most closely related were Mexican to African, and Guatemalan to African. Moreover, there are grain landraces from different species that are more closely related than landraces within species, such as South American to Aztec, or Mexican to Mercado, indicating that both landraces and species are genetically related, or that they derived from a common ancestor (Legaria, 2010).

According to the canonical discriminant analysis, the covariance matrix had complete rank and accounted to 93.3% of the variance at three first canonical roots (Table 4). The first canonical root (CR1) was mainly associated with the traits, days from planting to inflorescence emergence, days from planting to first anthesis, days from planting to maturity of the grain (phenology data), plant height and number of panicles per inflorescence (plant morphology data); while CR2 was mainly associated to inner tepal length and the traits and indices related to shape of the seed (roundness, compactness, and elongation); finally CR3 was mainly associated to the weight of 1000 seeds, as well as area, major axis length, minor axis length and Feret diameter of the seed (Table 5).

cana, Guatemalteca y Mixteca, que son las menos domesticadas.

Las razas mostraron diferencias significativas entre todas ellas en la prueba de distancia de Mahalanobis (Cuadro 3). En *A. hypochondriacus*, las razas más distantes fueron la Mixteca de Nepal, y Mercado y Azteca en relación a Nepal. Las razas autóctonas más estrechamente relacionadas fueron Mercado a Nepal; y Azteca a Mixteca, aunque mostraron diferencias significativas entre ellas. En *A. cruentus*, las razas más distantes fueron Mexicana de Guatemalteca; mientras que las más estrechamente relacionadas fueron Mexicana a Africana, y Guatemalteca a Africana. Más aun, hay razas de diferentes especies que se relacionan de manera más estrecha que las razas dentro de especies, como la Sudamericana con la Azteca o la Mexicana con Mercado, lo cual indica que tanto las razas como las especies tienen relación genética o derivan de un ancestro común (Legaria, 2010).

De acuerdo con el análisis discriminante canónico, la matriz de covarianza fue de rango completo y representó el 93.3% de la varianza en las tres primeras raíces canónicas (Cuadro 4). La primera raíz canónica (CR1) se asoció principalmente con los rasgos, días desde plantación hasta emergencia de la inflorescencia, días a primera anthesis, días a madurez del grano (datos fenológicos), altura de la planta, y número de panículas por inflorescencia (datos morfológicos de la planta); mientras que CR2 se asoció principalmente con la longitud del tépalo interno y los rasgos e índices de forma de la semilla (redondez, compactibilidad y elongación); por último CR3 se asoció principalmente con el peso de 1000 semillas, así como al área, longitud del eje mayor, longitud del

Table 3. Mahalanobis distance of eight grain amaranth (*Amaranthus* spp.) landraces using 23 traits. The distances are shown below the main diagonal and the *P*-values above the main diagonal.

Cuadro 3. Distancia de Mahalanobis de ocho razas de amaranto (*Amaranthus* spp.) para al considerar 23 rasgos. Las distancias se muestran debajo de la diagonal principal y los *P*-valores por encima de la diagonal principal.

Landrace	African	Aztec	Guatemalan	Mercado	Mexican	Mixtec	Nepal	South American
African		<0.0001	0.0023	<0.0001	0.0003	<0.0001	<0.0001	0.0088
Aztec	139.72		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0182
Guatemalan	76.90	277.32		<.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<.0001
Mercado	156.73	114.66	267.39		0.0001	<.0001	0.0324	0.001
Mexican	84.90	106.71	140.61	65.22		<0.0001	<0.0001	0.006
Mixtec	238.89	84.23	478.64	300.30	281.60		<0.0001	0.0002
Nepal	206.86	194.97	329.84	22.27	120.39	389.62		<0.0001
South American	93.69	64.33	205.58	108.95	88.55	138.90	166.59	

Table 4. Proper values and explained variance of eight landraces of grain amaranth (*Amaranthus* spp.), as evaluated by 23 traits.

Cuadro 4. Valores propios y varianza de ocho razas de amaranto (*Amaranthus* spp.), evaluados con 23 rasgos.

Canonical root	Propper value	Proportion of variance	Cumulative variance	Verosimilarity ratio	F Value	Significancy
1	48.379	0.547	0.549	0.00000338	5.68	<.0001
2	28.005	0.317	0.863	0.00016667	3.86	<.0001
3	6.138	0.069	0.933	0.00483428	2.39	<.0001
4	3.070	0.035	0.967	0.03450928	1.77	0.0031
5	1.527	0.017	0.985	0.14045941	1.33	0.1185
6	0.749	0.009	0.993	0.35494256	1.06	0.4208
7	0.611	0.007	1	0.62065700	1.04	0.4469

Table 5. Total canonical structure of eight landraces of grain amaranth (*Amaranthus* spp.), as evaluated by 23 traits.

Cuadro 5. Estructura canónica total de ocho razas de amaranto (*Amaranthus* spp.), evaluada con 23 rasgos.

Trait	CR1	CR2	CR3
Inflorescence emergence	0.8710	-0.1382	-0.0128
Anthesis	0.8990	-0.1545	-0.0347
Maturity	0.8899	-0.4067	0.0957
1000 seeds weight	-0.0586	0.3614	0.5373
Plant height	0.8611	0.0500	-0.0348
Inflorescence length	0.6945	0.2960	-0.3591
Number of panicles per inflorescence	0.8844	0.1275	-0.0619
Panicles length	0.5378	0.4578	-0.1119
Number of branches per panicle	0.7316	0.0003	-0.1815
Sexual ratio	-0.4954	0.2302	0.1282
Glomeruli density per cm ²	0.7352	-0.1003	-0.2164
Utricle length	-0.2524	0.2241	0.4961
Bract length	0.3864	0.4808	0.2027
External tepal length	-0.0270	0.4485	0.4434
Inner tepal length	-0.1857	0.5233	0.0751
Area of the seed	-0.1537	0.2543	0.5455
Perimeter of the seed	-0.2575	0.1102	0.4363
Major axis length of the seed	-0.2119	0.2224	0.5326
Minor axis length of the seed	-0.1331	0.3622	0.6015
Elongation index of the seed	-0.0994	-0.5112	-0.3342
Roundness index of the seed	0.2331	0.5719	0.3435
Feret diameter of the seed	-0.1511	0.3410	0.5975
Compactness index of the seed	0.1840	0.5169	0.2387
Proportion of variance (%)	54.68	31.65	6.94
Cumulative variance (%)	54.68	86.33	93.27

The graphic representation of the landraces in a Cartesian plane on the two first canonical roots showed a clear separation among them (Figure 1). Also, the three species were kept clearly separated and were not mixed.

eje menor y diámetro de Feret de la semilla (Cuadro 5).

La representación gráfica de las razas en un plano cartesiano con las dos primeras raíces canónicas mostró una separación clara entre ellas (Figura 1).

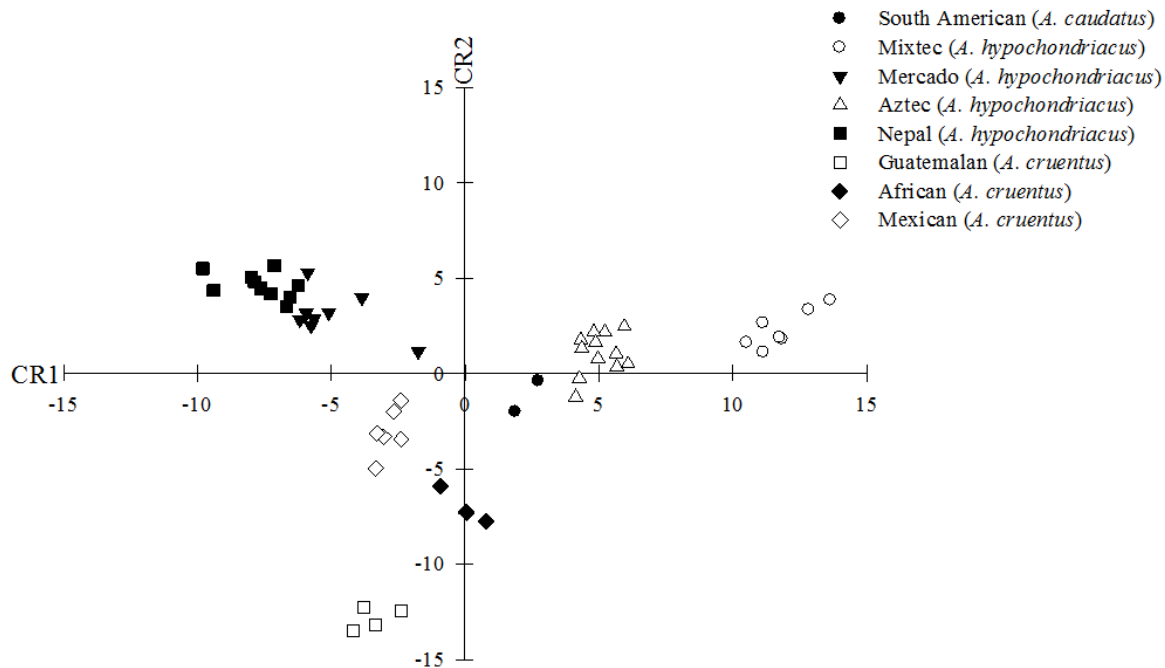


Figure 1. Graphical representation of the first two canonical roots of eight grain amaranth (*Amaranthus* spp.) landraces using 23 traits.

Figura 1. Representación gráfica de las dos primeras raíces canónicas de ocho razas de amaranto (*Amaranthus* spp.), 23 rasgos considerados.

The most important discriminant traits for CR1 were those related to phenology, which were the main criteria of Espitia (2018) for landrace classification, followed by the traits related to shape of seed (CR2) and the size of seed (CR3). Nevertheless, there is no other classification at an intraspecific level (Josh *et al.*, 2018).

The landraces were well defined according to a canonical discriminant analysis. The *A. hypochondriacus* landraces were located in a positive region of the CR2, which mean that all of them showed similar seed shapes, tending to a circular shape, which is a typical feature of domestication for this species (Espitia *et al.*, 2010). However, they were dispersed in the CR1, and therefore they showed a higher diversity mainly in phenological traits. This is due to the fact that each landrace was grown in different eco-geographic region. Along with this, each one has different traditional uses, such as the Mixtec landrace that is mainly utilized as leafy vegetable, thus its crop cycle finishes later and it has taller plants. Whereas the Nepal landrace is grown in

Además, las tres especies se mantuvieron claramente separadas y no se mezclaron.

Los rasgos discriminantes más importantes para CR1 fueron los relacionados con la fenología, los cuales fueron los principales criterios de Espitia (2018) para la clasificación de razas geográficas, seguidos de los rasgos relacionados con la forma de la semilla (CR2) y el tamaño de la semilla (CR3). Sin embargo, no existe otra clasificación a nivel intraespecífico (Josh *et al.*, 2018).

Las razas se definieron bien de acuerdo con el análisis discriminante canónico. Las razas de *A. hypochondriacus* se ubicaron en una región positiva de la CR2, esto significa que todas presentaron semillas de formas similares, tendientes a la forma circular, característica típica de la domesticación de esta especie (Espitia *et al.*, 2010). Sin embargo, se dispersaron en el CR1, y por tanto exhibieron una diversidad mayor en especial en los rasgos fenológicos. Esto se debe al hecho de que cada raza se desarrolló en una región ecogeográfica diferente. Junto a esto, cada una tiene diferentes usos tradicionales, como la raza local

arid regions, its cycle is shorter and produces smaller plants; therefore, this landrace evolves in earlier varieties (Espitia, 2018).

The three *A. cruentus* landraces were mainly differentiated by seed shape. The Guatemalan landrace displayed an elongated seed, while the Mexican landrace showed a rounder seed. The African landrace is later than other landraces of this species and its seed shape is midway between the other two landraces.

A Tukey test of the canonical roots of the MANOVA showed in the CR1 that only Guatemalan and Mexican *A. cruentus* landraces do not have significant differences, while the other landraces had significant differences among them. The South American landrace displayed significant differences with all others landraces (Table 6). In CR2, the *A. hypochondriacus* landraces that do not show significant differences between them were Nepal and Mercado, Mercado and Mixtec, and Mixtec and Aztec. Meanwhile, the three *A. cruentus* landraces displayed significant differences among them, although the Mexican landrace had no differences with the South American landrace (Table 6).

The results of this study agree with Legaria (2010) who showed that *A. hypochondriacus* and *A. caudatus* are more related between them than with *A. cruentus*, which was reported by Gudu and Gupta (1987). But landrace classification is different to that of Legaria (2010), who reported the close relation

mixteca que se utiliza principalmente como vegetal de hoja, por lo que su ciclo de cultivo termina más tarde y sus plantas son más altas. Mientras que la raza Nepal se cultiva en regiones áridas, su ciclo es más corto y produce plantas más pequeñas; por lo tanto, esta raza evoluciona hacia variedades de cosecha temprana (Espitia, 2018).

Las tres razas de *A. cruentus* se diferenciaron principalmente por la forma de las semillas. La raza Guatemalteca presentó una semilla alargada, mientras que la raza Mexicana mostró una semilla más redondeada. La raza Africana es más tardía que las otras razas de esta especie y la forma de su semilla es intermedia respecto a las dos razas anteriores.

Una prueba de Tukey de las raíces canónicas de MANOVA mostró en la CR1 que solo entre las razas de *A. cruentus*, Guatemalteca y Mexicana no hubo diferencia, mientras que las otras razas mostraron diferencias significativas entre ellas. La raza Sudamericana exhibió diferencias significativas con todas las demás razas (Cuadro 6). En la CR2, las razas de *A. hypochondriacus* que no mostraron diferencias significativas entre ellas fueron Nepal y Mercado, Mercado y Mixteca, y Mixteca y Azteca. Mientras que, las tres razas de *A. cruentus* mostraron diferencias significativas entre ellas, aunque la raza Mexicana no tuvo diferencias con la Sudamericana (Cuadro 6).

Los resultados de este estudio coinciden con los de Legaria (2010), quien demostró que *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* se relacionan más entre ellas que

Table 6. Tukey mean comparison test for canonical roots of the canonical discriminant analysis of eight landraces of grain amaranth (*Amaranthus* spp.) using 23 traits.

Cuadro 6. Prueba de comparación de medias de Tukey para las raíces canónicas del análisis discriminante canónico de ocho razas geográficas de amaranto (*Amaranthus* spp.), a partir de 23 rasgos.

Landrace	CR1 [†]	CR 2 [†]	CR 3 [†]
African (<i>A. cruentus</i>)	-0.0121 D	-7.0537 e	-3.7659 E
Aztec (<i>A. hypochondriacus</i>)	5.0163 B	1.0644 c	2.6768 A
Guatemalan (<i>A. cruentus</i>)	-3.4339 ef	-12.8446 f	-0.2394 bc
Mercado (<i>A. hypochondriacus</i>)	-5.0158 F	3.1277 ab	0.7843 ab
Mexican (<i>A. cruentus</i>)	-2.8597 E	-3.0375 d	2.7338 A
Mixtec (<i>A. hypochondriacus</i>)	11.8353 A	2.3178 bc	-2.6296 de
Nepal (<i>A. hypochondriacus</i>)	-7.6583 G	4.6213 a	-1.7924 cde
South American (<i>A. caudatus</i>)	2.3049 C	-1.2072 d	-1.2229 bcd

[†]Means in column with a different letter are significantly different (p≤0.05). ♦

[‡]Las letras diferentes en valores medios por columna indican diferencia significativa (p≤0.05).

between the Aztec and Mercado landraces, and that Nepal landrace was the least related. According to our results, Mercado and Nepal were more similar, mainly in the seed traits and they were more closely related than Aztec, which displayed a longer growing cycle and taller plants. Nevertheless, our results agree with the differences in breeds found by Espitia (1992), and Espitia (2018).

Kaufmann (1992) described these landraces as morphological groups; however, the description was done mainly for the uses and the region of origin. Our research showed strong evidence that these groups are well defined as landraces due to the significant differences in the mean comparison test of MANOVA canonical roots (Table 5). These results helped to clearly separate the landraces; that also have specific concordance (Table 6 and Figure 1); agreeing with Espitia (2018) and Legaria (2010).

CONCLUSIONS

Canonical discriminant analyses depict the separation of landraces and species using phenological, morphological, morphometric and micro-morphological traits of the seed and flower morphology. In *Amaranthus hypochondriacus*, the most distant landraces were Mixtec to Nepal, and Mercado and Aztec to Nepal. The most closely related landraces were Mercado to Nepal and Aztec to Mixtec.

In *A. cruentus* the most distant landraces were Mexican to Guatemalan, while the most closely related were Mexican to African, and Guatemalan to African. This landrace classification is useful in the systematic, conservation and management of germplasm from the grain amaranth species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by CONACYT through the project: Problemas Nacionales 248415 and for National Plant Genetic Resources System of SNICS-SAGARPA.

LITERATURE CITED

- Escobedo L. D., C. A. Núñez C., and E. Espitia R. 2014. Adaptation of cultivated amaranth (*Amaranthus* spp.) and their wild relatives in Mexico. *J. Crop Improv.* 28: 203-213.
- Espitia R. E., C. Mapes S., D. Escobedo L., M. De la O O., P. Rivas V., L. Cortés E., y J. M. Hernández C. 2010. Conservación y uso de los Recursos genéticos de amaranto

con *A. cruentus*, lo cual consignaron Gudu y Gupta (1987). Pero la clasificación de razas difiere a lo reportado por Legaria (2010), quien informó sobre la relación estrecha que hay entre las razas Azteca y Mercado, y que Nepal era la menos relacionada. De acuerdo con nuestros resultados, Mercado y Nepal fueron más similares entre ellas, principalmente en los rasgos de las semillas, y se relacionaron más estrechamente que con Azteca, la cual mostró un ciclo de crecimiento más largo y plantas más altas. No obstante, nuestros resultados concuerdan con las diferencias de razas encontradas por Espitia (1992) y Espitia (2018).

Kaufmann (1992) describió estas razas como grupos morfológicos; sin embargo, la descripción se hizo principalmente por los usos y la región de origen. Nuestra investigación mostró evidencia sólida de que estos grupos son razas bien definidas, debido a las diferencias significativas en la prueba MANOVA de comparación de medias de las raíces canónicas (Cuadro 5). Estos resultados ayudaron a distinguir claramente las razas; las cuales tienen además, concordancia específica (Cuadro 6 y Figura 1); lo cual coincide con Espitia (2018) y Legaria (2010).

CONCLUSIONES

Los análisis discriminantes canónicos describieron gráficamente la separación de razas geográficas y especies a partir de los rasgos fenológicos, morfológicos, morfométricos y micro-morfológicos de semillas y flores. En *Amaranthus hypochondriacus*, las razas más distantes fueron la Mixteca de Nepal; y las razas Mercado y Azteca de Nepal. Las razas más estrechamente relacionadas fueron Mercado con Nepal y Azteca con Mixteca.

En *A. cruentus*, las razas más distantes fueron Mexicana de Guatemalteca, mientras que las más cercanas fueron Mexicana con Africana, y Guatemalteca con Africana. Esta clasificación de razas es útil para la sistemática, el manejo y la conservación del germoplasma de las especies de amaranto.

—Fin de la versión en Español—

---*---

- en México. SAGARPA, SNICS, INIFAP, SINAREFI. 204 p.
- Espitia R. E., D. Escobedo L., C. Mapes S., M. De la O O., M. Aguilar D., J. M. Hernández C., A. Ayala G., P. Rivas V., G. Martínez T., M. L. Ramírez V., y S. H. Moran B. 2012. Conservación de los recursos genéticos de amaranto (*Amaranthus* spp.) en México. *In: Espitia-Rangel, E. (ed). Amaranto: Ciencia y Tecnología.* INIFAP-SINAREFI, Celaya, Guanajuato, México. pp: 147-163.
- Espitia R. E. 1992. Amaranth germplasm development and agronomic studies in México. *Food Rev. Int.* 8: 71-86
- Espitia R. E. 2018. Breeding of grain amaranth. *In: Paredes, L. O. (ed). Amaranth: Biology, Chemistry, and Technology.* 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. USA. pp: 23-38.
- Gudu S., and V. K. Gupta. 1987. Electrophoresis as an aid in the identification of various species and cultivars of grain amaranth. *Acta Horticulturae.* 218:231-238.
- Hernández M. M. Á., C. A. Núñez C., S. H. Guzmán M., E. Espinosa T., y M. G. Herrera H. 2011. Variabilidad morfológica mediante caracteres de semilla de poblaciones de *Amelanchier denticulata* (Kunth) Koch, originarias de Guanajuato, México. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 17:161-172.
- Josh D. C., S. J. Sood, R. Hosajatti, L. Kant, A. Pattanayak, A. Kumar, N. Yadav, and M. G. Stetter. 2018. From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth. *Theor. Appl. Genetics* 131: 1807-1823.
- Kaufmann C. S. 1992. The status of grain amaranth for the 1990s. *Food Rev. Int.* 8:165-186.
- Legaria S. J. P. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus* spp.). *Rev. Fitotec. Mex.* 33:89-95.
- Massawe F, S. Mayes, and A. Cheng. 2016. Crop diversity: An unexploited treasure trove for food security. *Trends in Plant Sci.* 5: 655-368.
- Moran B. S. I., L. Cortés E., E. Espitia R., y D. M. Sangerman J. 2012. *Tzoalli*, de cuerpo de dioses a alegría de mortales. *In: Espitia-Rangel, E. (ed). Amaranto: Ciencia y Tecnología.* INIFAP-SINAREFI, Celaya, Guanajuato, México. pp: 15-27.
- SAS Institute. 2012. SAS/STAT® 12.1 User's Guide. Cary, NC, USA. 732 p.
- Sha L. R., B. Afroza, S. H. Khan, and M. Habib. 2018. Morphological characterization of *Amaranthus* spp. Under temperate environment using NBPGR descriptor. *J. Pharmacog. Phytochem.* 7: 2716-2718.
- Thapa R., and M Blair. 2018. Morphological assessment of cultivated and wild amaranth species diversity. *Agronomy* 8: 1-13.
- Wilcox D., B. Dove, D. McDavid, and D. Greer. 1995. Image tool. Version 3: Users' Guide. University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA. 62 p.

COMPARISON OF LINEAR AND NONLINEAR MODELS: THE CASE OF THE ROSE QUALITY STEMS

COMPARACIÓN DE MODELOS LINEALES Y NO LINEALES: EL CASO DE LA CALIDAD DE TALLOS DE ROSA

Martha Elva **Ramírez-Guzmán**¹, Ma. de Lourdes **Arévalo-Galarza**², Gumercindo **de la Cruz-Guzman**³

¹Estadística. ²Fruticultura. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (martharg@colpos.mx), (larevalo@colpos.mx). ³Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios Núm. 1, Los Reyes Iztacala. 54090, Tlalnepantla, Estado de México; México. (moashi@unam.mx).

ABSTRACT

In agronomic design of experiments, researchers frequently assume linear associations between explanatory and response variables, also they assume a gaussian distribution or transform it. Inherent variability of the experiment units is not considered. Besides, it is frequent to analyze the time as a factor of a factorial design when repeated measures are taken through time, missing the opportunity to analyze the plant growth. New statistical models present the opportunity to analyze the raw data without transforming, they also can consider the variability of the experiment units as random components and they can identify the relationship between explanatory and response variables as linear or nonlinear. In cut roses production, one of the main quality factors is stem length, but is not clear how temperature, relative humidity and light affect it. The aim of this research was to analyze new statistical models to better understanding the impact of environmental variables on stem length of two rose cultivars (Samurai and Blush) during two peak production periods. The models used were: generalized linear models (GLM), generalized linear mixed models (GLMM), generalized additive models (GAM), generalized additive mixed models (GAMM), vector generalized lineal models (VGLM) and repeated measures model. The results showed that GAM model with a gamma distribution and identity link function was the best model with minimum BIC value and minimum error variance. It identified a nonlinear effect of relative humidity and linear effects of heat and light. The best conditions to produce plants between 50 and 70 cm, were 650 to 830 heat units and 82.5 to 85% of relative humidity. GAMM identified the period of April to May with

RESUMEN

En el diseño agronómico de experimentos, los investigadores con frecuencia asumen asociaciones lineales entre variables explicativas y de respuesta, también asumen una distribución gaussiana de ésta, o la transforman. La variabilidad inherente de las unidades experimentales no es considerada. Además, es frecuente analizar el tiempo como factor de un diseño factorial cuando se toman medidas repetidas a lo largo del tiempo, perdiendo la oportunidad de analizar el crecimiento de la planta. Los nuevos modelos estadísticos presentan la oportunidad de analizar los datos sin transformar; también pueden considerar la variabilidad de las unidades experimentales como componentes aleatorios y pueden identificar la relación entre las variables explicativas y de respuesta como lineales o no lineales. En la producción de rosas cortadas, uno de los principales factores de calidad es la longitud del tallo, pero no está claro cómo la temperatura, la humedad relativa y la luz la afectan. El objetivo de esta investigación fue analizar nuevos modelos estadísticos para comprender mejor el impacto de las variables ambientales en la longitud del tallo de dos cultivares de rosas (Samurai y Blush), durante dos períodos de mayor producción. Los modelos utilizados fueron: modelos lineales generalizados (GLM), modelos lineales mixtos generalizados (GLMM), modelos aditivos generalizados (GAM), modelos mixtos aditivos generalizados (GAMM), modelos lineales generalizados vectoriales (VGLM) y modelo de medidas repetidas. Los resultados mostraron que el modelo GAM con una distribución gamma y una función liga de identidad fue el mejor modelo con un valor BIC mínimo y una mínima varianza de error. Se identificó un efecto no lineal de humedad relativa y efectos lineales de calor y luz. Las mejores condiciones para producir plantas entre 50 y 70 cm de longitud consistieron en la aplicación de 650 a 830 unidades de calor y 82,5 a 85% de humedad relativa. GAMM identificó el período de abril a mayo con cultivar Blush

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: September, 2019. Approved: August, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 939-953. 2020.

cultivar Blush as the best conditions to produced roses. Repeated measures analysis confirmed that plants initiated high (low), remained so through time.

Key words: Generalized Linear Mixed Model, Generalized Additive Mixed Model, Vector Generalized Lineal Models, quality, flower production.

INTRODUCTION

In the design of experiments in agronomic analysis, researchers frequently assume gaussian response distribution and homocedasticity of treatments (De Felipe *et al.* 2016). New statistical models present an opportunity to incorporate asymmetrical distributions, heterocedasticity and nonlinear associations. For example, Vector Generalized Linear Models incorporated new non exponential distributions like Weibull distribution (Cattaneo *et al.*, 2018; Yee, 2019). Generalized Linear Mixed Models incorporated random effects (Breslow and Clayton, 1993). Hastie and Tibshirani (1986) and Hastie (2018) included nonlinear models through Generalized Additive Models. Wood and Scheip (2017) developed a Generalized Additive Mixed Models which incorporated random effects to nonlinear relationships. These models present the opportunity to analyze the raw data without transforming, and another pitfall is the lack of incorporation in the model of repeated observations. In agronomic experiments when the plant growth is evaluated, it is frequent to analyze the time as a factor in a factorial design, instead of considering it as a chronological measurement, missing information of the plant growth.

In rose cut flower industry one of the requirements is the stem length. Mexico has a floricultural potential due to natural resources (water, soil, climate), as well as to social conditions and its proximity to the United States, one of the main flower consumers in the world (Mordor Int. 2020). The production peaks of roses are in February, May, November and December; in these months there are high variability of temperatures, RH and radiation inside the greenhouse, that affect the growth rate of the rose plants. Nevertheless, the growers are unaware of the influence of these factors that affect the rose stem quality through the year. The objective of this research was to analyze these new statistical models

como las mejores condiciones para producir rosas. El análisis de medidas repetidas confirmó que las plantas tuvieron un inicio alto (bajo), y permanecieron así a lo largo del tiempo.

Palabras clave: modelo lineal mixto generalizado, modelo mixto aditivo generalizado, modelos lineales generalizados vectoriales, calidad, producción de flores.

INTRODUCCIÓN

En el diseño de experimentos en análisis agronómico, con frecuencia los investigadores asumen una distribución gaussiana de la respuesta y homocedasticidad de los tratamientos (De Felipe *et al.*, 2016). Los nuevos modelos estadísticos presentan una oportunidad para incorporar distribuciones asimétricas, heterocedasticidad y asociaciones no lineales. Por ejemplo, los modelos lineales generalizados vectoriales incorporaron nuevas distribuciones no exponenciales como la distribución de Weibull (Cattaneo *et al.*, 2018; Yee, 2019). Los modelos lineales mixtos generalizados incorporaron efectos aleatorios (Breslow y Clayton, 1993). Hastie y Tibshirani (1986) y Hastie (2018) incluyeron modelos no lineales a través de Modelos Aditivos Generalizados. Wood y Scheip (2017) desarrollaron generalizados modelos mixtos aditivos que incorporaron efectos aleatorios a relaciones no lineales. Estos modelos presentan la oportunidad de analizar los datos sin transformar. Otro obstáculo es la falta de incorporación de observaciones repetidas en el modelo. En los experimentos agronómicos, cuando se evalúa el crecimiento de la planta, es frecuente analizar el tiempo como factor en un diseño factorial, en lugar de considerarlo como una medida cronológica, perdiendo así información sobre el crecimiento de la planta.

En la industria de las rosas cortadas, uno de los requisitos es la longitud del tallo. México tiene un potencial floricultural debido a los recursos naturales (agua, suelo, clima), así como a las condiciones sociales y su cercanía a Estados Unidos, uno de los principales consumidores de flores del mundo (Mordor Int., 2020). Los picos en la producción de rosas se dan en febrero, mayo, noviembre y diciembre; en estos meses hay una gran variabilidad de temperaturas, RH y radiación dentro del invernadero, que afectan la tasa de crecimiento de las plantas de rosas. Sin embargo, los cultivadores de rosas desconocen la influencia de estos factores que afectan la calidad del

to better understanding the impact of environmental variables on stem length of two rose cultivars.

MATERIALS Y METHODS

Generalized Linear Model (GLM)

GLM describe the dependence of an observable variable y_i ($i=1, \dots, n$) on a vector of regressors, x_j ($j=1, \dots, p$), where $x_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip})$, and $x_{i0} = 1$ serves as an intercept coefficient. The conditional distribution of $y_i|x_i$ is a linear exponential family with density function:

$$f(y_i; \theta_i, \phi) = \exp \left\{ \left[y_i \theta_i - b(\theta_i) \right] / a(\phi) + c(y_i, \phi) \right\}$$

where θ_i is the natural parameter that depends on the explanatory variables via a linear predictor: $\eta_i = \sum_{j=1}^p \beta_j x_{ij}$; and ϕ is a dispersion parameter, usually $a(\phi) = 1$. The functions $a(\cdot)$, $b(\cdot)$ y $c(\cdot)$, determine which member of the exponential family is used (e.g. normal, gamma, inverse Gaussian, binomial and Poisson). The mean and the conditional variance of y_i are $E[y_i|x_i] = \mu_i = b'(\theta_i)$ and $\text{Var}[y_i|x_i] = \phi \cdot b''(\theta_i)$, respectively. The mean variance is $V(\mu_i) = b''(\theta_i)$. Dependence of the conditional mean $E[y_i|x_i] = \mu_i$ on x_j is specified via a regression model:

$$g(\mu_i) = x_i^T \beta \quad (1)$$

where g is a link function and β is a vector of regression coefficients that is estimated by maximum likelihood, using a weighted least squares iterative algorithm. The estimable functions of the regression model are estimated according to the member of the exponential family.

Generalized Linear Mixed Model (GLMM)

GLMM is obtained from the GLM with the incorporation of random effects in the linear predictor, and this idea was developed by Breslow and Clayton (1993). The structure of a GLMM is given by the expression: $g(\mu_i) = x_{ij} \beta + z_{ij} u_j$; $i=1, \dots, n$; $j=1, \dots, p$, where β is the vector that contains the fixed effects of the explanatory variables x_{ij} ; z_{ij} are the variables associated to the random effects and $\{u_j\}$ are the random effects that are assumed to have a normal probability distribution. In matrix form, this model can be written as:

$$g(\mu) = X\beta + Z\gamma$$

where X and Z are matrices with fixed and random effects, respectively, β is a vector of regression coefficients, γ is a random effects vector with normal distribution, $\gamma \sim N(0, \psi)$, g is a link

tallo de la rosa a lo largo del año. El objetivo de esta investigación fue analizar estos nuevos modelos estadísticos para comprender mejor el impacto de las variables ambientales en la longitud del tallo de dos cultivares de rosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo lineal generalizado (GLM)

El GLM describe la dependencia de una variable observable y_i ($i=1, \dots, n$) sobre un vector de regresores, x_j ($j=1, \dots, p$), donde $x_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip})$, y $x_{i0} = 1$ sirve como coeficiente de intercepción. La distribución condicional de $y_i|x_i$ es una familia exponencial lineal con función de densidad:

$$f(y_i; \theta_i, \phi) = \exp \left\{ \left[y_i \theta_i - b(\theta_i) \right] / a(\phi) + c(y_i, \phi) \right\}$$

donde θ_i es el parámetro natural que depende de las variables explicativas mediante un predictor lineal: $\eta_i = \sum_{j=1}^p \beta_j x_{ij}$; y ϕ es un parámetro de dispersión, usualmente $a(\phi) = 1$. Las funciones $a(\cdot)$, $b(\cdot)$ y $c(\cdot)$ determinan qué miembro de la familia exponencial se utiliza (por ejemplo, normal, gamma, gaussiana inversa, binomial y Poisson). La media y la varianza condicional de y_i son $E[y_i|x_i] = \mu_i = b'(\theta_i)$ y $\text{Var}[y_i|x_i] = \phi \cdot b''(\theta_i)$ respectivamente. La varianza media es $V(\mu_i) = b''(\theta_i)$. La dependencia de la media condicional $E[y_i|x_i] = \mu_i$ en x_j se especifica mediante un modelo de regresión:

$$g(\mu_i) = x_i^T \beta \quad (1)$$

donde g es una función de enlace y β es un vector de coeficientes de regresión que se estima por máxima verosimilitud, utilizando un algoritmo iterativo de mínimos cuadrados ponderados. Las funciones estimables del modelo de regresión se estiman según el miembro de la familia exponencial.

Modelo mixto lineal generalizado (GLMM)

El GLMM se obtiene del GLM con la incorporación de efectos aleatorios en el predictor lineal, y esta idea fue desarrollada por Breslow y Clayton (1993). La estructura de un GLMM es dada por la expresión: $g(\mu_i) = x_{ij} \beta + z_{ij} u_j$; $i=1, \dots, n$; $j=1, \dots, p$, donde β es el vector que contiene los efectos fijos de las variables explicativas x_{ij} ; z_{ij} son las variables asociadas a los efectos aleatorios y $\{u_j\}$ son efectos aleatorios y se asume que tienen una distribución de probabilidad normal. En forma matricial, este modelo se puede escribir como:

$$g(\mu) = X\beta + Z\gamma$$

function defined as in (1) and ψ is a covariance matrix of random effects.

Generalized Additive Model (GAM)

GAM, proposed by Hastie and Tibshirani (1986) and Hastie (2018), is an extension of the GLM. This model is a non-parametric regression that relaxes both classical assumptions of normality and linearity; besides, it allows non-linear relationships between a response and explanatory variables. The great advantage of this model is that the user does not have to suggest the type of function between the variables, since it is the model that defines the relationship form. That is, instead of having to choose a single parameter β_i that best fits all the range of values of the corresponding explanatory variable (x_j), GAM establish the form of the relationship by a spline curve, which joins two or more polynomial curves. The locations of the joins are known as “knots”. A cubic spline is a curve constructed as a sum of sections of cubic polynomials, joined at the ends in such a way that a continuous function is generated up to the second derivative. The form of the function will be determined by the available data and by a smoothing parameter (λ) that establishes how close the function has to adjust to the data points. Distributions allowed by GAM models include exponential family, negative binomial distribution and tweedy distribution. The last distribution includes a response variance equal to the average raised to the power p . The linear predictor can be written as a function of fixed effects $X\beta$ and smoothing function $f_k(x_k)$ with a specified parametric form for each p explanatory variable (Wood, 2017).

$$g(\mu) = X\beta + \sum_{j=1}^p f_k(x_k)$$

GAM models are preferred over lowess (locally weighted least squares regression models) (Cleveland, 1979), because the latter can produce predictions less than zero or greater than 1 when the data comes from a binomial distribution (Agresti, 2015).

Generalized Additive Mixed Model (GAMM)

This model is an extension of the GAM model. Here, random effects and correlation structures are included as in GLMM. The main interest focuses on the fixed effects of the model:

$$g(\mu) = X\beta + \sum_{j=1}^p f_j(x_j) + z_\gamma$$

where X and Z are defined as in GLMM and the functions $f_j(x_j)$ are defined as in GAM.

donde X y Z son matrices con efectos fijos y aleatorios, respectivamente, β es un vector de coeficientes de regresión, γ es un vector de efectos aleatorios con distribución normal, $\gamma \sim N(0, \psi)$, g es una función de enlace definida como en (1), y ψ es una matriz de covarianza de efectos aleatorios.

Modelo aditivo generalizado (GAM)

El GAM, propuesto por Hastie y Tibshirani (1986) y Hastie (2018), es una extensión del GLM. Este modelo es una regresión no paramétrica que relaja los supuestos clásicos de normalidad y linealidad; además, permite relaciones no lineales entre una variable de respuesta y variables explicativas. La gran ventaja de este modelo es que el usuario no tiene que sugerir el tipo de función entre las variables, ya que el modelo define la forma de la relación. Es decir, en lugar de tener que elegir un solo parámetro β_i que mejor se ajuste a todo el rango de valores de la variable explicativa correspondiente (x_j), GAM establece la forma de la relación mediante una curva spline, que une dos o más curvas polinómicas. Las ubicaciones de las uniones se conocen como “nodos”. Un spline cúbico es una curva construida como una suma de secciones de polinomios cúbicos, unidos en los extremos de tal manera que se genera una función continua hasta la segunda derivada. La forma de la función estará determinada por los datos disponibles y por un parámetro de suavizado (λ) que establece qué tan cerca la función a de ajustarse a los datos. Las distribuciones permitidas por los modelos GAM incluyen a la familia exponencial, la distribución binomial negativa y a la distribución tweedy. La última distribución incluye una varianza de la respuesta igual a la media elevada a la potencia p . El predictor lineal puede escribirse como una función de efectos fijos $X\beta$ y una función de suavizado $f_k(x_k)$ con una forma paramétrica específica para cada variable explicativa p (Wood, 2017).

$$g(\mu) = X\beta + \sum_{j=1}^p f_k(x_k)$$

Los modelos GAM son preferidos sobre los lowess (modelos de regresión de mínimos cuadrados ponderados localmente) (Cleveland, 1979), porque estos últimos pueden producir predicciones menores que cero o mayores que 1 cuando los datos provienen de una distribución binomial (Agresti, 2015).

Modelos mixtos aditivos generalizados (GAMM)

Este modelo es una extensión del modelo GAM. Aquí los efectos aleatorios y las estructuras de correlación se incluyen como en GLMM. El principal interés se centra en los efectos fijos del modelo:

Vector Generalized Linear Model (VGLM)

A variant of the GLM is the VGLM, which includes distributions that do not belong to the exponential distribution (Yee, 2019). Some of these distributions are: beta-binomial, Generalized Extreme Value Distribution, Gumbel and Inverse Gaussian. VGLM are a family of at least one hundred models which result of the combination of several distributions and link functions. One important feature of these models is that they can model variance, skewness and kurtosis as functions of explanatory variables. This approach can produce multivariate models with different distribution and link functions for each response variable (Yee, 2019).

Repeated Measures Model

Repeated Measures Model is very useful when there is interest in analyzing a variable through time (Hox *et al.* 2017). It controls for non-independence among the repeated observations for each individual, and it actually adds one or more random effects for individuals to the model. Examples of random effects are random intercept and random slope models. Random intercept model controls the variability between individuals, whereas random slope model assumes that individuals (e.g. plants) could have different slopes. Both take the form of additional residual terms. The GAM with intercept and slope random effects model can be written as:

$$g(\mu) = X\beta + \sum_{j=1}^p f_j(x_j) + u_{1i} + u_{2i} \text{time} \tag{2}$$

where u_{1i} is the intercept random effect and u_{2i} is the slope random effect associated to time, where $u_{1i} \sim N(0, \tau^2_1)$, $u_{2i} \sim N(0, \tau^2_2)$, and $cov(u_{1i}, u_{2i}) = \tau_{12}$. Thus model (2) controls the effects of individuals in order to emphasize the linear and no linear effects of regressors on response variable.

Where the variance-covariance matrix of nxn is:

$$\Sigma = \begin{bmatrix} \sigma^2 + \tau^2_2 & \dots & \tau^2_2 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \tau^2_2 & \dots & \sigma^2 + \tau^2_2 \end{bmatrix}$$

Estimation of parameters

Restricted maximum likelihood method (REML) estimates the parameters of GLMM and GAMM. Maximum likelihood (ML) method estimates the parameters of GLM, GAM and VGLM. This implies that an information criterion statistic for selecting the best model like the Bayesian (BIC) cannot be

$$g(\mu) = X\beta + \sum_{j=1}^p f_j(x_j) + z_\gamma$$

donde X y Z se definen como en GLMM y las funciones $f_j(x_j)$ se definen como en GAM.

Modelo lineal generalizado vectorial (VGLM)

Una variante del GLM es el VGLM, que incluye distribuciones que no pertenecen a la distribución exponencial (Yee, 2019). Algunas de estas distribuciones son: beta-binomial, distribución de valor extremo generalizada, Gumbel e inversa gaussiana. VGLM son una familia de al menos cien modelos que resultan de la combinación de varias distribuciones y funciones de enlace. Una característica importante de estos modelos es que pueden modelar la varianza, la asimetría y la curtosis como funciones de variables explicativas. Este enfoque puede producir modelos multivariados con diferentes funciones de distribución y funciones de enlace para cada variable de respuesta (Yee, 2019).

Modelo de medidas repetidas

El modelo de medidas repetidas es muy útil cuando existe interés en analizar una variable a través del tiempo (Hox *et al.*, 2017). Éste controla la dependencia entre las observaciones repetidas para cada individuo y, de hecho, adiciona uno o más efectos aleatorios para los individuos en el modelo. Ejemplos de efectos aleatorios son los modelos de intercepto aleatorio y de pendiente aleatoria. El modelo de intercepto aleatorio controla la variabilidad entre individuos, mientras que el modelo de pendiente aleatoria asume que los individuos (por ejemplo, las plantas) podrían tener diferentes pendientes. Ambos toman la forma de términos residuales adicionales. El modelo de efectos aleatorios GAM con intercepto y pendiente se puede escribir como:

$$g(\mu) = X\beta + \sum_{j=1}^p f_j(x_j) + u_{1i} + u_{2i} \text{time} \tag{2}$$

donde u_{1i} es el efecto aleatorio del intercepto y u_{2i} es el efecto aleatorio de la pendiente asociado al tiempo, donde $u_{1i} \sim N(0, \tau^2_1)$, $u_{2i} \sim N(0, \tau^2_2)$, and $cov(u_{1i}, u_{2i}) = \tau_{12}$. Por lo tanto, el modelo (2) controla los efectos de los individuos para enfatizar los efectos no lineales de los regresores sobre la variable de respuesta.

La matriz de varianza-covarianza de nxn es :

$$\Sigma = \begin{bmatrix} \sigma^2 + \tau^2_2 & \dots & \tau^2_2 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \tau^2_2 & \dots & \sigma^2 + \tau^2_2 \end{bmatrix}$$

estimated for GLMM and GAMM models (Schwarz, 1978; Wood, 2006). A BIC statistic performs better than an AIC one because the first one introduces a penalty term for the number of parameters in the model. Therefore, for model comparison, the best model will be that one which presents a white noise behavior and a minimum variance.

The experiment

The rose flowers were produced in a Sawtooth type greenhouse, located in Tequexquahuac, state of Mexico, Mexico. The climate in the area is temperate semi-dry, with an annual average temperature of 15.9 °C, with infrequent frosts and an average annual rainfall of 686 mm and altitude of 2450 m.

The commercial greenhouse has 5000 m², the soil is vertisol at pH 5.8, 4% of organic matter and controlled drip irrigation. Flower producers were interested in identifying which of two cultivars (Samurai (1) and Blush (2)) in peak seasons (period 1: April-May; period 2: September-October) was the best to accomplish the required specifications of the stem length (between 50 to 70 cm) required by the market. They wanted to know how heat units (heat), relative humidity (RH) and light ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) influence the stem length of roses. In order to answer these questions, an experiment with two factors, cultivars and periods, was conducted.

Environmental variables light (lux), RH (%) and heat units [(T_{max}-T_{min})-5.3] (where 5.3 was the base temperature for roses growth), were monitored inside the commercial greenhouse with data logger sensors (HOBO®). Repeated measures of stem length (10 plants per 5 dates) for each cultivar and period were measured at harvest with a metric scale. The fixed effects were periods and cultivars and the random effects were plants. The interaction was of interest.

RESULTS AND DISCUSSION

Stem length (y), heat units (x_1), relative humidity (x_2) and light units (x_3) descriptive statistics showed high variability of stem length and some positive skewness of RH (Table 1). Negative kurtosis indicates that the distribution has lighter tails than the normal distribution.

Stem length density function by kernel (Epanechnikov, 1969), Anderson-Darling test (Anderson and Darling, 1954; Marsaglia and Marsaglia, 2004) and qq plots of normal, gamma, Weibull and lognormal distributions (Figure 1), showed that stem length data comes from a normal distribution. However, after including the

Estimación de parámetros

El método de máxima verosimilitud restringida (REML) estima los parámetros de GLMM y GAMM. El método de máxima verosimilitud (ML) estima los parámetros de GLM, GAM y VGLM. Esto implica que una estadística de criterio de información para seleccionar el mejor modelo como el Bayesiano (BIC) no puede estimarse para los modelos GLMM y GAMM (Schwarz, 1978; Wood, 2006). Una estadística BIC funciona mejor que una AIC porque la primera introduce un término de penalización para el número de parámetros en el modelo. Por lo tanto, en la comparación de modelos, el mejor modelo será aquel que presente un comportamiento de ruido blanco y una mínima varianza en los residuales.

El experimento

Las rosas se produjeron en un invernadero tipo Sawtooth, ubicado en Tequexquahuac, Estado de México, México. El clima de la zona fue templado semiseco, con una temperatura media anual de 15.9 °C, con heladas poco frecuentes, una precipitación media anual de 686 mm y una altitud de 2.450 m.

El invernadero comercial tenía 5000 m², el suelo era de vertisol con un pH 5.8, 4% de materia orgánica y riego por goteo controlado. Los productores de flores estaban interesados en identificar cuál de los dos cultivares (Samurai (1) y Blush (2)) en las temporadas pico (período 1: abril-mayo; período 2: septiembre-octubre) era el mejor para cumplir con las especificaciones sobre la longitud del tallo (entre 50 y 70 cm) requeridas por el mercado. Querían saber cómo las unidades de calor (calor), la humedad relativa (HR) y la luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) influían en la longitud del tallo de las rosas. Para responder a estas preguntas se realizó un experimento con dos factores: cultivares y períodos.

Variabes ambientales como: luz (lux), HR (%) y unidades de calor [(T_{max}-T_{min}) -5.3] (donde 5.3 fue la temperatura base para el crecimiento de rosas), se tomaron dentro del invernadero comercial con sensores de registro de datos (HOBO®). Medidas repetidas de la longitud del tallo (10 plantas por 5 fechas) para cada cultivar y período se tomaron en la cosecha con una escala métrica. Los efectos fijos fueron los períodos y cultivares y los efectos aleatorios fueron las plantas. La interacción era de interés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estadísticas descriptivas de longitud del tallo (y), unidades de calor (x_1), humedad relativa (x_2) y unidades de luz (x_3) mostraron una alta variabilidad de longitud del tallo y cierta asimetría positiva de la RH (Cuadro 1). La curtosis negativa indica que la

Table 1. Descriptive statistics.
Cuadro 1. Estadística descriptiva.

Variable	Mean	Median	SD	Skewness	Kurtosis	Max	Min
Stem length (cm)	45.11	45.05	25	0.1	-0.73	108.3	2.9
Heat Units	686.6	694.71	135.78	0.05	-1.03	917.38	476.72
RH (%)	82.03	81.86	1.05	0.83	-0.08	84.38	80.85
Light (mmoles m ⁻² s ⁻¹)	448.01	446.83	20.46	-0.36	-1.04	474.09	408.75

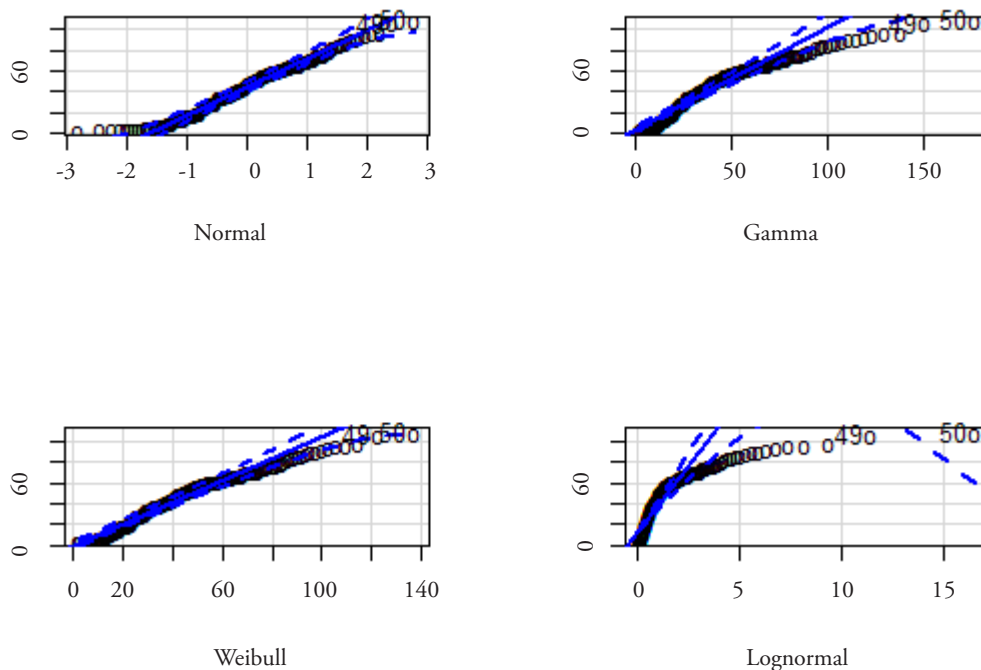


Figure 1. Normal, gamma, Weibull and lognormal qq plots of stem length (y).

Figura 1. Gráficas qq de las distribuciones normal, gamma, Weibull y lognormal de longitud del tallo (y).

explanatory variables in the model, residuals showed a gamma distribution, which was included in several models (Table 2). All the models were fitted with R (R Core Team, 2013) using the libraries lme4 (Bates *et al.*, 2015), MASS (Venables and Ripley, 2002), mgcv (Wood, 2011), gamm4 (Wood and Scheipl, 2017) and VGAM (Yee, 2019).

Models for explaining stem length as a function of environmental variables

Table 2 shows the models adjusted to length of the stem (Y), as a function of heat units (x_1), relative humidity (x_2) and light (x_3). Gaussian model (model

distribución tiene colas más ligeras que la distribución normal.

La función de densidad de la longitud del tallo por kernel (Epanechnikov, 1969), la prueba de Anderson-Darling (Anderson y Darling, 1954; Marsaglia y Marsaglia, 2004) y las gráficas qq de las distribuciones normal, gamma, Weibull y lognormal (Figura 1) mostraron que los datos de longitud del tallo proceden de una distribución normal. Sin embargo, luego de incluir las variables explicativas en el modelo, los residuos mostraron una distribución gamma, la cual fue incluida en varios modelos (Cuadro 2). Todos los modelos fueron ajustados en R (R Core Team, 2013), con las bibliotecas lme4 (Bates *et*

Table 2. Adjusted models.
Cuadro 2. Modelos ajustados.

Model	Type	Distribution	Link	BIC
A	VGLM	Normal	Identity	1681
B	VGLM	Weibull	Identity	1696
C	GLM	Gamma	Inverse	1775
D	GLM	Gamma	Log	1696
E	GLM	Gamma	Identity	1642
F	GLMM	Gamma	Identity	.
G	GLMM	Gamma	Inverse	.
H	GLMM	Gamma	Log	.
I	GAM	Gamma	Log	1629
J	GAM	Gamma	Identity	1619
K	GAM	Normal	Identity	1647
L	GAMM	Gamma	Log	.
M	GAMM	Gamma	Identity	.

K of Table 2) produced Pearson residuals between -38 to 38, while the rest was between -3 to 3 (Figure 2). An explanation of the great variability of this model was the wrong assumption of linear relationship between the response variable and the explanatory variables. GAM and GAMM models showed residuals with minimum variability (Figure 2). The best model was the GAM (model J) with identity link function and deviance explained of 75.1%.

Model J identified significant nonlinear effect of RH ($p \leq 0.05$) and linear effects of heat units ($p \leq 0.05$) and light ($p \leq 0.10$). Model 3 presented the explicit form of Model J. Non-linearity relationship

al., 2015), MASS (Venables y Ripley, 2002), mgcv (Wood, 2011), gamm4 (Wood y Scheipl, 2017) y VGAM (Yee, 2019).

Modelos para explicar la longitud del tallo en función de variables ambientales

El Cuadro 2 muestra los modelos ajustados a la longitud del tallo (Y), en función de las unidades de calor (x_1), la humedad relativa (x_2) y la luz (x_3). El modelo gaussiano (modelo K del Cuadro 2) produjo residuales de Pearson entre -38 a 38, mientras que para el resto entre -3 a 3 (Figura 2). Una explicación

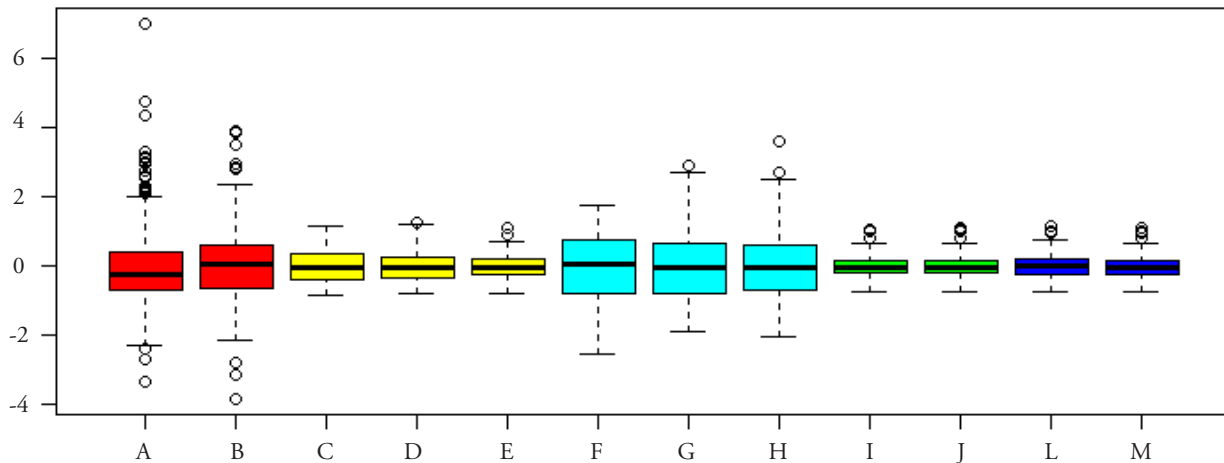


Figure 2. Residual box plots of the best 12 models of Table 1.
Figura 2. Gráficas de cajas de residuales de los 12 s mejores modelos del Cuadro 1.

between RH was approximately of degree 4 with a smooth function s (this function used ten knots), which was evident in Figure 3.

$$\hat{y} = 45.045 + s(\text{heat}, 1) + s(\text{RH}, 3.83) + s(\text{light}, 1) + \epsilon; \tag{3}$$

where $y \sim \text{Gamma}(\text{shape} = 2.17, \text{rate} = 0.04)$; $\epsilon \sim N(0, 0.11)$.

According to model (3), the best conditions to produce plants between 50 and 70 cm are 82.5 to 85% RH and 650 to 830 heat units (Figure 3). Stem length and predicted stem length, predicted by model 3, shows the quality of the model (Figure 4).

Models for detecting best production period of roses and cultivar

The stem length averages of period 1 and 2 were 63 cm and 25 cm, respectively (Figure 5). Regarding cultivars, the averages were 63 and 67 cm for cultivars 1 and 2, respectively. Box plots showed that cultivar 2 during period 1 produced the larger roses stem (Figure 5). Density functions by kernel showed

de la gran variabilidad de este modelo fue el supuesto erróneo de una relación lineal entre la variable de respuesta y las variables explicativas. Los modelos GAM y GMM mostraron residuales con mínima variabilidad (Figura 2). El mejor modelo fue el GAM (modelo J) con función liga de identidad y devianza explicada de 75.1%.

El modelo J identificó un efecto no lineal significativo de RH ($p \leq 0.05$) y efectos lineales de unidades de calor ($p \leq 0.05$) y luz ($p \leq 0.10$). El Modelo 3 presenta de forma explícita al Modelo J. La relación de no linealidad de RH fue aproximadamente de cuarto grado, con una función suave s (esta función usó diez nodos), lo cual fue evidente en la Figura 3.

$$\hat{y} = 45.045 + s(\text{heat}, 1) + s(\text{RH}, 3.83) + s(\text{light}, 1) + \epsilon; \tag{3}$$

donde $y \sim \text{Gamma}(\text{shape} = 2.17, \text{rate} = 0.04)$; $\epsilon \sim N(0, 0.11)$.

De acuerdo al modelo (3), las mejores condiciones para producir plantas entre 50 y 70 cm, son de 82.5 a 85% de RH y de 650 a 830 unidades de calor (Figura 3). La longitud del tallo y la longitud

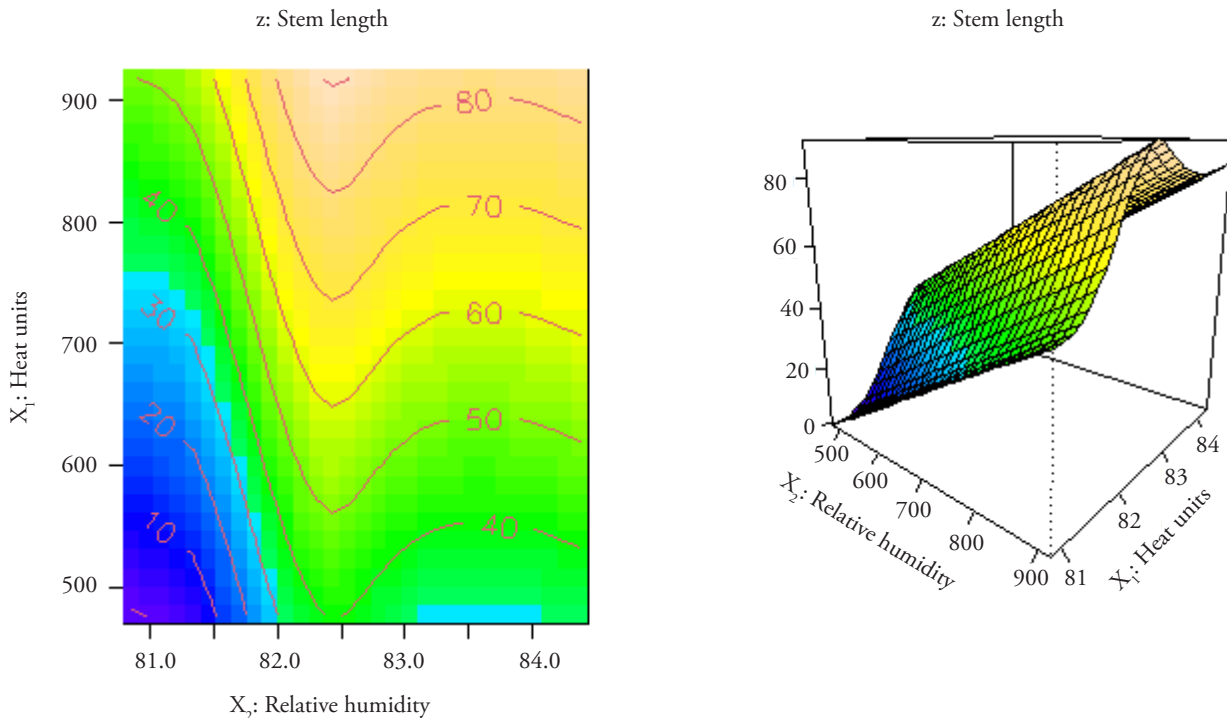


Figure 3. Heat units and Relative humidity (X_2) effects on length of the stem.
Figure 3. Efectos de unidades de calor (X_1) y humedad relativa (X_2) sobre la longitud del tallo.

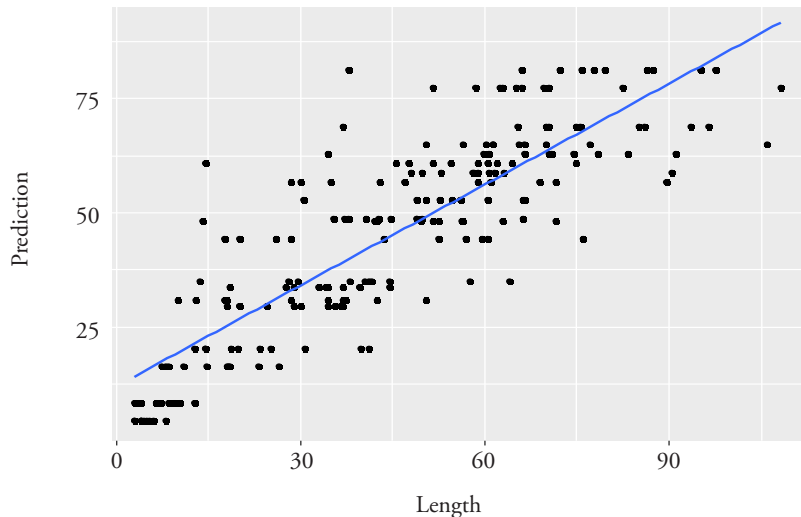


Figure 4. Stem length vs predicted stem length by GAM (model 3). Shadow color represents 95% confidence interval.
 Figura 4. Longitud del tallo versus la longitud del tallo pronosticada por GAM (modelo 3).

skewed distributions of roses stem length (Figure 6). To identify the period and cultivar of roses of best production, model 3 was extended to include cultivar and period of the year. To achieve this a GAMM model was fitted (model 4), with plant

pronosticada por el modelo 3 muestran la calidad del modelo (Figura 4).

Modelos para detectar el mejor período de producción de rosas y cultivares

Los promedios de longitud del tallo del período 1 y 2 fueron 63 cm y 25 cm, respectivamente (Figura 5). En cuanto a los cultivares, los promedios fueron de 63 y 67 cm para los cultivares 1 y 2, respectivamente. Las gráficas de caja mostraron que el cultivar 2 durante el período 1 produjo el tallo de rosas más grande (Figura 5). Las funciones de densidad por kernel mostraron distribuciones sesgadas de la longitud del tallo de las rosas (Figura 6).

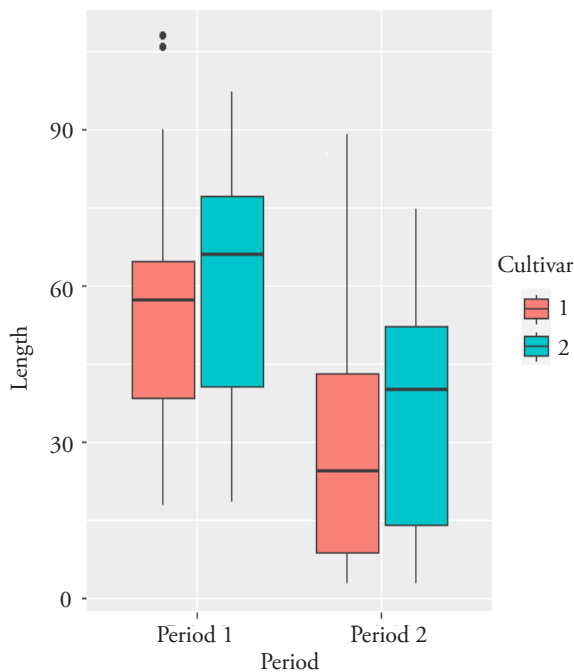


Figure 5. Box plot of stem length by period and cultivar.
 Figura 5. Gráficas de caja de longitud del tallo por período y cultivar.

Para identificar el período y el cultivar de rosas de mejor producción, el modelo 3 fue extendido para incluir el cultivar y el período del año. Para lograr este propósito, se ajustó un modelo GAMM (modelo 4), con planta dentro de la fecha como efecto aleatorio (γ_p). La interacción no fue significativa.

$$\hat{y} = 63.06 - 38.61 P_2 + 4.07 C_2 + s(x_1, 1) + s(x_2, 3.83) + s(x_3, 1) + \gamma_p + \epsilon; \quad (4)$$

donde $y \sim \text{Gamma}(\text{shape} = 2.17, \text{rate} = 0.04)$; $\epsilon \sim N(0, 0.11)$; $\gamma_p \sim N(0, 0.12)$.

El análisis ANOVA del modelo 4 mostró que las características de calidad se pueden lograr con el cultivar 2

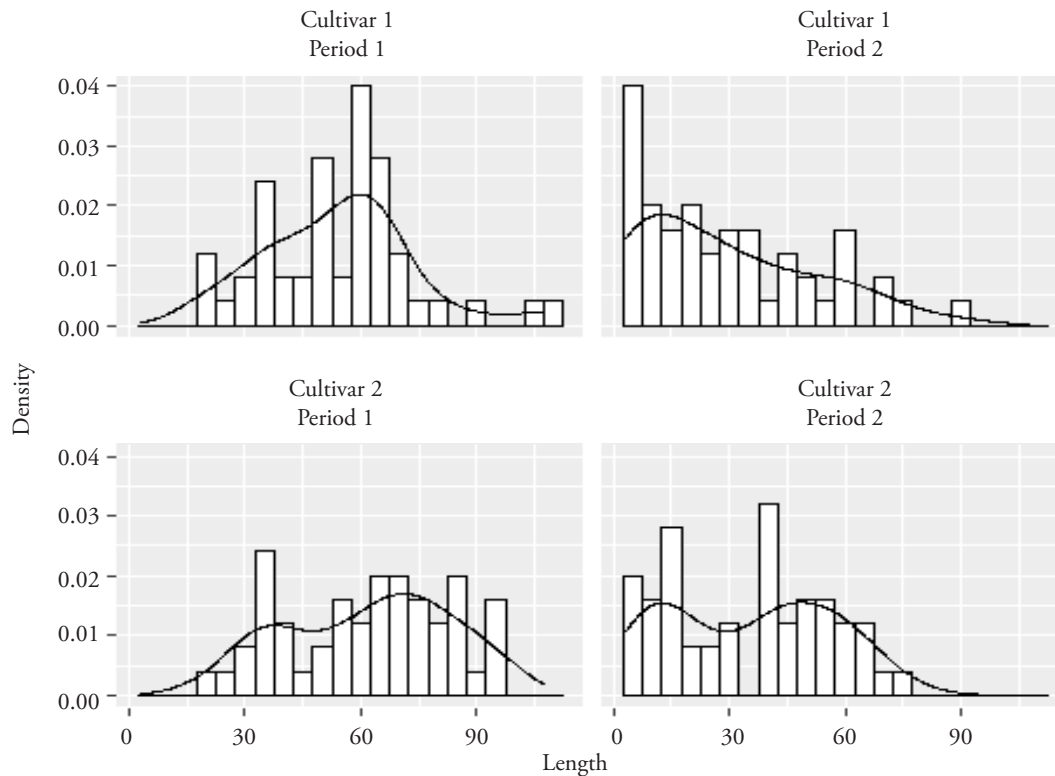


Figure 6. Density functions by kernel of stem length by cultivar and period.
Figura 6. Funciones de densidad por kernel de longitud del tallo por cultivar y período.

within date as random effect (γ_p). The interaction was not significant.

$$\hat{y} = 63.06 - 38.61 P_2 + 4.07 C_2 + s(x_1, 1) + s(x_2, 3.83) + s(x_3, 1) + \gamma_p + \epsilon; \quad (4)$$

where $y \sim \text{Gamma}$ (shape = 2.17, rate = 0.04); $\epsilon \sim N(0, 0.11)$; $\gamma_p \sim N(0, 0.12)$.

ANOVA analysis of model 4 showed that quality characteristics can be achieved with cultivar 2 (Intercept = 63.0578, p value = $2e-16$; cultivar estimate = 4.0750, p value < $1.02e-07$) during period 1 (period 2 estimate = -38.0612, p value < $2e-16$) (Figure 7). Because there were two levels for cultivar and two for periods, it was unnecessary to use any multiple comparison test; therefore, the highest level for period and cultivar were the best one. Some point predictions as function of specific values of period, cultivar, date, heat units, RH and stem length show the quality of the model (Table 3).

(Intercepto = 63.0578, valor de $p = 2e-16$; estimación de cultivar = 4.0750, valor de $p < 1.02e-07$) durante el período 1 (estimación del período 2 = -38.0612, valor de $p < 2e-16$) (Figura 7). Debido a que había dos niveles para cultivar y dos para períodos, no fue necesario utilizar ninguna prueba de comparación múltiple; por lo tanto, el nivel más alto para período y cultivar fue el mejor. Algunas predicciones puntuales en función de valores específicos de período, cultivar, fecha, unidades de calor, RH y longitud del tallo muestran la calidad del modelo (Cuadro 3).

Análisis de medidas repetidas

El tamaño del tallo de las plantas puede ser estudiada con un modelo de medidas repetidas (5) con curvas de crecimiento de intercepto y pendiente como efectos aleatorios ($u_{1i} + u_{2i}$ time) y una estructura simétrica de la matriz de varianza-covarianza para efectos aleatorios $\hat{\Sigma}$ de 10×10 .

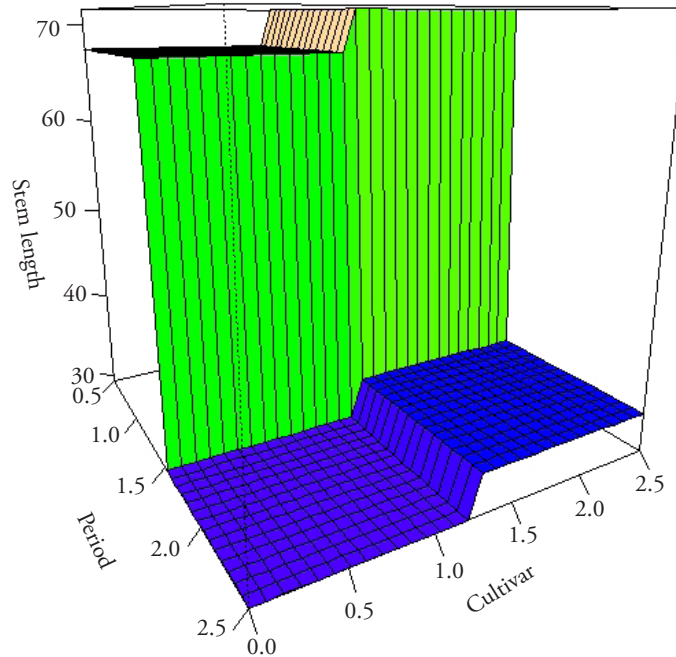


Figure 7. Predicted stem length of Model 4.
 Figura 7. Longitud del tallo predicha por el Modelo 4.

Repeated measures analysis

The stem size of the plants can be studied with a repeated measures model (5) with intercept and slope growth curves as random effects ($u_{1i} + u_{2i}$ time) and a 10x10 compound symmetry structure of the variance-covariance matrix for random effects $\hat{\Sigma}$.

$$\hat{y} = 30.98 - 27.66 P_2 + 4.16 C_2 + u_{1i} + u_{2i} \text{ time} + \epsilon; \epsilon \sim N(0, 0.11) \quad (5)$$

$$\hat{y} = 30.98 - 27.66 P_2 + 4.16 C_2 + u_{1i} + u_{2i} \text{ time} + \epsilon; \epsilon \sim N(0, 0.11) \quad (5)$$

$$\hat{\Sigma} \begin{bmatrix} 0.11 + 0.90^2 & \dots & 0.90^2 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0.90^2 & \dots & 0.11 + 0.90^2 \end{bmatrix}$$

Éste incluye medidas repetidas de la longitud del tallo durante los días 0, 7, 14, 21 y 28 (Figura 8). El

Table 3. Some point predictions as a function of cultivar, period, heat units, RH and light units based on model 4.

Cuadro 3. Algunas predicciones puntuales en función de cultivar, período, unidades de calor, RH y unidades de luz basadas en el Modelo 4

Period	Cultivar	Date	Heat Units	RH	Light	Length (y)	Prediction (\hat{y})
Period 1	Cultivar 1	28	816.4	82.6	433.49	66	79.89
Period 1	Cultivar 2	28	816.4	82.6	433.49	97.5	83.96
Period 1	Cultivar 1	21	718.97	82.54	433.87	65.5	67.21
Period 1	Cultivar 2	21	718.97	82.54	433.87	96.5	71.28

$$\hat{\Sigma} \begin{bmatrix} 0.11 + 0.90^2 & \dots & 0.90^2 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0.90^2 & \dots & 0.11 + 0.90^2 \end{bmatrix}$$

This includes repeated measures of stem length during days 0, 7, 14, 21 and 28 (Figure 8). Cultivar 1 presented more variability in slope than cultivar 2, which showed almost parallel slopes (Figure 8). This characteristic indicated a uniform increase through time of cultivar 2. The ANOVA table with intercept and slopes as sources of variation, indicated that there was an intercept difference (estimate = 30.814, std error = 0.374, t value = 82.247, p-value = 5.33e⁻¹³) and no difference.

Besides, it was noticed greater variability within cultivars (Figure 9), which led to incorporate plants as random effects, as shown in model 5.

This observation was validated with estimated random components, which were 0.70 and 0.90 for intercepts and slopes, respectively. The estimated scale parameter 0.08 indicated a good precision. Correlation between intercepts and the slopes of the

cultivar 1 presentó más variabilidad en pendiente que el cultivar 2, el cual mostró pendientes casi paralelas (Figura 8). Esta característica indicó un aumento uniforme a lo largo del tiempo del cultivar 2. El cuadro del ANOVA, con intercepto y pendientes como fuentes de variación, indicó que hubo una diferencia de interceptos (estimación = 30.814, error estándar = 0.374, valor t = 82.247, valor p = 5.33e⁻¹³) y sin diferencia.

Además, se observó una mayor variabilidad dentro de los cultivares (Figura 9), lo que llevó a incorporar plantas como efectos aleatorios, como se muestra en el modelo 5.

Esta observación se validó con los componentes aleatorios estimados, los cuales fueron 0.70 y 0.90 para interceptos y pendientes, respectivamente. El parámetro estimado de escala de 0.08 indicó que la precisión fue adecuada. La correlación entre los interceptos y las pendientes de las curvas de crecimiento de las plantas fue casi una. Esto significa que las plantas que comenzaron “altas” permanecieron así a lo largo del tiempo, así como las plantas “bajas” lo siguieron siendo a través del tiempo (Figura 10).

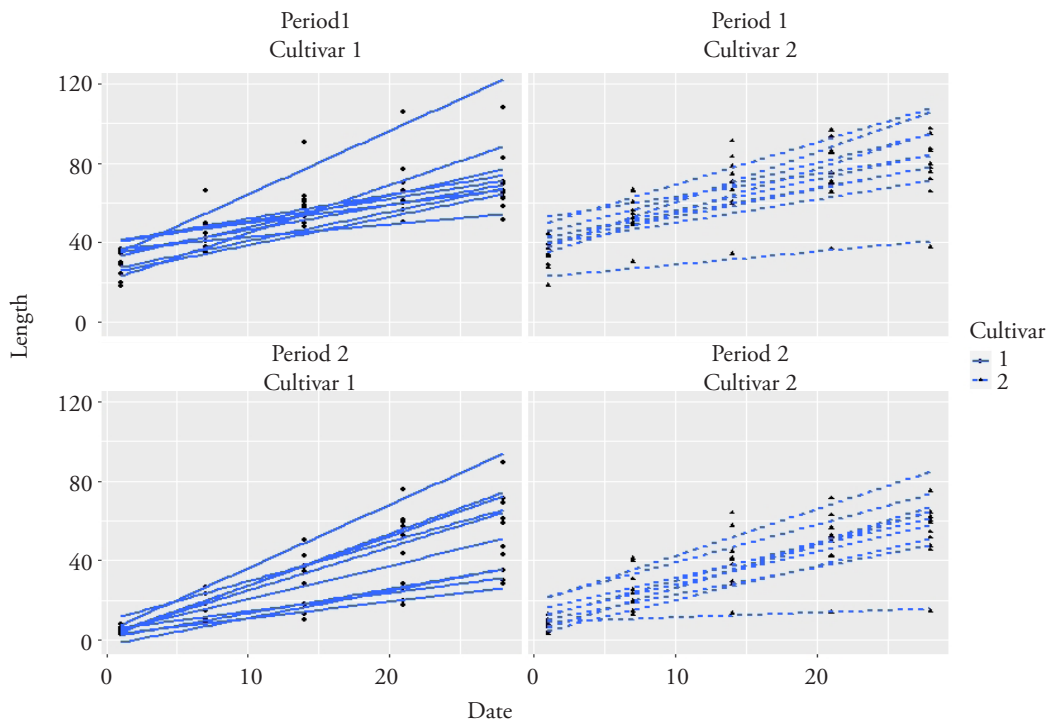


Figure 8. Linear models adjusted to the repeated measurements at 0, 7, 14, 21 and 28 days.
 Figura 8. Modelos lineales ajustados a las medidas repetidas a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.

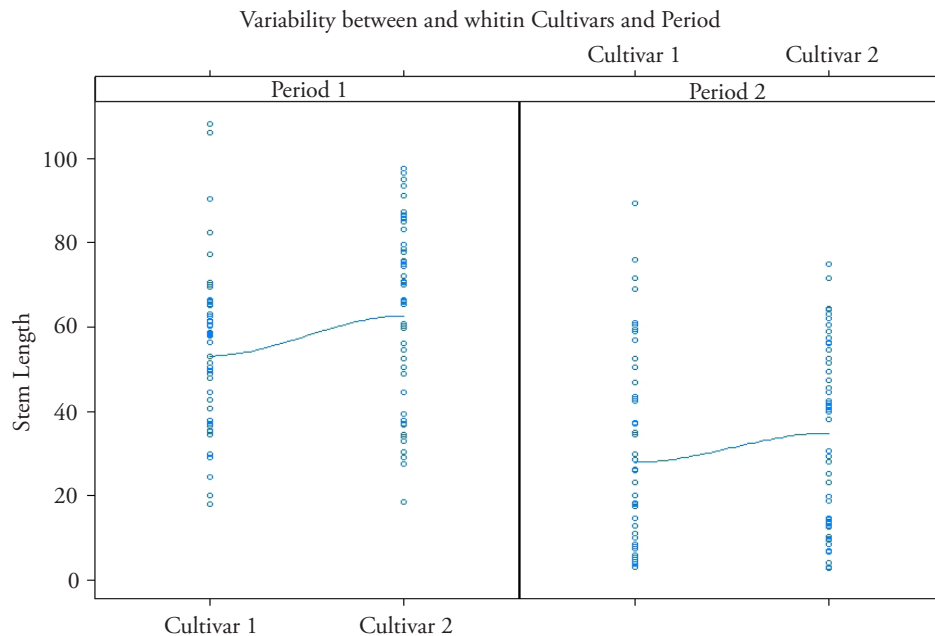


Figure 9. Variability inside cultivars and variability inside periods.
Figura 9. Variabilidad dentro de los cultivares y variabilidad dentro de los períodos.

growth curves of the plants was almost one. It means that plants which initiate “high” remained so over time, as well as “low” plants remained in this way over time (Figure 10).

CONCLUSIONS

This research showed that it is essential to know the distribution of the data, as well as the type of relationship between the explanatory and response variables, in order to correctly model it. After comparing several linear and nonlinear models, a GAM model was the best to identify the cultivar and time for producing roses between 50 to 70 cm of stems length, an appreciated quality characteristic. It identified a non-linear effect of relative humidity of a curve of approximately four degrees of freedom and linear effects of heat units and light. The best conditions to produce plants between 50 and 70 cm, were 650 to 830 heat units and between 82.5 and 85% of relative humidity. A GAMM model with plants variability as the random component, identified the April to May period with cultivar Blush as the best conditions to produced roses with the required characteristics.

CONCLUSIONES

Este estudio mostró que es fundamental conocer la distribución de los datos, así como el tipo de relación entre las variables explicativas y de respuesta, para poder modelarlas correctamente. Después de comparar varios modelos lineales y no lineales, el modelo GAM fue el mejor para identificar el cultivar y el tiempo para producir rosas con una longitud de tallo entre 50 y 70 cm, característica muy apreciada de calidad. Este modelo identificó un efecto no lineal de humedad relativa con una curva de cuatro grados de libertad aproximadamente y efectos lineales de unidades de calor y luz. Las mejores condiciones para producir plantas entre 50 y 70 cm de longitud fueron de 650 a 830 unidades de calor y entre 82.5 y 85% de humedad relativa. Un modelo GAMM, con la variabilidad de plantas como componente aleatorio, permitió identificar el período de abril a mayo para el cultivar Blush como las mejores condiciones para producir rosas con las características requeridas.

—Fin de la versión en Español—



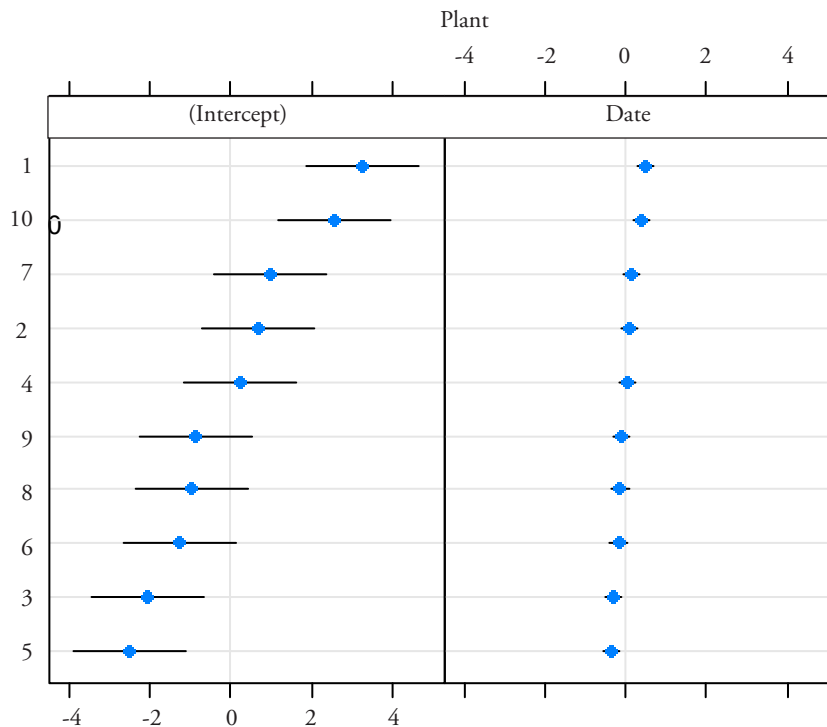


Figure 10. Intercepts and slopes centered random effects of plants.
 Figura 10. Efectos aleatorios centrados de interceptos y pendientes de plantas.

LITERATURE CITED

- Agresti, A. 2015. Foundations of Linear and Generalized Linear Models. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 444 p.
- Anderson, T. W., and D. A. Darling. 1954. A test of goodness of fit. *J. Am. Statist. Assoc.* 49: 765-769.
- Bates, D., M. Maechler, B. Bolker, and S. Walker. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects models using lme4. *J. Stat. Software.* 67: 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.
- Breslow, N. E., and D. G. Clayton. 1993. Approximate inference in Generalized Linear Mixed models. *J. Am. Stat. Assoc.* 88: 9-25.
- Cattaneo M. D., M. Jansson M., and W. K. Newey. 2018. Inference in Linear Regression Models with many covariates and heteroscedasticity. *J. Am. Stat. Assoc.* 113: 523, 1350-1361, DOI: 10.1080/01621459.2017.1328360.
- Cleveland W. S. 1979. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Am. Stat. Assoc.* 74: 829-936.
- De Felipe, M., J. A. Gerde, and J. L. Rotundo. 2016. Soybean genetic gain in maturity groups III to V in Argentina from 1980 to 2015. *Crop Sci.* 56: 3066-3077.
- Hastie, T. 2018. Package gam. R package version 1.16.
- Hastie T., and R. Tibshirani. 1986. Generalized Additive Models (with discussion). *Statistical Science.* Institute of Mathematical Statistics. 1: 297-318.
- Hox, J. J., M. Moerbeek, and R. Van de Schoot. 2017. Multilevel Analysis: Techniques and Applications. Routledge. 348 p.
- Marsaglia, G., and J. Marsaglia. 2004. Evaluating the Anderson-darling distribution. *J. Stat. Softw.* 9: 1-5.
- Mordor Intelligence LLP. 2020. United States Floriculture Market - Growth, Trends, and Forecast (2020 - 2025). 60 p. ID: 5865892.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of the model. *The Ann. Stat.* 6: 461-464.
- Venables W. N., and B. D. Ripley. 2002. Modern Applied Statistics with S. Fourth edition. Springer. 446 p.
- Wood, S. N. 2006. Generalized Additive Models: An Introduction with R. Second edition. CRC/Chapman & Hall, Boca Raton, Florida. 496 p.
- Wood, S. 2011. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *J. Royal Stat. Soc. Series B (Statistical Methodology).* 73: 3-36.
- Wood, S., and F. Scheip. 2017. gamm4: Generalized Additive Mixed Models using 'mgcv' and 'lme4'. <https://CRAN.R-project.org/package=gamm4>.
- Yee T. W. 2019. VGAM: Vector Generalized Linear and Additive Models. R package version 1.1-1. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=VGAM>.

BIOCONTROL DE *Trichoderma* spp. HACIA PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*)

BIOCONTROL OF *Trichoderma* spp. TO PATHOGENS OF SUGARCANE ROOT (*Saccharum officinarum*)

Lidia Concepción Gamboa-Villa¹, Edgar Martínez-Fernández², Patricia Martínez-Jaimes², Ramón Suárez-Rodríguez³, José Augusto Ramírez-Trujillo³

¹Maestría en Manejo de Recursos Naturales. ²Centro de Investigaciones Biológicas. (edgar@uaem.mx) ³Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Colonia Chamilpa. 62209. Cuernavaca, Morelos.

RESUMEN

La marchitez de la caña de azúcar la produce un complejo de especies de *Fusarium*, como *F. andiyazi* y *F. sacchari* que inducen la pudrición de las raíces. Para controlar esta enfermedad y disminuir el uso de fungicidas se ha propuesto el control biológico por medio de antagonistas del género *Trichoderma*. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* y en plantas de caña de azúcar la capacidad antagonista de cepas de *Trichoderma* hacia *F. andiyazi* y *F. sacchari*. La hipótesis fue que al menos una cepa de *Trichoderma* inhibe el crecimiento *in vitro* de *Fusarium* y favorece el desarrollo de las plantas de caña. Dieciocho cepas de *Trichoderma* se aislaron y se determinó su porcentaje de inhibición sobre el crecimiento micelial de especies de *Fusarium* con la técnica de cultivo dual en medio de cultivo papa dextrosa agar. El diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento. El grado de antagonismo de *Trichoderma* se evaluó a los 13 d. Las cepas T2 y T8 que mostraron las características mejores de antagonismo se eligieron para el bioensayo *in vivo*. Para la evaluación *in vivo* el sustrato estéril se inoculó con *F. andiyazi* y *F. sacchari* y las raíces de plantas de caña con las cepas T2 y T8 de *Trichoderma* en un diseño de bloques al azar, con tres bloques y tres repeticiones para cada tratamiento. Las variables evaluadas fueron altura de la planta (cm), biomasa húmeda y seca de la raíz (g), número y diámetro de tallos (mm) y longitud de la raíz (cm). Las cepas T2 y T8 se determinaron, con identificación morfológica y molecular, como *T. asperellum* y *T. koningiopsis*. El efecto de estas cepas en las plantas de caña fue benéfico; ya que incrementaron altura de planta, y longitud, biomasa húmeda y seca de raíces.

ABSTRACT

Wilting of sugarcane is produced by a complex of *Fusarium* species, such as *F. andiyazi* and *F. sacchari*, which induce rotting of roots. In order to control this disease and reduce the use of fungicides, biological control has been proposed by means of antagonists of the genus *Trichoderma*. The objective of this study was to evaluate *in vitro* and in sugar cane plants the antagonistic capacity of strains of *Trichoderma* against *F. andiyazi* and *F. sacchari*. The hypothesis was that at least one strain of *Trichoderma* inhibits the growth *in vitro* of *Fusarium* and favors the development of the sugarcane plants. Eighteen strains of *Trichoderma* were isolated and their percentage of inhibition was determined on the mycelial growth of *Fusarium* species with the technique of dual culture in potato dextrose agar culture medium. The experimental design was completely randomized, with four replicates per treatment. The degree of antagonism of *Trichoderma* was evaluated at 13 d. The strains T2 and T8 which showed the best characteristics of antagonism were selected for the *in vivo* bioassay. For the evaluation *in vivo*, the sterile substrate was inoculated with *F. andiyazi* and *F. sacchari*, and the roots of sugarcane plants with strains T2 and T8 of *Trichoderma* in a design of randomized blocks, with three blocks and three replicates for each treatment. The variables evaluated were plant height (cm), fresh and dry root biomass (g), number and diameter of stems (mm) and root length (cm). The strains T2 and T8 were determined with morphological and molecular identification as *T. asperellum* and *T. koningiopsis*. The effect of these species on the sugarcane plants was beneficial, given that they increased plant height, along with length, wet and dry biomass of roots.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 955-966. 2020.

Keywords: *Saccharum officinarum*, biological control, *Fusarium*, antagonism, *Trichoderma asperellum*, *T. koningiopsis*

Palabras clave: *Saccharum officinarum*, control biológico, *Fusarium*, antagonismo, *Trichoderma asperellum*, *T. koningiopsis*.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es uno de los cultivos agroindustriales importantes en regiones tropicales y México ocupa el sexto lugar de producción mundial. La superficie de siembra durante la zafra 2017-2018 fue 785 088 ha con una producción de azúcar de 6 318 424 Mg (CONADESUCA 2018). Las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos afectan el crecimiento vegetal y rendimiento del cultivo (Snyman *et al.*, 2011). Dentro del grupo de los hongos, géneros como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium* se han aislado de suelos cultivados con caña de azúcar (El-Amin y Saadabi, 2007). Diversas especies del género *Fusarium* están asociadas a las enfermedades de marchitez en caña de azúcar. En la India se ha identificado a *Fusarium moniliforme* (Gawade *et al.*, 2012) y a *F. sacchari* como agentes causales de la marchitez (Viswanathan *et al.*, 2012).

La presencia de un complejo de especies de *Fusarium* se ha identificado en cultivos de caña del estado de Morelos, México, las cuales pueden provocar pérdidas en producción hasta de 50%. Rebollar *et al.* (2012) mencionaron para Morelos y Michoacán las especies *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. verticilloides*, *F. andiyazi*, *F. kyuyensi* y *F. brachigybbosum* asociadas a marchitez. Martínez-Fernández *et al.* (2014) registraron a *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sacchari*, *F. andiyazi*, *F. nygamai* y *F. solani* en raíces necróticas de caña de azúcar.

La aplicación de fungicidas como el tiofanato metílico, carbendazim, oxiclóruo de cobre y mancozeb, es el método más utilizado para el control de estos fitopatógenos (Vishwakarma *et al.*, 2013) por efectividad y rapidez debidas a toxicidad, característica que también afecta a los organismos benéficos y el ambiente. De modo que la búsqueda de alternativas para el control de fitopatógenos es necesaria. Dentro del control biológico, el uso de organismos antagónicos hacia diferentes fitopatógenos es un método común y destacan los hongos del género *Trichoderma* que poseen tres mecanismos de acción: competencia por espacio o nutrientes, antibiosis (producción de metabolitos secundarios) y micoparasitismo (Saba *et al.*, 2012). Además, pueden colonizar raíces,

INTRODUCTION

Sugarcane (*Saccharum officinarum*) is one of the important agro-industrial crops in tropical regions, and Mexico occupies sixth place in world production. The sown surface during the 2017-2018 harvest was 785 088 ha with a sugar production of 6 318 424 Mg (CONADESUCA 2018). The diseases caused by fungi, bacteria, virus and nematodes affect the plant growth and yield of the crop (Snyman *et al.*, 2011). Within the group of fungi, genera such as *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Curvularia* and *Fusarium* have been isolated from soils cultivated with sugarcane (El-Amin and Saadabi, 2007). Diverse species of the genus *Fusarium* are associated with the wilting diseases in sugarcane. In India, *Fusarium moniliforme* (Gawade *et al.*, 2012) and *F. sacchari* have been identified as causal agents of wilting (Viswanathan *et al.*, 2012).

The presence of a complex of species of *Fusarium* has been identified in sugarcane crops in the state of Morelos, Mexico, which can cause losses in production by as much as 50%. Rebollar *et al.* (2012) mentioned for Morelos and Michoacán the species *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. verticilloides*, *F. andiyazi*, *F. kyuyensi* and *F. brachigybbosum* associated with wilting. Martínez-Fernández *et al.* (2014) registered *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sacchari*, *F. andiyazi*, *F. nygamai* and *F. solani* in necrotic roots of sugarcane.

The application of fungicides, such as thiophanate-methyl, carbendazim, copper oxychloride and mancozeb, is the method most widely used for the control of these phytopathogens (Vishwakarma *et al.*, 2013) because of their effectiveness and speed due to toxicity, a characteristic which also affects the beneficial organisms and the environment. Therefore, the search for alternatives for the control of phytopathogens is necessary. Within biological control, the use of antagonistic organisms to different phytopathogens is a common method, and the fungal genus *Trichoderma* is predominant. These fungi possess three action mechanisms: competition for space or nutrients, antibiosis (production of secondary metabolites) and mycoparasitism (Saba *et al.*, 2012). Furthermore, they can colonize roots, stimulate root growth, induce tolerance to stress, act as bio fertilizers, induce plant protection, stimulate germination, and bioremediation (Hermosa *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012).

estimulan el crecimiento del sistema radical, confieren tolerancia al estrés, actúan como biofertilizantes, inducen protección de las plantas, estimulan la germinación y biorremediación (Hermosa *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012).

El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* y en plantas de caña de azúcar la capacidad antagónica de *Trichoderma* hacia los patógenos *F. andiyazi* y *F. sacchari*. La hipótesis fue que al menos una cepa de *Trichoderma* inhibe el crecimiento de *Fusarium* en condiciones *in vitro* y favorece el desarrollo de las plantas de caña.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo

La recolección de las muestras de suelo de la rizósfera de la caña de azúcar se realizó en campos de los municipios de Ayala, Cuautla, Jojutla, Puente de Ixtla y Yauatepec en el estado de Morelos, México, según la metodología de El-Amin y Saadabi (2007).

Aislamiento de cepas de *Trichoderma*

Las 15 muestras de suelo recolectadas se procesaron por medio del método de dilución en placa (Khalili *et al.*, 2012). Los aislamientos se realizaron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon™) adicionado con ácido láctico. Las colonias seleccionadas fueron las que presentaron las características morfológicas de *Trichoderma*, como el tipo de crecimiento, forma y color de las colonias, de las cuales se obtuvieron cultivos monosporicos por medio de punta de hifa y se almacenaron en sílica gel (Rodríguez y Gato, 2010).

Fitopatógenos

Las especies *F. andiyazi* (cepa 51) y *F. sacchari* (cepa 9) se obtuvieron del almacén (cepario) de hongos fitopatógenos del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del estado de Morelos. Estas especies se aislaron antes de raíces necróticas de caña de azúcar del estado de Morelos y se comprobó su patogenicidad (Martínez-Fernández *et al.*, 2014).

Antagonismo *in vitro*

Los hongos evaluados se cultivaron de manera individual. Las especies patógenas crecieron en medio de cultivo PDA (Bioxon™) y las cepas de *Trichoderma* en medio extracto de malta

The objective of this study was to evaluate *in vitro* and in sugarcane plants the antagonistic capacity of *Trichoderma* against the pathogens *F. andiyazi* and *F. sacchari*. The hypothesis was that at least one strain of *Trichoderma* inhibits the growth of *Fusarium* under *in vitro* conditions and favors the development of sugarcane plants.

MATERIALS AND METHODS

Soil samples

The collection of the soil samples of the rhizosphere of the sugarcane was carried out in fields of the municipalities of Ayala, Cuautla, Jojutla, Puente de Ixtla and Yauatepec in the state of Morelos, Mexico, according to the methodology of El-Amin and Saadabi (2007).

Isolation of strains of *Trichoderma*

The 15 soil samples collected were processed by the method of plate dilution (Khalili *et al.*, 2012). The isolations were made in potato dextrose agar culture medium (PDA) (Bioxon™) added with lactic acid. The colonies selected were those that presented the morphological characteristics of *Trichoderma*, such as type of growth, form and color of the colonies, from which monosporic colonies were obtained by means of a hyphae point, and were stored in silica gel (Rodríguez and Gato, 2010).

Phytopathogens

The species *F. andiyazi* (strain 51) and *F. sacchari* (strain 9) were obtained from the strain culture storage unit (ceparium) of phytopathogenic fungi of the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) (UAM, Biological Research Center, Mexico) under Universidad Autónoma de Morelos. These species were previously isolated from necrotic roots of sugarcane from the state of Morelos, and their pathogenicity was confirmed (Martínez-Fernández *et al.*, 2014).

Antagonism *in vitro*

The fungi evaluated were cultivated individually. The pathogenic species were grown in PDA culture medium (Bioxon™) and the strains of *Trichoderma* in malt extract agar (EMA) (Merck™) medium during 7 d. For the quantitative evaluation, the dual culture technique (Dolatadabi *et al.*, 2012) was used with some modifications. Discs of mycelia of 7 mm were sliced separately from each species of *Fusarium* and placed

agar (EMA) (Merck™) durante 7 d. Para la evaluación cuantitativa se utilizó la técnica de cultivo dual (Dolatadabi *et al.*, 2012) con algunas modificaciones, se cortaron discos de micelio de 7 mm de diámetro de cada especie de *Fusarium* por separado y se colocaron en un extremo de la caja Petri con medio de cultivo PDA. Transcurridas 48 h se colocaron discos de micelio de 7 mm de *Trichoderma* en el extremo opuesto de la caja Petri. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, cada repetición contenía una confrontación. Cada 24 h se tomó lectura del crecimiento de los micelios. El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) de *Trichoderma* hacia las especies de *Fusarium* se calculó por medio de la fórmula:

$$\text{PIC} = \text{A-B/A} \times 100$$

donde A: crecimiento radial de *Fusarium* spp. como testigo; B: crecimiento radial de *Fusarium* spp. junto con *Trichoderma* spp.

La evaluación cualitativa se realizó a los 13 d y se evaluó el grado de antagonismo de acuerdo con la clasificación propuesta por Bell *et al.* (1982): grado 1, *Trichoderma* cubre completamente la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno; 2, *Trichoderma* ocupa al menos el 75% de la superficie del medio y limita el crecimiento del fitopatógeno; 3, *Trichoderma* y el fitopatógeno colonizan cada uno el 50% de la superficie del medio; 4, el fitopatógeno coloniza el 75% de la superficie del medio y limita el crecimiento de *Trichoderma*; 5, el fitopatógeno ocupa completamente la superficie del medio y crece sobre *Trichoderma*.

Los datos se analizaron por medio de ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa Statistica ver. 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Identificación morfológica y molecular de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* T2 y T8 que presentaron las características de antagonismo mejores hacia *Fusarium* spp. se identificaron morfológicamente con base en sus características macroscópicas y microscópicas (Samuels *et al.*, 1999; Samuels *et al.*, 2006). Para la identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* se realizó la extracción y purificación del ADN. Por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de 200 pb que comprende el quinto y parte del sexto intrón del gen que codifica para el factor de la traducción 1 (*tef1*) con el uso de los oligonucleótidos *tef1 fw*: GTG AGC GTG GTA TCA CCA y *tef1 rev*: GCC ATC CTT GGA GAC CAG C (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002), con el siguiente programa de PCR: 95 °C 3 min, 37 ciclos a 95 °C 40 s; 57 °C 50 s y 72 °C 30 s; 1 ciclo final a 72 °C 5 min. El producto de PCR se separó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%,

at one end of the Petri dish with PDA culture medium. After 48 h, discs of mycelia of 7 mm of *Trichoderma* were placed at the opposite end of the Petri dish. The experimental design was completely randomized with four replicates per treatment; each replicate contained a confrontation. A record of mycelial growth was taken every 24 h. The percentage of growth inhibition (PIC) of *Trichoderma* to the species of *Fusarium* was calculated with the following formula:

$$\text{PIC} = \text{A-B/A} \times 100$$

where A: radial growth of *Fusarium* spp. as control; B: radial growth of *Fusarium* spp. together with *Trichoderma* spp.

The qualitative evaluation was made at 13 d and the degree of antagonism was evaluated according to the classification proposed by Bell *et al.* (1982): degree 1, *Trichoderma* completely covers the surface of the medium and grows over the phytopathogen; 2, *Trichoderma* occupies at least 75% of the surface of the medium and limits the growth of the pathogen; 3, *Trichoderma* and the phytopathogen each colonize 50% of the surface of the medium; 4, the phytopathogen colonizes 75% of the surface of the medium and limits the growth of *Trichoderma*; 5, the phytopathogen completely occupies the surface of the medium and grows over *Trichoderma*.

Data were analyzed by ANOVA and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$), with the program Statistica ver. 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Morphological and molecular identification of *Trichoderma* spp.

T2 and T8 strains of *Trichoderma* which presented the best antagonistic characteristics to *Fusarium* spp. were morphologically identified based on their macroscopic and microscopic features (Samuels *et al.*, 2006). For the molecular identification of strains of *Trichoderma*, extraction and purification of the DNA was performed. Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was used to amplify a fragment of 200 pb which comprises the fifth and part of the sixth introns of the gene that codifies for the factor of translation 1 (*tef1*) using the oligonucleotides *tef1 fw*: GTG ACG GTG GTA TCA CCA and *tef1 rev*: GCC ATC CTT GGA GAC CAG C (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002), with the following PCR program: 95 °C 3 min, 37 cycles at 95 °C 40 s; 57 °C 50 s and 72 °C 30 s; 1 final cycle at 72 °C 5 min. The product of PCR was separated by electrophoresis in an agarose gel at 1.5%, and afterwards was purified with the kit QIAEX II, Qiagen Agarose Gel Extraction. The purified products of PCR were quantified and sent to the

y después se purificó con el kit QIAEX II Agarose Gel Extraction de Qiagen. Los productos purificados de PCR se cuantificaron y se enviaron a la Unidad de Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias del fragmento correspondiente al gen *tefl* (-200 pb) se compararon con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (acrónimo inglés del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los EEUU), con el uso de la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Evaluación de *Trichoderma* spp. en plantas de caña de azúcar.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp., hacia *F. andiyazi* y *F. sacchari* se seleccionaron las cepas T2 y T8 identificadas como *T. asperellum* y *T. koningiopsis*, respectivamente, para la evaluación *in vivo* con plantas de caña en maceta.

El inóculo de los hongos fitopatógenos *F. andiyazi* y *F. sacchari*, se obtuvo de colonias de 12 d de crecimiento en medio de cultivo PDA. Suspensiones de conidios se prepararon, ajustadas a 10^6 conidios mL⁻¹.

El sustrato se recolectó de un suelo de una parcela de caña de azúcar del municipio de Zacatepec, Morelos, y se esterilizó en autoclave. El suelo esterilizado se mezcló con agrolita y peat moss en una proporción de 2:1:1. Con este sustrato se llenaron macetas de 2 L al 80% de su capacidad.

Los tratamientos de la evaluación *in vivo* de *Trichoderma* spp. en las plantas de caña de azúcar fueron los siguientes: T1, *Trichoderma asperellum*; T2, *Trichoderma koningiopsis*; T3, *Trichoderma asperellum* – *Fusarium andiyazi*; T4, *Trichoderma asperellum* – *Fusarium sacchari*; T5, *Trichoderma koningiopsis* – *Fusarium andiyazi*; T6, *Trichoderma koningiopsis* – *Fusarium sacchari*; T7, *Fusarium andiyazi*; T8, *Fusarium sacchari*; T9, Testigo.

El sustrato de los tratamientos T3, T5 y T7 se inoculó con 100 mL de la suspensión de conidios de *F. andiyazi*. Para los tratamientos T4, T6 y T8 el sustrato de las macetas se inoculó con 100 mL de la suspensión de conidios de *F. sacchari*. En estos tratamientos la suspensión de conidios se combinó con el sustrato para producir una mezcla homogénea.

Las plantas de caña de azúcar sanas, obtenidas de cultivo de tejidos, se inocularon en las raíces con 20 mL de la suspensión de conidios de *T. asperellum* en los tratamientos T1, T3 y T4 y con *T. koningiopsis* en los tratamientos T2, T5 y T6. El tratamiento 9 fue el testigo absoluto, y no se aplicó *Fusarium* spp. a los sustratos ni *Trichoderma* a las plantas.

Las macetas con las plantas de caña se distribuyeron en un terreno en el municipio de Zacatepec, Morelos, en un diseño de bloque al azar, con tres bloques y tres repeticiones para cada

DNA Sequencing Unit of Instituto de Biotecnología, UNAM. The sequences of the fragment corresponding to the gene *tefl* (-200 pb) were compared with sequences available in the data base of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool).

Evaluation of *Trichoderma* spp. in sugarcane plants

According to the results obtained in the evaluation *in vitro* of *Trichoderma* spp. against *F. andiyazi* and *F. sacchari*, the strains T2 and T8 were selected, identified as *T. asperellum* and *T. koningiopsis*, respectively, for the *in vivo* evaluation with potted sugarcane plants.

The inoculum of the phytopathogenic fungi *F. andiyazi* and *F. sacchari* was obtained from colonies of 12 d growth in PDA culture medium. Suspensions of conidia were prepared, adjusted to 10^6 conidia mL⁻¹.

The substrate was collected from the soil of a sugarcane plot of the municipality of Zacatepec, Morelos, and was sterilized in an autoclave. The sterilized soil was mixed with perlite and peat moss in a proportion of 2:1:1. This substrate was used to fill 2 L pots at 80% of capacity.

The *in vivo* evaluation treatments of *Trichoderma* spp. in the sugarcane plants were as follows: T1, *Trichoderma asperellum*; T2, *Trichoderma koningiopsis*; T3, *Trichoderma asperellum* – *Fusarium andiyazi*; T4, *Trichoderma asperellum* – *Fusarium sacchari*; T5, *Trichoderma koningiopsis* – *Fusarium andiyazi*; T6, *Trichoderma koningiopsis* – *Fusarium sacchari*; T7, *Fusarium andiyazi*; T8, *Fusarium sacchari*; T9, Control.

The substrate of treatments T3, T5 and T7 was inoculated with 100 mL of the suspension of conidia of *F. andiyazi*. For treatments T4, T6 and T8 the substrate of the pots was inoculated with 100 mL of the suspension of conidia of *F. sacchari*. In these treatments, the suspension of conidia was combined with the substrate to produce a homogenous mixture.

The healthy sugarcane plants, obtained from tissue culture, were inoculated in the roots with 20 mL of suspension of conidia of *T. asperellum* in treatments T1, T3 and T4 and with *T. koningiopsis* in treatments T2, T5 and T6. Treatment 9 was the absolute control; thus, *Fusarium* spp. was not added to the substrates nor *Trichoderma* was applied to the plants.

Pots with the sugarcane plants were distributed in a plot in the municipality of Zacatepec, Morelos, in a randomized block design, with three blocks and three replicates for each treatment, giving a total of 81 plants evaluated. Plants were removed from the pots and the roots were washed with running water, three months after the inoculation. Variables evaluated were: plant height (cm), fresh and dry root biomass (g), number and diameter of stems (mm) and root length (cm). Data were

tratamiento, dando un total de 81 plantas evaluadas. Tres meses después de la inoculación las plantas se removieron de las macetas y las raíces se lavaron con agua corriente. Las variables evaluadas fueron: la altura de la planta (cm), biomasa húmeda y seca de la raíz (g), número y diámetro de tallos (mm) y longitud de la raíz (cm). Los datos se analizaron por medio de ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa Statistica ver. 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de *Trichoderma*

De las muestras de suelo se aislaron 18 cepas con las características típicas del género *Trichoderma*, como crecimiento rápido en medio de cultivo y desarrollo de conidios con coloración verde-amarilla, de acuerdo con Chaverri *et al.* (2015). *Trichoderma* es un género identificado por su morfología microscópica y las características que lo distinguen son la forma y el tamaño de los conidios filiales y conidióforos. En este estudio la colonia de la cepa T2 después de 7 d de crecimiento presentó un diámetro de 8 a 9 cm, formó de 2 a 3 anillos concéntricos, mostró producción densa de conidios, conidióforos ramificados, filiales ampuliformes, conidios globosos ligeramente ovalados con pigmentación verde amarilla, lo cual permitió identificarla como *T. asperellum* (Samuels *et al.*, 1999). La colonia de la cepa T8 a los 7 d de crecimiento presentó diámetro de 9 cm, formó de 2 a 3 anillos concéntricos, con conidióforos escasamente ramificados, filiales cortas y lageniformes, mostró producción densa de conidios elipsoidales en coloración verde-amarillo, lo cual permitió identificarla como *T. koningiopsis* (Samuels *et al.*, 2006).

La identidad de las cepas se confirmó por medio de la amplificación y secuenciación de una región de 200 pb del gen *tef1* (Kullning-Gradinger *et al.*, 2002). La secuencia de la cepa T2 mostró una identidad del 100% con *Trichoderma asperellum* strain TRS 746 (número de acceso: KP008926), mientras que la identidad de la cepa T8 fue 99% con *Trichoderma koningiopsis* GJS04-199 (número de acceso: FJ463268).

Antagonismo *in vitro*

En las evaluaciones en cultivos duales se observó el antagonismo de las 18 cepas de *Trichoderma* evaluadas hacia *F. sacchari* y *F. andiyazi*. El contacto

analizado usando ANOVA y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa Statistica ver. 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification of *Trichoderma*

From the soil samples, 18 strains were isolated with the typical characteristics of the genus *Trichoderma*, such as fast growth in culture medium and development of conidia with green-yellow coloring, according to Chaverri *et al.* (2015). *Trichoderma* is a genus identified by its microscopic morphology and distinctive characteristics are the form and size of the conidia, phialides and conidiophores. In this study, the colony of T2 strain after 7 d of growth presented a diameter of 8 to 9 cm, formed 2 to 3 concentric rings, showed dense production of conidia, branched conidiophores, ampulliform phialides, rounded conidia that were slightly oval with greenish yellow pigmentation, which permitted identification as *T. asperellum* (Samuels *et al.*, 1999). The colony of T8 strain at 7 d of growth presented a diameter of 9 cm, formed 2 to 3 concentric rings, with scantily branched conidia, short and lageniform phialides, showed dense production of ellipsoidal conidia with green-yellow coloring, which identified it as *T. koningiopsis* (Samuels *et al.*, 2006).

Identity of the strains was confirmed by amplification and sequencing of a region of 200 pb of the gen *tef1* (Kullning-Gradinger *et al.*, 2002). The sequence of the T2 strain showed an identity of 100% with *Trichoderma asperellum* strain TRS 746 (access number: KP008926), while the identity of T8 strain was 99% with *Trichoderma koningiopsis* GJS04-199 (access number: FJ463268).

Antagonism *in vitro*

In the evaluations in dual cultures the antagonism was observed of the 18 strains of *Trichoderma* evaluated against *F. sacchari* and *F. andiyazi*. The contact between the evaluated colonies of *Trichoderma* and *F. andiyazi* occurred at 48 h and with *F. sacchari* at 72 h. In that area in which the mycelia made contact, a beige strip was formed, which indicates a possible incompatibility between them. Our results agree with those of Thangavelu *et al.* (2004), who found and evaluated change in coloration. Contact zone

entre las colonias de *Trichoderma* evaluadas y *F. andiyazi* ocurrió a las 48 h y con *F. sacchari* a las 72 h. En el área en la cual los micelios hicieron contacto se formó una franja color beige, lo que indica la posibilidad de incompatibilidad entre ellos. Estos resultados concuerdan con los de Thangavelu *et al.* (2004) quienes hallaron y evaluaron este cambio en la coloración. Esta zona de contacto indica claramente la secreción de metabolitos tanto de *Fusarium* como de *Trichoderma*, los cuales se producen en respuesta al contacto (Sharma, 2011). *Trichoderma* tiene la capacidad de producir metabolitos volátiles y no volátiles (Patil *et al.*, 2012) así como enzimas hidrolíticas extracelulares y metabolitos antifúngicos secundarios que actúan sinérgicamente en la inhibición del crecimiento fúngico (Naglot *et al.*, 2015).

Las cepas de *Trichoderma* indujeron un PIC variable hacia cada patógeno evaluado. El análisis estadístico mostró que el crecimiento *in vitro* de *F. sacchari* disminuyó ($p \leq 0.05$) de 44.37% a 32.5% en la evaluación con las cepas de *Trichoderma* spp. (Cuadro 1). La cepa de *Trichoderma* T2 indujo la

clearly indicates the secretion of metabolites from both *Fusarium* and *Trichoderma*, which are produced in response to contact (Sharma, 2011). *Trichoderma* has the capacity of producing volatile and nonvolatile metabolites (Patil *et al.*, 2012), as well as extracellular hydrolytic enzymes and secondary antifungal metabolites, with synergic action on the inhibition of fungal growth (Naglot *et al.*, 2015).

The strains of *Trichoderma* induced a variable percentage of growth inhibition (PIC) against each pathogen evaluated. The statistical analysis showed that the *in vitro* growth of *F. sacchari* decreased ($p \leq 0.05$) from 44.3 to 32.5% in the evaluation with the strains of *Trichoderma* spp. (Table 1). The T2 strain of *Trichoderma* induced the highest inhibition (44.37%) of growth, followed by the T4, T8 and T11 strains with 40.65% inhibition. Furthermore, the growth *in vitro* of *F. andiyazi* decreased ($p \leq 0.05$) from 48.75 to 39.37%. In this case, the T8 strain of *Trichoderma* induced the highest inhibition (48.75%) of growth, followed by the T2 strain with 46.26%. The T6 strain induced the lowest PIC to the two species of *Fusarium* evaluated (Table 1).

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento (%) y sobrecrecimiento (%) de *Trichoderma* spp. hacia *F. sacchari* y *F. andiyazi*.

Table 1. Inhibition of growth (%) and overgrowth (%) of *Trichoderma* spp. against *F. sacchari* and *F. andiyazi*.

Tratamiento (cepa)	PIC en <i>Fusarium sacchari</i>	PIC en <i>Fusarium andiyazi</i>	Sobrecrecimiento en <i>F. sacchari</i>	Sobrecrecimiento en <i>F. andiyazi</i>
T1	38.12 bcd	43.12 bcd	100 c	75.0 b
T2	44.37 d	46.26 cd	75.0 b	68.75 b
T3	40.0 cd	41.25 bc	100 c	93.75 b
T4	40.62 cd	45.0 bcd	75.0 b	68.75 b
T5	35.62 b	41.87 bc	68.75 b	75.0 b
T6	32.5 b	39.37 b	75.0 b	75.0 b
T7	37.5 bc	43.12 bcd	100 c	87.5 b
T8	40.62 cd	48.75 d	100 c	81.25 b
T9	40.0 cd	45.0 bcd	100 c	68.75 b
T10	36.87 bc	40.62 bc	56.25 b	81.25 b
T11	40.62 cd	43.75 bcd	75.0 b	68.75 b
T12	35.62 b	43.12 bcd	75.0 b	50.0 b
T13	39.37 cd	42.50 bc	75.0 b	87.5 b
T14	37.5 bc	43.12 bcd	100 c	87.5 b
T15	38.75 bcd	40.0 b	75.0 b	75.0 b
T16	38.12 bcd	40.0 b	75.0 b	87.5 b
T17	38.75 bcd	41.87 bc	75.0 b	75.0 b
T18	38.12 bcd	43.75bcd	56.25 b	62.5 b
19 (testigo)	0 a	0 a	0 a	0 a

Valores con letras diferentes indica diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Values with different letters indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

mayor inhibición (44.37%) del crecimiento, seguida de las cepas T4, T8 y T11 con 40.65% de inhibición; además, el crecimiento *in vitro* de *F. andiyazi* disminuyó ($p \leq 0.05$) de 48.75% a 39.37%. En este caso la cepa de *Trichoderma* T8 indujo la mayor inhibición (48.75%) de crecimiento, seguida de la cepa T2 con 46.26%. La cepa T6 indujo el menor PIC hacia las dos especies de *Fusarium* evaluadas (Cuadro 1).

Los resultados fueron superiores a lo documentado por Gawade *et al.* (2012) acerca del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* hacia el género *Fusarium*, pero resultaron menores a los observados por Naglot *et al.* (2015) con valores de PIC desde 60 a 75%. Es notable que *Trichoderma* puede mostrar una variabilidad en la inducción de PIC hacia los diferentes grupos de patógenos, por lo cual es necesario una selección específica para cada patógeno (Fernandes *et al.*, 2013) y pese a que los niveles de PIC son menores a lo informado en otros estudios, los aislamientos mostraron eficacia variable sobre las dos especies patógenas.

El grado de antagonismo de las 18 cepas de *Trichoderma* fue diferente ($p \leq 0.05$) hacia las dos especies de *Fusarium*. Las cepas T1, T3, T7, T8, T9 y T14 superaron en 100% el crecimiento sobre *F. sacchari* y las cepas T2, T4, T6, T11, T12, T13, T15, T16 y T17 en 75% (Cuadro 1). Por tanto, de acuerdo con Bell *et al.* (1982), se les clasifica dentro de los grados de antagonismo 1 y 2, respectivamente. La cepa T3 superó en 93.75% el crecimiento sobre *F. andiyazi* y las cepas T7, T13, T14 y T16 en 87.5%, y estas cepas se catalogan dentro del grado 1 de antagonismo; las cepas T8 y T10 crecieron 81.25% sobre *Fusarium* y las cepas T1, T5, T6, T15 y T16 75%, con un antagonismo grado 2.

Estos resultados concuerdan con lo citado por Fernandes *et al.* (2013), quienes indicaron que *Trichoderma* puede superar en crecimiento en 50-100% a diversos hongos fitopatógenos. El crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre las especies de *Fusarium* registrado en nuestro estudio, pudo ser favorecido por la producción de diversas enzimas que degradan a la pared celular, lo cual les permitió infectar las hifas de los patógenos (Schickler y Chet, 1997). Naglot *et al.* (2015) indicaron que *T. viride* secreta 1, 3, β glucanasa, pectinasas, proteasas, amilasas y quitinasas. Además, Michel-Aceves *et al.* (2005) documentaron la producción de quitinasas y glucanasas por *T. harzianum* y *T. koningii* cuando se enfrentan con *F. subglutinans* y *F. oxysporum*.

The results were superior to those reported by Gawade *et al.* (2012) of the antagonism of some species of *Trichoderma* to the genera *Fusarium*, but resulted lower than those observed by Naglot *et al.* (2015) with values of PIC from 60 to 75%. It is notable that *Trichoderma* can show a variability in the induction of PIC toward the different groups of pathogens, therefore it is necessary to have a specific selection for each pathogen (Fernandes *et al.*, 2013). Despite our observed levels of PIC were lower than those reported in other studies, these isolates showed variable efficacy over two species of pathogens.

The degree of antagonism of the 18 strains of *Trichoderma* was different ($p \leq 0.05$) toward the two species of *Fusarium*. Strains T1, T3, T7, T8, T9 and T14 surpassed by 100% the growth over *F. sacchari*, and strains T2, T4, T6, T11, T12, T13, T15, T16 and T17 were higher by 75% (Table 1). Therefore, according to Bell *et al.* (1982), they are classified as degree of antagonism 1 and 2, respectively. T3 strain growth surpassed by 93.75% over *F. andiyazi*, and the strains T7, T13, T14 and T16, by 87.5%, these strains are catalogued within degree 1 of antagonism. Strains T8 and T10 grew 81.25% over *Fusarium* and strains T1, T5, T6, T15 and T16, 75%, with an antagonism degree of 2.

These results concur with those cited by Fernandes *et al.* (2013), who indicated that *Trichoderma* can surpass in growth by 50-100% diverse phytopathogenic fungi. The registered growth of the strains of *Trichoderma* over the species of *Fusarium* in our study may have been favored by the production of diverse enzymes that degrade the cell wall, which would allow them to infect the hyphae of the pathogens (Schickler and Chet, 1997). Naglot *et al.* (2015) indicated that *T. viride* secretes 1, 3, β glucanase, pectinases, proteases, amylases and chitinases. In addition, Michel-Aceves *et al.* (2005) documented the production of chitinases and glucanases by *T. harzianum* and *T. koningii* when confronted *F. subglutinans* and *F. oxysporum*.

Biocontrol of *F. andiyazi* and *F. sacchari* with *Trichoderma* spp. in sugarcane plants

Sugarcane plants inoculated with the pathogens developed first visible symptoms at 15 d. Plants inoculated only with *F. andiyazi* (T7) and *F. sacchari* (T8) developed symptoms of wilting, scant development, flaccidity, curling, chlorosis and

Biocontrol de *F. andiyazi* y *F. sacchari* con *Trichoderma* spp. en plantas de caña de azúcar

Las plantas de caña de azúcar inoculadas con los patógenos desarrollaron los primeros síntomas visibles a los 15 d. Las plantas inoculadas solo con *F. andiyazi* (T7) y *F. sacchari* (T8) desarrollaron síntomas de marchitez, poco desarrollo, flacidez, enrollamiento, clorosis y malformación en algunos tallos. Asimismo, a 15 d después de la inoculación con los tratamientos 3, 6, 7 y 8 se indujo la necrosis de los tejidos de las raíces. Viswanathan *et al.* (2012) encontraron que el desarrollo de una sintomatología similar cuando se inoculan plantas de caña de azúcar con *F. sacchari*. Con respecto al efecto de los tratamientos en el número y diámetro de los tallos no hubo diferencias estadísticas. La altura fue diferente entre los tratamientos ($p \leq 0.05$); la altura mayor se obtuvo en las plantas inoculadas con las especies de *Trichoderma*, y la menor en las plantas inoculadas solo con *F. andiyazi* (T7).

En la longitud de las raíces, así como en la biomasa húmeda y seca de las mismas, las plantas presentaron diferencias ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 2). En aquellas inoculadas con las especies de *Trichoderma* (T1 y T2) presentaron una longitud mayor de las raíces en comparación con las plantas inoculadas solo con las especies de *Fusarium*, y la

malformation in some stems. Similarly, at 15 d after the inoculation with treatments 3, 6, 7 and 8, necrosis of root tissue was induced. Viswanathan *et al.* (2012) found the development of a similar symptomology when sugarcane plants were inoculated with *F. sacchari*. Regarding the effect of treatments on number and diameter of stems, there were no statistical differences. The height was different among the treatments ($p \leq 0.05$); the greatest height was obtained in plants inoculated with *Trichoderma* species, and the lowest in those inoculated with only *F. andiyazi* (T7).

In the length of the roots, as well as in fresh and dry root biomass, plants presented differences ($p \leq 0.05$) among treatments (Table 2). In those inoculated with the species of *Trichoderma* (T1 and T2), plants showed a greater length in the roots compared with those inoculated with species of *Fusarium*, and the length was shorter in the plants inoculated with *F. andiyazi*. Fresh and dry biomass of the roots was greater in the plants inoculated with *T. koningiopsis* (T2 and T5). In contrast, plants with lower fresh and dry biomass in roots were those inoculated only with *F. andiyazi* (T7).

In the plants of treatments 3, 4, 5 and 6, inoculated with *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp., the effect of the antagonists was evident, inducing the highest values in the evaluated variables compared

Cuadro 2. Efecto de la inoculación de *Trichoderma asperellum* y *T. koningiopsis* en las variables de crecimiento de caña de azúcar.

Table 2. Effect of inoculation of *Trichoderma asperellum* and *T. koningiopsis* in the growth variables of sugarcane.

Tratamiento	Número de tallos	Diámetro de tallos (cm)	Altura de tallos (cm)	Longitud de raíces (cm)	Biomasa húmeda raíces (g)	Biomasa seca raíces (g)
1 <i>Trichoderma asperellum</i>	6.0 a	0.89 a	22.96 ab	62.43 a	19.83 ab	5.0 ab
2 <i>Trichoderma koningiopsis</i>	5.6 a	0.86 a	21.3 ab	54.46 ab	26.48 ab	6.36 a
3 <i>Trichoderma asperellum-Fusarium andiyazi</i>	6.0 a	0.85 a	18.4 ab	50.43 ab	23.96 ab	5.33 ab
4 <i>Trichoderma asperellum-Fusarium sacchari</i>	5.6 a	0.63 a	14.23 ab	33.93 ab	19.40 ab	4.36 ab
5 <i>Trichoderma koningiopsis-Fusarium andiyazi</i>	4.6 a	1.02 a	27.86 a	43.73 ab	27.16 a	5.70 ab
6 <i>Trichoderma koningiopsis-Fusarium sacchari</i>	5.0 a	0.93 a	17.73 ab	50.16 ab	18.33 ab	4.16 ab
7 <i>Fusarium andiyazi</i>	2.67 a	0.43 a	9.73 b	25.73 b	9.86 b	2.0 b
8 <i>Fusarium sacchari</i>	4.33 a	0.74 a	19.73 ab	38.96 ab	20.23 ab	4.20 ab
9 Testigo	4.0 a	1.0 a	16.16ab	55.66 ab	16.16 ab	2.20 b

Valores con letras diferentes indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Values with different letters indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

longitud fue menor en las plantas inoculadas con *F. andiyazi*. La biomasa húmeda y seca de las raíces fue mayor en las plantas inoculadas con *T. koningiopsis* (T2 y T5). En contraste, las plantas con biomasa húmeda y seca menores en raíces fueron las inoculadas solo con *F. andiyazi* (T7).

En las plantas de los tratamientos 3, 4, 5 y 6, inoculadas con *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. fue evidente el efecto de los antagonistas que indujeron los valores más altos en las variables evaluadas en comparación con los tratamientos en donde solo se aplicaron los patógenos. En el tratamiento 3 (*T. asperellum* - *F. andiyazi*) las plantas mostraron un desarrollo mayor en las variables evaluadas que las del tratamiento 7 inoculadas solo con *F. andiyazi*. En la interacción con *F. sacchari* (T4) solo indujeron valores más altos en número de tallos y biomasa seca de las raíces. En el tratamiento 5 (*T. koningiopsis* - *F. andiyazi*) los valores de las variables evaluadas en las plantas fueron superiores en comparación con las inoculadas solo con el patógeno *F. andiyazi* (T7) y se obtuvieron diferencias significativas en altura de los tallos, longitud de raíces, biomasa húmeda y seca de las raíces. Estos datos indican la participación de *T. koningiopsis* en limitar la infección de *F. andiyazi* en las raíces de estas plantas. En la interacción de *T. koningiopsis* con *F. sacchari* solo se presentaron valores altos en número y diámetro de tallos y longitud de raíces.

En relación con la aplicación de *Trichoderma* en plantas, algunas cepas ejercen un efecto benéfico al interactuar directamente con las raíces, e incrementan el crecimiento de las plantas y resistencia a enfermedades (Hermosa *et al.*, 2012). La aplicación de *T. asperellum* aumenta la longitud del tallo y la raíz de las plantas de jitomate y reduce la incidencia de la marchitez ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Patel y Saraf, 2017). *Trichoderma koningiopsis* influye en la disminución de la pudrición basal de la cebolla causada por *F. oxysporum* (Sánchez *et al.*, 2015), en la reducción de la fusariosis o pudrición del fruto de la piña, causada por *F. guttiforme* en cultivos de Brasil (Trocoli *et al.*, 2017). Además, esta especie induce la respuesta de defensa sistémica contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en plantas de tomate (Jaimes-Suárez *et al.*, 2009) y se han aislado compuestos antimicrobianos conocidos como koningioninas que tienen actividad contra *F. oxysporum* y *F. flocciferum* (Hu *et al.*, 2016).

with treatments in which only the pathogens were applied. In treatment 3 (*T. asperellum* - *F. andiyazi*), plants showed a greater development in the variables evaluated than those of treatment 7 inoculated only with *F. andiyazi*. In the interaction with *F. sacchari* (T4), higher values were induced only in number of stems and dry biomass of roots. In treatment 5 (*T. koningiopsis* - *F. andiyazi*), values of the evaluated variables in the plants were higher compared with those inoculated only with the pathogen *F. andiyazi* (T7), and significant differences were obtained in stem height, root length, and fresh and dry biomass of the roots. These data indicate the participation of *T. koningiopsis* in limiting the infection of *F. andiyazi* in the roots of these plants. On the interaction of *T. koningiopsis* with *F. sacchari*, high values were found only in number and diameter of stems and root length.

Regarding application of *Trichoderma* in plants, some strains exert a beneficial effect by interacting directly with the roots, increasing the growth of plants and resistance to diseases (Hermosa *et al.*, 2012). The application of *T. asperellum* increases the length of stem and root in tomato plants and reduces the incidence of wilting caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Patel and Saraf, 2017). *Trichoderma koningiopsis* influences decrease in basal rotting of onion caused by *F. oxysporum* (Sánchez *et al.*, 2015); also, in the reduction of fusariosis (rotting) of pineapple fruit, caused by *F. guttiforme* in crops of Brazil (Trocoli *et al.*, 2017). In addition, this species induces the systemic defense response against *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants (Jaimes-Suárez *et al.*, 2009), as antimicrobial compounds known as koningionins, which have activity against *F. oxysporum* and *F. flocciferum*, were isolated (Hu *et al.*, 2016).

CONCLUSIONS

The 18 isolates of *Trichoderma* analyzed in this study showed differences in their antagonistic capacity to *Fusarium andiyazi* and *F. sacchari*. Two of the strains, identified as *T. asperellum* and *T. koningiopsis*, exhibited the best antagonistic characteristics under *in vitro* conditions and in the sugarcane plants against the root pathogens *F. andiyazi* and *F. sacchari*.

These two species of *Trichoderma* produced a beneficial effect on the development of the sugarcane

CONCLUSIONES

Los 18 aislamientos de *Trichoderma* analizados en este estudio mostraron diferencias en su capacidad antagonica hacia *Fusarium andiyazi* y *F. sacchari*. Dos de las cepas, identificadas como *T. asperellum* y *T. koningiopsis* presentaron las mejores características antagonicas en condiciones *in vitro* y en las plantas de caña de azúcar hacia los patógenos de la raíz *F. andiyazi* y *F. sacchari*.

Las dos especies de *Trichoderma* produjeron un efecto benéfico en el desarrollo de las plantas de caña de azúcar, que se demostró el incremento en el número de tallos, altura, diámetro de tallos, longitud de raíz, biomasa húmeda y seca de las raíces. De esta manera *Trichoderma asperellum* y *T. koningiopsis* tienen potencial como agentes de control biológico de patógenos de la raíz en cultivos de caña de azúcar.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de postgrado No. 422996 otorgada a L. C. Gamboa-Villa.

LITERATURA CITADA

- Bell, D. K., H. D. Well, and C. R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Chaverri, P., F. Branco-Rocha, W. Jaklitsch, R. Gazis, T. Degenkolb, and G. J. Samuels. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107: 558-590.
- CONADESUCA (Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar). 2018. Balance nacional de azúcar y edulcorantes, ciclo 2018. <https://www.gob.mx/conadesuca/articulos> (Consulta: enero 2019).
- El-Amin A., and A. M. A. Saadabi. 2007. Contribution to the knowledge of soil fungi in Sudan rhizosphere mycoflora of sugarcane at Kenana Sugar Estate. *Int. J. Bot.* 3: 97-102.
- Fernandes, T., F. Cardoso, A. Stecca, R. Silva, R. Santos, and C. Ulhoa. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett.* 35:1461-1468.
- Gawade, D. B., B. H. Pawar, S. J. Gawande, and V. C. Vasekar. 2012. Antagonist effect of *Trichoderma* against *Fusarium moniliformae* the causal of sugarcane wilt. *Amer.-Euras. J. Agri. Environ.* 12: 1236-1241.
- Hermosa, R., A. Viterbo, I. Chet, and E. Monte. 2012. Plant beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.

plants, which was demonstrated in the increment in the number of stems, height, stem diameter, root length, and fresh and dry root biomass. Therefore, *Trichoderma asperellum* and *T. koningiopsis* have potential as biological control agents against root pathogens in sugarcane cultivation.

—End of the English version—

—*—

- Hu, M., L. Qi-Ling, Y. Ya-Bin, L. Kai, L. Cui-Ping, Z. Li-Xing, and D. Zhong-Tao. 2017. Koninginins R-S from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis*. *Nat. Prod. Res.* 31: 835-839.
- Jaimes-Suárez, Y., C. A. Moreno-Velandia, y A. M. Cotes-Prado. 2009. Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* Th003. *Acta Biol. Colomb.* 14: 111-120.
- Khalili, E., M. Sadravi, S. Naeimi, and V. Khosravi. 2012. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Braz. J. Microbiol.* 297-305.
- Kullning-Gradinger C. M., G. Szakacs, and C. P. Kubicek. 2002. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.* 106: 757-767.
- Martínez-Fernández E., P. Martínez-Jaimes, y J. C. García-Montalvo. 2014. Marchitez de la caña de azúcar en Morelos. Comité estatal de sanidad vegetal del estado de Morelos A.C. *Monitor Agríc.* 27: 11-14.
- Michel-Aceves A., M. Otero-Sánchez, O. Rebolledo-Domínguez, R. Lezama-Gutiérrez, y M. Ochoa-Moreno. 2005. Producción y efecto antagonico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp. en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 11: 273-278.
- Naglot, A., S. Goswami, I. Rahman, D. Shrimali, K. Yadav, K. Vikas, A. Rabha, H. Gogoi, and V. Veer. 2015. Antagonistic potential of native *Trichoderma viride* strain against potent tea fungal pathogens in north east India. *Plant Pathol. J.* 31: 278-289.
- Patel, S., and M. Saraf. 2017. Biocontrol efficacy of *Trichoderma asperellum* MSST against tomato wilting by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Arch. Phytopathol. Plant Protec.* 50: 228-238
- Patil, A., A. Laddha, A. Lunge A, H. Paikrao, and S. Mahure. 2012. *In vitro* antagonistic properties of selected *Trichoderma* species against tomato root rot causing *Pythium* species. *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 1: 302-315.
- Rebollar, A. A., J. R. Sánchez, y H. V. Silva. 2012. Manejo integrado de *Fusarium* spp. en variedades cultivadas y promotoras de caña de azúcar. *Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México.* 19 p.
- Rodríguez, B. D., y C. Y. Gato. 2010. Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad.* 14: 241-246.

- Saba, H., D. Vibhash, M. Manisha, K. S. Prashant, H. Farhan, and A. Tauseef. 2012. *Trichoderma*- a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere* 3: 524-531.
- Samuels, G. J., E. Lieckfeldt, and H. I. Nirenberg. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia and redescription of *T. viride*. *Sydowia*. 51: 71-88.
- Samuels, G. J., S. L. Dodd, L. Bing-Shen, O. Petrini, S. Hans-Josef, and I. S. Druzhinina. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Mycology* 56: 67-133.
- Sánchez, A. D., V. Barrera, G. E. Reybet, and M. C. Sosa. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Rev. Fac. Agron. La Plata* 114: 61-70.
- Schickler, H., and I. Chet. 1997. Heterologous chitinase gene expresión to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 19: 169-201.
- Sharma, P. 2011. Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Aust. J. Crop Sci.* 5: 1027-1038.
- Snyman, S. J., G. M. Meyer, A. C. Koch, M. Banasiak, and M. P. Watt. 2011. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47: 234-249.
- Thangavelu, R., A. Palaniswami, and R. Velazhahanc. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agri. Ecos. Environ.* 103: 259-263.
- Trocoli, R. O., F. P. Monteiro, P. O. Santos, and J. T. De Souza. 2017. Field applications of *Trichoderma* reduce pineapple fusariosis severity and increase fruit weight. *J. Plant Pathol.* 99: 225-228.
- Viswanathan, R., M. Poongothai, P. Malathi, and A. R. Sundar. 2012. Sugarcane wilt: new insights into pathogen identity, variability and pathogenicity. *Funct. Plant Sci. Biotech.* 6: 30-39.
- Vishwakarma, S. K., P. Kumar, A. Nigam, A. Singh, and A. Kumar A. 2013. Pokkah Boeng: an emerging disease of sugarcane. *Plant Pathol. Microbiol.* 4:170

BIOFERTILIZACIÓN FOLIAR CON ALGAS MARINAS (*Algae* (L.)) A UN VIÑEDO Y SU RELACIÓN CON CONTENIDO DE HIERRO, FOTOSÍNTESIS Y RENDIMIENTO

FOLIAR BIOFERTILIZATION WITH SEA WEEDS (*Algae* (L.)) ON A VINEYARD IN RELATION TO IRON CONTENT, PHOTOSYNTHESIS AND YIELD

Saúl Alejandro **Salmerón-Bravo**¹, Alejandro **Zermeño-González**^{1*}, Jorge **Méndez-González**², Homero **Ramírez-Rodríguez**³, Martín **Cadena-Zapata**⁴

¹Departamento de Riego y Drenaje. ²Departamento Forestal. ³Departamento de Horticultura. ⁴Departamento de Maquinaria Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. 25315. Saltillo, Coahuila. México. (azermenog@hotmail.com).

RESUMEN

Uno de los problemas que limitan el desarrollo de los viñedos es la clorosis de las plantas por la deficiencia de Fe, la cual es muy frecuente en los suelos calizos. La aplicación foliar de biofertilizantes con Fe puede incrementar el contenido de este elemento en las hojas de las plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) y reducir la clorosis. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un fertilizante foliar, orgánico, elaborado con extractos de algas marinas (*Algae* (L.)), adicionado con Fe (6%) y Mn (3%), en el contenido de Fe y clorofila de las hojas, tasa de fotosíntesis foliar y rendimiento de frutos de plantas de vid del cultivar (cv.) Sauvignon Blanc. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos (sin aplicación del biofertilizante, con una, dos y tres aplicaciones) y cuatro repeticiones. Las aplicaciones foliares iniciaron al final de la etapa vegetativa en intervalos de 15 d. La comparación de medias de tratamientos se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados del estudio mostraron que cada aplicación del biofertilizante incrementó proporcionalmente el contenido de hierro de las hojas. Dos aplicaciones aumentaron el contenido relativo de clorofila y se necesitaron tres aplicaciones para incrementar la tasa de fotosíntesis foliar. El efecto de las aplicaciones del biofertilizante en el contenido de Fe, contenido relativo de clorofila y la tasa de fotosíntesis foliar incrementaron el rendimiento de fruto del cv. Sauvignon Blanc.

Palabras clave: vid, *Vitis vinifera*, cv. Sauvignon Blanc, clorofila, clorosis férrica.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2020. Aprobado: junio, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 967-976. 2020.

ABSTRACT

One of the problems that restrict the development of the vineyards is the chlorosis of the plants due to the deficiency of Fe, which is very frequent in limy soils. Foliar application of biofertilizers with Fe can increase the content of this element in the leaves of vine plants (*Vitis vinifera* L.) and reduce chlorosis. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of a foliar, organic fertilizer, elaborated with seaweed extracts (*Algae* (L.)), added with Fe (6%) and Mn (3%), on the Fe and chlorophyll content of the leaves, rate of foliar photosynthesis and fruit yield of Sauvignon Blanc cultivar variety (cv.) vine plants. The experimental design was completely randomized with four treatments (without application of the biofertilizer, with one, two, three applications) and four replicates. Foliar applications started at the end of the vegetative stage in intervals of 15 d. The comparison of treatment means was made with the Tukey test ($p \leq 0.05$). Results showed that each application of the biofertilizer increased proportionally the iron content in leaves. Two applications increased relative chlorophyll content, and three applications were needed to increase the rate of foliar photosynthesis. The effect of the biofertilizer applications on the Fe content, relative chlorophyll content and the rate of foliar photosynthesis increased the fruit yield of cv. Sauvignon Blanc.

Key words: vine, *Vitis vinifera*, Sauvignon Blanc cv., chlorophyll, iron chlorosis.

INTRODUCTION

Seaweeds (*Algae* (L.)) are photosynthetic eukaryotic organisms with potential use in animal and human food; they also have industrial applications (Dominguez, 2013), but are

INTRODUCCIÓN

Las algas marinas (*Algae* (L.)) son organismos eucariotas fotosintéticos con potencial de uso en la alimentación animal y humana y tienen aplicaciones industriales (Domínguez, 2013), pero se usan poco como fuentes de nutrimentos para las plantas. Las algas se diferencian de las plantas superiores porque carecen de tallos, hojas, raíces y sistemas vasculares; se anclan a objetos sólidos, absorben los nutrimentos directamente del agua, y elaboran compuestos estructurales través de la fotosíntesis.

Debido a su capacidad para absorber y concentrar de modo selectivo sustancias inorgánicas del mar, el contenido de minerales de las algas marinas es mayor que el de las plantas terrestres. Las algas tienen contenidos altos de Mg, Ca, P, K y Na (macronutrientes) y, además, tienen I, Fe, Cu, Cd, Ni, Hg y Zn. Los extractos de algas marinas se pueden usar como suplementos nutricionales o fertilizantes en la agricultura y horticultura, y como biofertilizantes en extracto líquido o granular (polvo) de aplicación foliar o en el suelo (Hernández-Herrera *et al.*, 2013).

Por su importancia económica y cultural, el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los más antiguos del mundo. Debido a su consumo diversificado, la uva se caracteriza por su valor económico alto. Por ejemplo, el 31% de la producción mundial se destina al mercado en fresco, 67% para elaborar vinos y otras bebidas alcohólicas, y el 2% restante se consume como fruta seca (OIV, 2012; FAO, 2013).

En México, la producción de vid se concentra en los estados de Baja California, Sonora, Aguascalientes, Coahuila y Zacatecas, con 98.2% de la producción anual (El Economista, 2013), y Sonora con 7% tiene la producción mayor (Hidroponía, 2017). El 63% se consume en fresco, 24.4% para la elaboración de vinos y jugos, y 12.6% se deshidrata (SAGARPA, 2017).

Entre las variedades viníferas se tiene al cv Sauvignon Blanc originaria de la región de Burdeos, Francia, y se le considera después de la Chardonnay, la variedad más fina entre las cepas blancas de origen francés. La planta es resistente al frío, de brotación temprana. El racimo es de tamaño mediano y forma cilíndrica; las bayas son de tamaño mediano, forma redonda y color amarillo dorado, produce vinos elegantes, secos y ácidos; de color amarillo brillante con matices verdes (BBvinos, 2017). Este cultivar presenta a

little used as plant nutrient sources. Algae differ from higher plants because they lack stems, leaves, roots and vascular systems. They anchor themselves to solid objects, absorb nutrients directly from the water, and elaborate structural compounds through photosynthesis.

Due to their ability to selectively absorb and concentrate inorganic substances from the sea, the mineral content of seaweed is higher than that of terrestrial plants. Algae have a high content of Mg, Ca, P, K and Na (macronutrients) and, in addition, they have I, Fe, Cu, Cd, Ni, Hg and Zn. Seaweed extracts can be used as nutritional supplements or fertilizers in agriculture and horticulture, and as biofertilizers in liquid or granular (powder) extract for foliar or soil application (Hernández-Herrera *et al.*, 2013).

Due to economic and cultural importance, the cultivation of the vine (*Vitis vinifera* L.) is one of the oldest in the world. Due to diversified consumption, grapes are characterized by a high economic value. As an example, 31% of world production is destined for the fresh market, 67% for making wine and other alcoholic beverages, and the remaining 2% is consumed as dried fruit (OIV, 2012; FAO, 2013).

In Mexico, vine production is concentrated in the states of Baja California, Sonora, Aguascalientes, Coahuila and Zacatecas, with 98.2% of annual production (El Economista, 2013), and Sonora has the highest production with 7% (Hidroponía, 2017). Fresh consumption is reported at 63%, 24.4% for the making of wines and juices, and 12.6% is dehydrated (SAGARPA, 2017).

Among the wine varieties we have cv. Sauvignon Blanc from Bordeaux, France, that is considered, after the Chardonnay, the finest variety among the white varieties of French origin. It is a cold-resistant plant of early sprouting. The cluster is medium sized and cylindrical shaped; berries are medium sized, round and golden yellow in color, producing elegant, dry and acid wines; bright yellow with green hues (BBvinos, 2017). This cultivar is often deficient in Mg, the need of this mineral along with P and N are high during the first part of the vegetative cycle, which favors a particular sensitivity to iron chlorosis (Fernandez-Cano and Togoies, 2011).

The most characteristic effect of Fe deficiency is the inability of young leaves to synthesize chlorophyll (Briat *et al.*, 2015). Chlorosis in plants due to Fe deficiency is not only an indication of the effect of

menudo deficiencias de Mg, las necesidades de dicho mineral junto con P y N son altas durante la primera parte del ciclo vegetativo, que favorece una sensibilidad particular a la clorosis férrica (Fernández-Cano y Togores, 2011).

El efecto más característico de la deficiencia de Fe es la incapacidad de las hojas jóvenes para sintetizar clorofila (Briat *et al.*, 2015). La clorosis en plantas por la deficiencia de Fe, no es sólo una expresión del efecto del Fe en el desarrollo y la función de los cloroplastos para la biosíntesis de clorofila, ya que también la concentración de carbohidratos menor en las plantas deficientes de Fe da como resultado actividad fotosintética baja (Kyrkby y Römheld, 2008).

Las características del suelo influyen en el desarrollo de la vid y en la composición de la baya. Contenidos altos de arcilla y materia orgánica afectan la disponibilidad del Fe y en los suelos arcillosos hay una tendencia a retener más Fe. El contenido alto de Ca en el suelo insolubiliza el Fe y dificulta su absorción por las plantas, lo cual impacta el rendimiento y la calidad de las cosechas (Arizmendi-Galicia *et al.*, 2011).

La deficiencia de Fe en los cultivos se manifiesta como un amarillamiento intervenal de las hojas jóvenes conocido como “clorosis férrica”. Una de las principales causas de esta deficiencia es la alcalinidad de los suelos. El pH del suelo determina la disponibilidad de Fe y de otros micro nutrientes al afectar su solubilidad. La deficiencia de Fe afecta la morfología y fisiología de las hojas (Bertamini y Nedunchezian, 2005) y es uno de los principales estreses abióticos que afectan a los cultivos de frutales en suelos calcáreos (Tagliavini y Rombolá, 2001). Cuando el estrés es severo, la actividad fotosintética disminuye en forma drástica (Larbi *et al.*, 2006). Debido a que el Fe interviene en la síntesis de clorofila, la carencia del elemento modifica la concentración de clorofila y por lo tanto la funcionalidad del aparato fotosintético. La deficiencia de clorofila afecta el cuajado del fruto, el diámetro de la baya (por el corrimiento de la flor) y problemas de maduración, lo cual limita la expresión vegetativa del vigor del viñedo, rendimiento y calidad de fruto (González y Martin, 2006).

La aplicación foliar de biofertilizantes con contenido mayor de Fe puede incrementar la presencia del elemento en las hojas de las plantas de vid y reducir el efecto de la clorosis. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de un fertilizante foliar orgánico

Fe on the development and function of chloroplasts for chlorophyll biosynthesis, since also the lower carbohydrate concentration in Fe deficient plants results in low photosynthetic activity (Kyrkby and Römheld, 2008).

The characteristics of the soil influence the development of the vine and the composition of the berry. High clay and organic matter contents affect the availability of Fe and in clay soils there is a tendency to retain more Fe. The high content of Ca in the soil insolubilizes Fe and makes it difficult for plants to absorb it, which impacts crop yield and quality (Arizmendi-Galicia *et al.*, 2011).

Fe deficiency in crops manifests itself as an interveinal yellowing of young leaves known as “iron chlorosis”. One of the main causes of this deficiency is the alkalinity of the soil. The pH of the soil determines the availability of Fe and other micronutrients by affecting its solubility. Fe deficiency affects leaf morphology and physiology (Bertamini and Nedunchezian, 2005), and is one of the main abiotic stresses affecting fruit crops in limy soils (Tagliavini and Rombolá, 2001). When stress is severe, photosynthetic activity decreases dramatically (Larbi *et al.*, 2006). Because Fe intervenes in the synthesis of chlorophyll, the lack of Fe modifies chlorophyll concentration and, therefore, the functionality of the photosynthetic apparatus. Chlorophyll deficiency affects fruit set, berry diameter (because of millerandage, a weather-related condition which causes uneven berries and infertile flowers) and ripening problems, which limits the vegetative expression of the vineyard in vigour, yield and fruit quality (Gonzalez and Martin, 2006).

Foliar application of biofertilizers with higher Fe content can increase the presence of such element in vine plant leaves and reduce the effect of chlorosis. The objective of the study was to evaluate the effect of an organic foliar fertilizer made with seaweed extracts added with Fe and Mn, on the Fe content in leaves, as well as Fe relationship with chlorophyll content, photosynthesis rate and fruit yield of cv. Sauvignon Blanc.

MATERIALS AND METHODS

Study location

The study was carried out in the San Lorenzo, Parras de la Fuente winery, Coahuila, Mexico, 25° 26' N, 102° 10' W and

elaborado con extractos de algas marinas adicionado con Fe y Mn, en el contenido de Fe en las hojas, así como su relación con contenido de clorofila, tasa de fotosíntesis y rendimiento de frutos del cv Sauvignon Blanc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del estudio

El estudio se realizó en la vinícola San Lorenzo, Parras de la Fuente, Coahuila, México, 25° 26' N, 102° 10' O y a 1500 m de altitud. El experimento se estableció en el viñedo con el cv Sauvignon Blanc, clon 316, porta injerto Gravesac, de 13 años de edad, durante el ciclo de producción de abril a septiembre de 2018. El viñedo está en un marco de plantación de 1.0 m entre plantas y 2.5 m entre hileras, con una densidad de 4000 plantas por hectárea.

Manejo agronómico del viñedo

El lote del estudio recibió el mismo manejo agronómico aplicado al viñedo por la Vinícola San Lorenzo, respecto a riegos, fertilización, control fitosanitario y podas. Las aplicaciones fueron 80 u de N ha⁻¹ de N y 20 u de P ha⁻¹. El agua se suministró con un sistema de riego por goteo (15 h por semana) con emisores espaciados a 0.60 m y gasto de 2.3 L h⁻¹ lo cual equivale a un volumen promedio por planta de 8.21 L d⁻¹.

Tratamientos aplicados y diseño experimental

La fertilización foliar se realizó con el biofertilizante Ferrum® (Palau Bioquim, SA de CV), elaborado con algas marinas, que contienen reguladores de crecimiento naturales (auxinas 0.0510%, citocininas 0.0499% y giberelinas 0.0207%), adicionado con Fe (6%) y Mn (3%). Tres aplicaciones se dieron vía foliar (con una mochila de aspersión de aplicación manual) en dosis de 0.5%, el 13 y 28 de abril y el 11 de mayo de 2018, de acuerdo con la siguiente distribución de tratamientos: sin aplicación del biofertilizante (T1), aplicación solo en la primera fecha (T2), las dos primeras aplicaciones (T3) y tres aplicaciones (T4). Los tratamientos se repitieron cuatro veces en un diseño completamente al azar; la unidad experimental la formaron cuatro plantas con una separación de tres plantas entre parcelas. Para la comparación de medias de tratamientos se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El análisis de varianza y la prueba de medias se realizó con R-Studio versión 3.0 (paquete agricolae).

1500 m altitud. The experiment was established in a vineyard cv. Sauvignon Blanc, clone 316, Gravesac rootstock, 13 years old, during April to September 2018 production cycle. The vineyard was established in a planting frame of 1.0 m between plants and 2.5 m between rows, with a density of 4000 plants per hectare.

Agronomic management of the vineyard

The study lot received the same agronomic management applied to the vineyard by Vinícola San Lorenzo in regard to irrigation, fertilization, phytosanitary control and pruning. The applications were 80 u of N ha⁻¹ and 20 u of P ha⁻¹. Water was supplied with a drip irrigation system (15 h per week) with emitters spaced at 0.60 m and a flow rate of 2.3 L h⁻¹, which is equivalent to an average volume per plant of 8.21 L d⁻¹.

Applied treatments and experimental design

The foliar fertilization was carried out with the Ferrum® biofertilizer (Palau Bioquim, SA de CV), elaborated with marine algae, which contains natural growth regulators (auxins 0.0510%, cytokinins 0.0499% and gibberellins 0.0207%), added with Fe (6%) and Mn (3%). Three applications were given via foliar (with a manual spraying backpack) in doses of 0.5%, on April 13th and 28th, and on May 11th, 2018, according to the following distribution of treatments: without biofertilizer application (T1), only the first application date (T2), two application dates (T3) and three application dates (T4). Treatments were repeated four times in a completely randomized design; the study plots were formed by four plants with a separation of three plants between the plots. Tukey test ($p \leq 0.05$) was used to compare treatment means. The analysis of variance and mean test was performed with R-Studio, version 3.0 (agricolae package).

Iron content, chlorophyll and foliar photosynthesis rate

The Fe content in the leaves was determined with the ICP-OES plasma spectrometry method (ppm) and for the statistical evaluation, the experimental units were the extract obtained from five leaves of each of the four plants in the study plots (20 leaves per replicate). Leaf samples were taken one week before fruit harvest (August 10).

The chlorophyll content and rate of foliar photosynthesis among the plants of the four treatments (without biofertilizer and with 1, 2 or 3 applications), were evaluated biweekly between 12:00 and 14:00 h, from April to September 2018. For chlorophyll content, the experimental unit was the average

Contenido de hierro, clorofila y tasa de fotosíntesis foliar

El contenido de Fe en las hojas se determinó con el método de espectrometría de plasma ICP-OES (ppm) y para la evaluación estadística, las unidades experimentales fueron el extracto obtenido de cinco hojas de cada una de las cuatro plantas de las parcelas de estudio (20 hojas por repetición). Las muestras foliares se tomaron una semana antes de la cosecha de los frutos (10 agosto).

El contenido de clorofila y la tasa de fotosíntesis foliar entre las plantas de los cuatro tratamientos (sin biofertilizante y con 1, 2 o 3 aplicaciones), se evaluaron quincenalmente entre las 12:00 y las 14:00 h, de abril a septiembre de 2018. Para el contenido de clorofila, la unidad experimental fue el promedio de tres mediciones por hoja, de cuatro hojas de cada parcela de estudio (12 mediciones por repetición de cada tratamiento). El contenido de clorofila de las hojas se obtuvo con un medidor portátil (SPAD 502 Plus, Konica Minolta Optics, Inc., Japón). Para la tasa de fotosíntesis, la unidad experimental fue el promedio de tres hojas por parcela de estudio. La tasa fotosintética foliar se obtuvo con un medidor portátil de fotosíntesis LI-6800 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). Las hojas para la muestra se seleccionaron de la región media del dosel de las plantas.

Rendimiento de fruto

El efecto de la aplicación del biofertilizante en el rendimiento de fruto se evaluó en cada unidad experimental (repetición) como el promedio del rendimiento de frutos de las cuatro plantas de cada parcela de estudio de los cuatro tratamientos. La cosecha se realizó el 17 de agosto de 2018.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de hierro en las hojas

En los tres tratamientos con aplicación el biofertilizante, el contenido de Fe en las hojas fue mayor que en las hojas del testigo; además, con cada aplicación adicional el contenido de Fe fue mayor (Cuadro 1; $p \leq 0.05$). El efecto del incremento en el contenido de Fe destacó visualmente por un color verde de intensidad mayor en las hojas respecto a las plantas del testigo, porque la síntesis de clorofila en las hojas requiere presencia y contenido adecuado de Fe (Shehata *et al.*, 2011). El color de las hojas permite detectar la clorosis férrica; Razeto y Palacios (2005) observaron una correlación alta entre el color de las hojas de un cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.) y la

of three measurements per leaf, of four leaves from each study plot (12 measurements per repetition of each treatment). The chlorophyll content of the leaves was obtained with a portable meter (SPAD 502 Plus, Konica Minolta Optics, Inc., Japan). For photosynthesis rate, the experimental unit was the average of three leaves per study plot. The photosynthetic leaf rate was obtained with a portable photosynthesis meter LI-6800 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). The leaves sampled were selected from the mid-foliage region of the plants.

Fruit yield

The effect of biofertilizer application on the fruit yield was evaluated on experimental units (repetition) as the average of fruit yield belonging to the four plants of each study plot within the four treatments. The harvest was carried out on August 17, 2018.

RESULTS AND DISCUSSION

Iron content in the leaves

Fe content in the leaves was higher than in the control leaves in the three treatments with biofertilizer application; also, with each additional application, Fe content was higher (Table 1; $p \leq 0.05$). The effect of the increase in Fe content was noticeable by a green color of greater intensity in the leaves respect to control plants, because synthesis of chlorophyll in leaves requires presence and adequate Fe content (Shehata *et al.*, 2011). Leaf color allows detecting iron chlorosis; Razeto and Palacios (2005) observed a high correlation in color of leaves of avocado crop (*Persea americana* Mill.) with the concentration of chlorophyll; low concentration of chlorophyll is a good indicator of iron chlorosis. The application of iron chelates to a limy soil increased the amount of active Fe on the leaves of 'Concordia' (*Vitis labruscona* Bailey) vine plants in proportion to the application doses, which affected the chlorophyll content, the CO₂ assimilation rate, and stomata conductance (Smith and Cheng, 2006). The use of an organic fertilizer based on bovine blood meal (BB, 0.125% Fe) applied to an alkaline limestone soil had the same effect as the application of iron chelates on increasing the chlorophyll content (SPAD units) of the vine leaves of cv. Sangiovese, cv. Cabernet Sauvignon and cv. Ruggeri (Tessarín *et al.*, 2013).

concentración de clorofila; la concentración baja de clorofila es un buen indicador de la clorosis férrica. La aplicación de quelatos de Fe a un suelo calcáreo aumentó la cantidad de Fe activo de las hojas de plantas de vid ‘Concordia’ (*Vitis labruscona* Bailey) en proporción con las dosis de aplicación, lo cual incidió en el contenido de clorofila, la tasa de asimilación de CO₂ y la conductancia estomática (Smith y Cheng, 2006). El uso de un fertilizante orgánico con base en harina de sangre de bovino (BB, 0.125% Fe), aplicado a un suelo calcáreo alcalino, tuvo el mismo efecto que la aplicación de quelatos de Fe en el incremento del contenido de clorofila (unidades SPAD) de las hojas de planta de vid de los cultivares Sangiovese, Cabernet Sauvignon y Ruggeri (Tessarín *et al.*, 2013)

Contenido relativo de clorofila en las hojas

Dos aplicaciones del biofertilizante aumentaron el contenido relativo de clorofila (unidades SPAD) respecto al de las hojas de las plantas testigo (sin biofertilizante) (Figura 1; $p \leq 0.05$), pero una sola

Cuadro 1. Contenido de hierro en las hojas de vid del cv. Sauvignon Blanc, en los tratamientos con aplicación del biofertilizante de extracto de Alga.

Table 1. Iron content in vine leaves of cv. Sauvignon Blanc, in Algae extract biofertilizer application treatments.

Tratamientos	Contenido de Fe (ppm)
Tres aplicaciones	416.75 a
Dos aplicaciones	297.00 b
Una aplicación	213.25 c
Sin aplicaciones (testigo)	118.00 d

Medias con letra diferente indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$).

Relative content of chlorophyll in leaves

Two applications of the biofertilizer increased the relative chlorophyll content (SPAD units) respect to the leaves of the control plants (without biofertilizer) (Figure 1; $p \leq 0.05$), but only one application did not

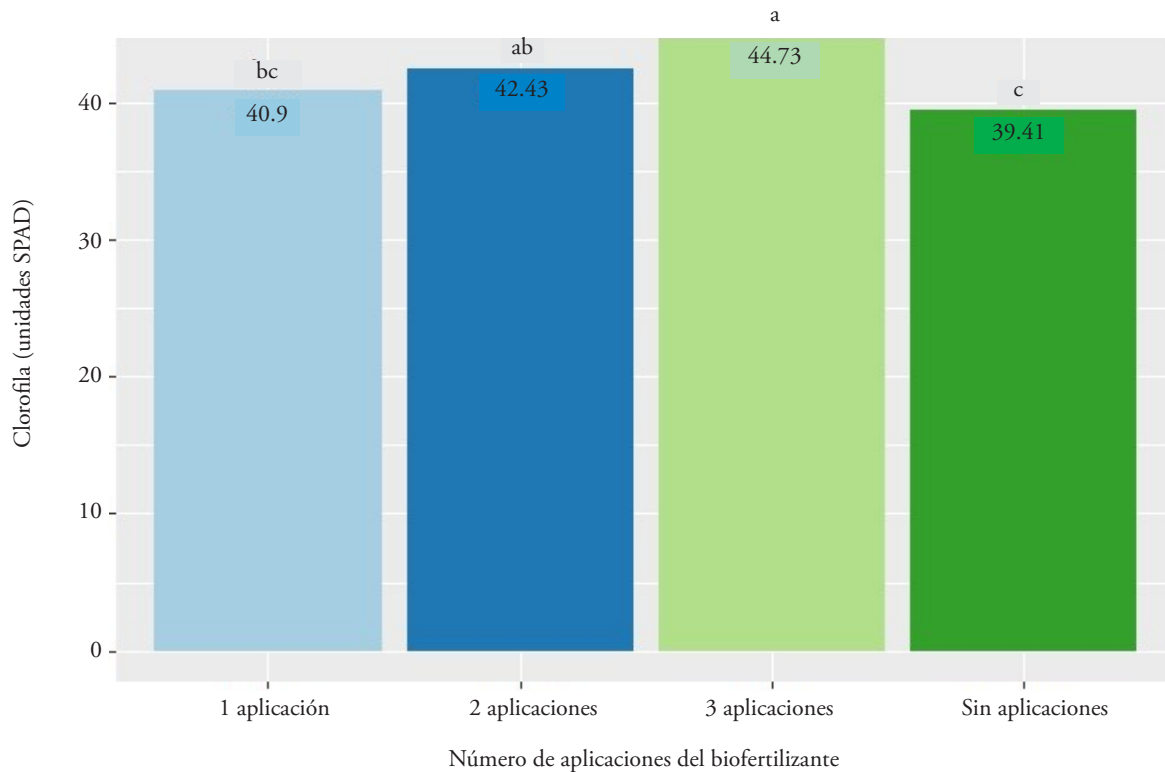


Figura 1. Contenido relativo de clorofila en las hojas (unidades SPAD) en vid del cv Sauvignon Blanc, en función del número de aplicaciones del biofertilizante foliar.

Figure 1. Relative content of chlorophyll in vine leaves (SPAD units) of cv. Sauvignon Blanc, according to foliar biofertilizer applications.

aplicación no afectó el contenido relativo de clorofila en las hojas (Figura 1). Brunetto *et al.* (2012) mostraron una buena correlación entre la concentración de clorofila en unidades SPAD con las mediciones en laboratorio.

Según Díaz *et al.* (2017), el contenido relativo de clorofila (unidades SPAD) de las hojas de un cultivo de soya (*Glycine max*, ‘Vernal’) aumentó con dos aplicaciones foliares al 1.5% de FeSO₄. En un cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.), el contenido de clorofila en las hojas tuvo un aumento proporcional con el incremento de la aplicación foliar de diferentes compuestos de Fe (Ghafari y Razmjoo, 2013). La aplicación foliar de Fe, Zn, Mn y Br en concentraciones de 50 y 100 mg L⁻¹ a plantas de vid (cv Bez El Naka) incrementó el contenido total de clorofila en las hojas (Abdel-Salam, 2016).

Tasa de fotosíntesis foliar

Tres aplicaciones del biofertilizante se requirieron para aumentar la tasa de fotosíntesis foliar (Cuadro 2; p≤0.05), y esto correspondió con el contenido relativo mayor de clorofila en las hojas (Figura 1). Enciso y Gómez (2004) mostraron una relación directa entre el contenido de clorofila y la tasa de fotosíntesis foliar. En un cultivo de fresa (*Fragaria moschata*), el incremento del contenido de clorofila correspondió con una tasa mayor de fotosíntesis foliar (Spinelli *et al.*, 2010).

Lebon *et al.* (2005) observaron una correlación positiva entre la tasa de fotosíntesis y la concentración de clorofila en plantas de vid de los cv. ‘Gwwurztraminar’ y ‘Pinot noir’. En plantas de vid (cv. Reisling), el déficit de agua redujo el contenido de clorofila y afectó la tasa de fotosíntesis neta (Bertamini *et al.*, 2006). Además, la aplicación de 250 mM de cloruro de sodio al suelo redujo el contenido de clorofila a y b, y disminuyó la tasa de fotosíntesis de plantas de vid de los cv. Soltanin y Fakhri (Bybordi, 2012).

Rendimiento de frutos

El rendimiento promedio de frutos aumentó con dos y tres aplicaciones del biofertilizante, comparado con el testigo (sin aplicación) y solo una aplicación (Cuadro 3; p≤0.05), lo cual se relacionó con el incremento de la tasa promedio de fotosíntesis foliar (Cuadro 2) y el contenido relativo de clorofila (Figura

affect the relative chlorophyll content of the leaves (Figure 1). Brunetto *et al.* (2012) showed a good correlation between chlorophyll concentration in SPAD units and laboratory measurements.

According to Díaz *et al.* (2017), the relative chlorophyll content (SPAD units) of the leaves of a soybean crop (*Glycine max*, ‘Vernal’) increased with two foliar applications at 1.5% FeSO₄. In wheat crop (*Triticum aestivum* L.), chlorophyll content of leaves had a proportional increase with the increase of foliar application of iron compounds (Ghafari and Razmjoo, 2013). Foliar application of Fe, Zn, Mn and Br in concentrations of 50 and 100 mg L⁻¹ to vine plants (cv Bez El Naka) increased total chlorophyll content in leaves (Abdel-Salam, 2016).

Foliar photosynthesis rate

Three applications of the biofertilizer were required to increase the rate of foliar photosynthesis (Table 2; p≤0.05), and this corresponded to the higher relative content of chlorophyll in the leaves (Figure 1). Enciso and Gomez (2004) showed a direct relationship between chlorophyll content and rate of foliar photosynthesis. In a strawberry crop (*Fragaria moschata*), the increase in chlorophyll content corresponded to a higher rate of foliar photosynthesis (Spinelli *et al.*, 2010).

Lebon *et al.* (2005) observed a positive correlation between the photosynthesis rate and the chlorophyll concentration in vine plants of cv. ‘Gwwurztraminar’ and cv. ‘Pinot noir’. In vine plants (cv. Reisling), water deficit reduced chlorophyll content and affected

Cuadro 2. Tasa promedio de fotosíntesis foliar en vid del cv Sauvignon Blanc con diferentes aplicaciones del biofertilizante foliar.

Table 2. Average rate of leaf photosynthesis in vines cv. Sauvignon Blanc with different applications of foliar biofertilizer.

Tratamiento	Fotosíntesis (mmol m ⁻² s ⁻¹)
Tres aplicaciones	12.85 a
Una aplicación	10.60 b
Dos aplicaciones	10.47 b
Sin aplicaciones (testigo)	10.23 b

Medias con letra diferente indican diferencia estadística (Tukey; p≤0.05). ♦ Means with different letter indicate statistical difference (Tukey; p≤0.05).

Cuadro 3. Rendimiento promedio de frutos por planta en vid del cv Sauvignon Blanc con diferentes aplicaciones del biofertilizante.

Table 3. Average fruit yield per plant of cv. Sauvignon Blanc vines with different biofertilizer application.

Tratamiento	(kg por planta)
Tres aplicaciones	2.478 a
Dos aplicaciones	2.445 a
Una aplicación	1.712 b
Sin aplicaciones (testigo)	1.662 b

Medias con letra diferente indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$).

1). El incremento en el rendimiento de frutos probablemente se debió a que el contenido del extracto de algas marinas enriquecido con los micronutrientes Fe y Mn mejoró el cuajado y crecimiento de los frutos. Además, el contenido mayor de clorofila de las hojas aumentó la tasa de asimilación foliar (Lebon *et al.*, 2005), y en consecuencia, el rendimiento de fruto (Sabir *et al.*, 2014).

La aplicación foliar de ácidos húmicos a plantas de uva de mesa (cv. Italia) aumentó el contenido de clorofila de las hojas, lo cual dio como resultado uvas de tamaño mayor con más rendimiento (Ferrera and Brunetti, 2008). Aplicaciones foliares de quitosano, ácido salicílico y fúlvico a plantas de vid (cv Thompson) incrementaron el contenido de clorofila total de las hojas y el rendimiento de frutos (El-Kenawy, 2017).

La aplicación al suelo de ácidos húmicos ($2.5 \text{ g L}^{-1} \text{ ha}^{-1}$) aumentó el contenido de clorofila (unidades SPAD), el peso de racimos y rendimiento por planta de un viñedo del cv 'Askari' (Mohamadineia, *et al.*, 2015). De acuerdo con González *et al.* (2019), el efecto combinado de la deficiencia de Fe y el estrés hídrico de viñedos en condiciones de temporal reduce el rendimiento de fruto. La aplicación de 5 Mg ha^{-1} de composta (estiércol de bovino y paja de trigo) a un suelo arcilloso, calcáreo y alcalino, aumentó el contenido de clorofila de las hojas (unidades SPAD), el peso de frutos y el rendimiento total de plantas de vid del cv. Merlot (Ponchia *et al.*, 2012).

net photosynthesis rate (Bertamini *et al.*, 2006). In addition, the application of 250 mM of sodium chloride to the soil reduced a and b chlorophyll contents, and decreased the photosynthesis rate in vine plants of cv. Soltanin and cv. Fakhri (Bybord, 2012).

Fruit yield

The average fruit yield increased with two and three applications of the biofertilizer, compared to the control (without application), or only one application (Table 3; $p \leq 0.05$), which was related to the increase in the average rate of foliar photosynthesis (Table 2) and the relative chlorophyll content (Figure 1). The increase in fruit yield was probably due to the fact that the content of seaweed extract enriched with Fe and Mn micronutrients improved set and growth of fruits. In addition, higher chlorophyll content of the leaves increased the rate of foliar assimilation (Lebon *et al.*, 2005), and consequent fruit yield (Sabir *et al.*, 2014).

Foliar application of humic acids to meal grape plants (cv. Italia) increased chlorophyll content in leaves, resulting in larger grapes with higher yields (Ferrera and Brunetti, 2008). Foliar applications of chitosan, salicylic and fulvic acid to vine plants (cv. Thompson) increased total chlorophyll content of leaves and fruit yield (El-Kenawy, 2017).

The application of humic acids on soil ($2.5 \text{ g L}^{-1} \text{ ha}^{-1}$) increased the chlorophyll content (SPAD units), cluster weight and yield per plant in a vineyard of cv. 'Askari' (Mohamadineia, *et al.*, 2015). According to González *et al.* (2019), the combined effect of Fe deficiency and water stress in vineyards under rainfall conditions reduces fruit yield. The application of 5 Mg ha^{-1} of compost (bovine manure and wheat straw) to a clayey, limy and alkaline soil, increased the chlorophyll content of leaves (SPAD units), fruit weight and total yield of vine plants cv. Merlot (Ponchia *et al.*, 2012).

CONCLUSIONS

Seaweed extract biofertilizer enriched with iron and manganese increased the iron content in

CONCLUSIONES

El biofertilizante de extracto de algas marinas enriquecido con hierro y manganeso incrementó el contenido de hierro en las hojas. Esto dio como resultado un contenido mayor significativo de clorofila, tasa mayor de fotosíntesis foliar y rendimiento mayor de frutos de vid del cultivar (cv.) Sauvignon Blanc en Coahuila, México.

vine leaves. This resulted in a significant increase in chlorophyll content, a higher rate of leaf photosynthesis and higher yield of vine fruits of the Sauvignon Blanc cultivar (cv. Sauvignon Blanc) in Coahuila, Mexico.

—End of the English version—



LITERATURA CITADA

- Abdel-Salam, M. M. 2016. Effect of foliar application of salicylic acid and micronutrients on the berries quality of “Bez El Naka” local grape cultivar. *Middle East J. Appl. Sci.* 6: 178-188.
- Arizmendi-Galicia, N., P. Rivera-Ortiz, F. De la Cruz-Salazar, B. I. Castro-Meza, y F. De la Garza-Requena. 2011. Lixiviación de hierro quelatado en suelos calcáreos. *Terra Latinoam.* 29: 231-237.
- BBvinos. 2017. Importaciones BB Vino, Catalogo de Uvas. http://www.bbvino.com.mx/wp-content/uploads/Pdf/Cat_Uvas.pdf (Consulta: junio 2018).
- Bertamini, M., and N. Nedunchezian. 2005. Grapevine growth and physiological responses to iron deficiency. *J. Plant Nutr.* 28: 737-749.
- Bertamini, M., L. Zukin, K. Muthuchelim, and N. Nedunchezian. 2006. Effect of water deficit on photosynthetic and other physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Reisling) plants. *Photosynthetica* 44: 151-154.
- Briat, J.F., C. Dubos, and F. Gaymard. 2015. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. 2015. *Trends Plant Sci.* 20: 33-40.
- Brunetto, G., G. Trentin, C. C. Carreta, E. Giroto, F. Lorenzini, A. Miotto, G. R. Zaferi Moser, and G. Wellington de Melo. 2012. Use of the SPAD-502 in estimating Nitrogen content in leaves and grape yield in grapevines in soils with different texture. *Am. J. Plant Sci.* 3: 1546-1561.
- Bybordí, A. 2012. Study effect of salinity on some physiological and morphologic properties of two grape cultivars. *Life Sci.* 9: 1092-1101.
- Díaz, F. A., M. Espinosa R., y F. E. Ortiz C. 2017. Corrección de la clorosis férrica con quelato EDDHA en cultivos sembrados en suelo alcalino y calcáreo. *Terra Latinoam.* 36: 23-30.
- Domínguez, H. 2013. Algae as a Source of Biologically Active Ingredients for the Formulation of Functional Foods and Nutraceuticals. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Ed. Woodhead Publishing Series in Food, Technology and Nutrition. pp: 1-19.
- El Economista. 2013. Producción de vid, México. <<https://www.economista.com.mx/columnas/agro-negocios-produccion-vid-alternativa-rentable-productor>>. (Consulta: septiembre 2018).
- El-Kenawy, M. E. 2017. Effect of chitosan, salicylic acid and fulvic acid on vegetative growth, yield and fruit quality of Thompson seedless grapevines. *Egyptian J. Hortic.* 44: 45-49.
- Enciso, B. E., y C. Gómez. 2004. Comparación de las respuestas de cuatro cultivares de mora (*Rubus* sp.) a las variaciones del factor luz. *Agron. Colomb.* 22: 46-52.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013. FAO: Grape. Post-harvest operations. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendum_-_Grape.pdf. (Consulta: junio 2019)
- Fernández-Cano, L. H., y J. H. Tógores. 2011. Tratado de Viticultura. 4a ed. rev. Mundi-Prensa, Madrid, España. 2096 p.
- Ferrera, G., and G. Brunetti. 2008. Influence of foliar application of humic acids on yield and fruit quality of table grape cv. Italia. *J. Inter. Scienc. Vigne et Vin* 42: 79-87.
- Ghafari, H., and J. Razmjoo. 2013. Effect of foliar application of nano-iron oxidase, iron chelate and iron sulfate rates on yield and quality of wheat. *Int. J. Agron. Plant Prod.* 4: 2997-3003.
- González, M. R., G. Hailemichael, C. Grima, A. Catalina, and P. Martín. 2019. Combined effects of water status and iron deficiency chlorosis on grape composition in non-irrigated vineyards. *Scientia Agric.* 76: 473-480.
- González M., R., y P. Martín. 2006. Prevención y tratamiento de la clorosis férrica del viñedo. *Vida Rural* 226:30-33.
- Hernández-Herrera, R. M., F. Santacruz-Ruvalcaba, M. A. Ruiz-López, J. Norrie, y G. Hernández-Carmona. 2013. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Appl. Phycol.* 26: 619-628.
- Hidroponía. 2017. Producción de uva, un impulso a la economía mexicana. <http://hidroponia.mx/produccion-de-uva-un-impulso-a-la-economia-mexicana>. (Consulta: noviembre 2018).
- Kyrkby, E., y V. Römhöld. 2008. Micronutrientes en la fisiología de las plantas: Funciones, absorción y movilidad. *Informaciones Agron.* 68: 1-6.
- Larbi, A., A. Abadía, J. Abadía, y F. Morales. 2006. Down regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynthesis Res.* 89: 113-126.
- Lebon, G., O. Brun, C. Magné, and C. Clément. 2005. Photosynthesis of the grapevine (*Vitis vinifera*) inflorescence. *Tree Physiol.* 25: 633-639.
- Mohamadineia, G., M. H. Farahi, and M. Dasteyaran. 2015. Foliar and soil drench application of humic acid on yield

- and berry properties of 'Askari' grapevine. *Agric. Comm.* 3: 21-27.
- OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino). 2012. Informe estadístico 2012 de la OIV sobre la vitivinicultura mundial. <http://www.oiv.int/oiv/info/esizmiroivreport> (Consulta: junio 2019).
- Ponchia, G., A. Bozzolo, F. Tateo, and G. Concheri. 2012. Compost application in the vineyard and its influence on soil characteristics, vegetative and productive behavior of grapevine. *Acta Hort.* 938: 437-444.
- Razeto, B., y J. Palacios. 2005. Efecto de la clorosis férrica en el tamaño y la concentración de aceite en el fruto del palto (*Persa americana* Mill.). *Agric. Téc.* 65: 105-111.
- Sabir, A., K. Yazar, F. Sabir, Z. Kara, M. A. Yazici, and N. Goksu. 2014. Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Scientia Hort.* 175: 1-8.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017. Planificación Agrícola Nacional 2017-2030: Uva Mexicana. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf> (Consulta: noviembre 2018).
- Shehata, S., M., S. Abdel-Azem H., A. El-Yazied A., and M. El-Gizawy A. 2011. Effect of foliar spraying with amino acids and seaweed extract on growth chemical constituents yield and its quality of celeriac plant. *Eur. J. Scient. Res.* 58: 257-265.
- Smith B. R., and L. Cheng. 2006. Fe-EDDH alleviates chlorosis in concord grapevines growing at high pH. *HortScience* 41: 1498-1501.
- Spinelli, F., G. Fiori, M. Nofereni, M. Sproctti, and G. Costa. 2010. A novel type of seaweed extract as a natural alternative to the use of iron chelates in strawberry production. *Scientia Hort.* 125: 263-269.
- Tagliavini, M., and A. D. Rombolá. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur. J. Agron.* 15: 71-92.
- Tessarín, P., E. Ingrosso, A. D. Rombola, A. C. Boliani, J. I. Covarrubias and F. Yunta. 2013. Improvements of grapevine iron nutrition by a bovine blood-derived compound. *Acta Hort.* 984: 335-338.