

Agrociencia

Volumen 54, Número 8

16 de noviembre - 31 de diciembre, 2020



Dr. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ
DIRECTOR DE LA REVISTA AGROCIENCIA
2009-2020

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 8, 16 de noviembre - 31 de diciembre, 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, **23 de diciembre 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/agrocien/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: Sergio Segundo González Muñoz

Director de la Revista Agrociencia (2009-2020)



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 54

16 de noviembre - 31 de diciembre, 2020

Número 8

Agua-Suelo-Clima ⇌ Water-Soil-Climate

ADAPTATION OF *Caragana intermedia* TO ENVIRONMENTAL CHANGES WHILE GROWING: PHOTOSYNTHESIS AND WATER POTENTIAL ⇌ ADAPTACIÓN DE *Caragana intermedia* A LOS CAMBIOS AMBIENTALES DURANTE EL CRECIMIENTO: FOTOSÍNTESIS Y POTENCIAL HÍDRICO
Yang **Kaiyue**, Jia **Zhiqing**, Li **Qingxue**, Feng **Lili**, He **Lingxianzi**, Dai **Jie**, Chen **Juan** 977

METALES PESADOS, ARSÉNICO Y BORO EN AGUA DE RIEGO SUBTERRÁNEA EN ZACOALCO DE TORRES Y AUTLÁN DE NAVARRO, JALISCO ⇌ HEAVY METALS, ARSENIC AND BORON IN UNDERGROUND IRRIGATION WATER OF ZACOALCO DE TORRES AND AUTLÁN DE NAVARRO, JALISCO
Oscar Raúl **Mancilla-Villa**, Blanca Noemy **Anzaldo-Cortes**, Rubén Darío **Guevara-Gutiérrez**, Omar **Hernández-Vargas**, Héctor Manuel **Ortega-Escobar**, Héctor **Flores-Magdaleno**, Álvaro **Can-Chulim**, José Luis **Olguín-Lopez**, Isabel **Mendoza-Saldivar**, Edgar Iván **Sánchez-Bernal**, Elia **Cruz-Crespo**, Oscar Arturo **Barreto-García** 995

Biotecnología ⇌ Biotechnology

SÍNTESIS Y EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE FRIJOL ⇌ SYNTHESIS AND EFFECT OF HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES ON THE GERMINATION AND GROWTH OF COMMON BEAN
Nefertiti Laura **de la Vega-García**, Cecilia Beatriz **Peña-Valdivia**, Ma. del Carmen A. **González-Chávez**, Daniel **Padilla-Chacón**, Rogelio **Carrillo-González** 1009

ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON NITRÓGENO A BASE DE UREA PARA USO AGRÍCOLA ⇌ PREPARATION OF UREA-BASED NITROGEN NANOPARTICLES FOR AGRICULTURAL USE
Miguel A. **Cruz-Hernández**, Elba **Ronquillo-de Jesus**, Abel **Nolasco-Quevedo**, María de J. **Perea-Flores**, Erwin **San Juan-Martínez**, Libia I. **Trejo-Téllez**, Miguel A. **Aguilar-Méndez** 1031

Ciencia de los Alimentos ⇌ Food Science

CONOCIMIENTO Y PRÁCTICA DE LA HERBOLARIA EN EL ESTADO DE MÉXICO, PAUTAS HACIA LA SUSTENTABILIDAD ⇌ KNOWLEDGE AND PRACTICE OF HERBALISM IN THE STATE OF MEXICO, GUIDELINES TOWARDS SUSTAINABILITY
Georgina **Gutiérrez-García**, Enrique **Espinosa-Ayala**, Pedro Abel **Hernández-García**, Thelma Beatriz **Pavón-Silva**, Ofelia **Márquez-Molina** 1043

Ciencia Pecuaria ⇌ Animal Science

OPTIMIZATION TECHNIQUE FOR GENOMIC DNA ISOLATION FROM BOVINE SPERM ⇌ OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE ESPERMATOZOIDES DE TORO
Martha **Vázquez-Aguirre**, Javier de Jesús **Valencia-Méndez**, Manuel **Barrientos-Morales**, Noé Orlando **Juárez-López**, Alejandro **Córdova-Izquierdo**, Juan Manuel **Pinos-Rodríguez**, María de Lourdes **Juárez-Mosqueda** 1059

Fitociencia ⇌ Crop Science

RENDIMIENTO Y CALIDAD INTRÍNSECA DE CRUZAS DE MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA EN AMBIENTES DE VALLES ALTOS DE MÉXICO ⇌ YIELD AND INTRINSIC QUALITY OF PROTEIN QUALITY MAIZE CROSSES AT ENVIRONMENTS OF HIGH VALLEYS OF MEXICO

Consuelo **López-López**, Alejandro **Espinosa-Calderón**, Margarita **Tadeo-Robledo**, Ma. Gricelda **Vázquez-Carrillo**, J. Jesús **García-Zavala**

1079

Socioeconomía ⇌ Socioeconomics

RESULTADOS DEL PROGRAMA PROAGRO PRODUCTIVO EN LAS REGIONES DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO ⇌ RESULTS OF THE PROGRAM PROAGRO PRODUCTIVO IN THE REGIONS OF THE STATE OF VERACRUZ, MEXICO

Mario Alejandro **Hernández-Chontal**, Felipe **Gallardo-López**, María Magdalena **Villarreal-Martínez**, Cesáreo **Landeros-Sánchez**, Gustavo **López-Romero**

1091

ADAPTATION OF *Caragana intermedia* TO ENVIRONMENTAL CHANGES WHILE GROWING: PHOTOSYNTHESIS AND WATER POTENTIAL

ADAPTACIÓN DE *Caragana intermedia* A LOS CAMBIOS AMBIENTALES DURANTE EL CRECIMIENTO: FOTOSÍNTESIS Y POTENCIAL HÍDRICO

Yang Kaiyue¹, Jia Zhiqing^{1,3*}, Li Qingxue³, Feng Lili¹, He Lingxianzi³, Dai Jie³, Chen Juan³

¹School of Mining and Geomatics, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China (yangkaiyue1628@163.com)²Institute of Desertification Studies, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091. ³Qinghai Gonghe Desert Ecosystem Research Station Gonghe 813005 (jiazhiq369@163.com).

ABSTRACT

Plant photosynthesis is one of the most important physiological processes for plant survival and growth. Studies on the photosynthesis characteristics of sand-fixing vegetation of different ages in alpine sandy land provide a scientific basis and theoretical support for vegetation restoration and forest management in the region. In this study, the photosynthesis and water potential of *Caragana intermedia* plantations 5-, 7-, 10-, 12-, 18- and 32-year-old were measured, and meteorological data was obtained simultaneously. Results showed that utilization efficiency of light energy first decreased and then increased as plants grew; while in the case of CO₂ utilization efficiency first increased and then decreased. The highest correlation coefficient between photosynthetic rate (Pn) and physiological or ecological factors were stomatal conductance (Gs) and CO₂, respectively. Water potential of *C. intermedia* decreased then increased on a daily basis; but in old-aged individuals was significantly lower than that of the young-aged, showing a negative correlation with photosynthetically active radiation (PAR). Plants water consumption and water absorption capacity increase to resist external environment, in a physiological adaptation response to the increment of light.

Key words: *Caragana intermedia*, photosynthesis, light response curve, CO₂ response curve, water potential, water use efficiency (WUE).

RESUMEN

La fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más importantes para la supervivencia y el crecimiento de las plantas. Los estudios existentes sobre las características fotosintéticas de vegetación fijadora de arena de diferentes edades en tierra arenosa alpina brindan una base científica y apoyo teórico para la restauración vegetal y el manejo forestal de la región. En este estudio se midieron la fotosíntesis y el potencial hídrico de plantaciones de *Caragana intermedia* de 5, 7, 10, 12, 18 y 32 años de edad, y de manera simultánea, se obtuvieron datos meteorológicos. Los resultados mostraron que el uso eficiente de la energía lumínica disminuyó primero y aumentó luego a medida que las plantas crecían, mientras que en el caso de la eficiencia en el uso de CO₂ aumentó primero y luego disminuyó. Los coeficientes de correlación mayores entre la tasa fotosintética (Pn) y los factores fisiológicos o ecológicos fueron conductancia estomática (Gs) y CO₂, respectivamente. El potencial hídrico de *C. intermedia* disminuyó y luego aumentó diariamente; aunque en individuos de edad mayor, fue significativamente más bajo que en los más jóvenes, y presentó una correlación negativa con la radiación fotosintéticamente activa (PAR). El consumo de agua de las plantas y su capacidad de absorción aumentan para resistir el ambiente externo, en una respuesta de adaptación fisiológica al aumento de luz.

Palabras clave: *Caragana intermedia*, fotosíntesis, curva de respuesta a la luz, curva de respuesta al CO₂, potencial hídrico, eficiencia en el uso de agua (WUE).

INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es un proceso por el cual las plantas absorben energía lumínica y convierten CO₂ y agua en compuestos orgánicos y oxígeno

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: March, 2019. Approved: March, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 977-994. 2020.

INTRODUCTION

Photosynthesis is a process in which plants absorb light energy and convert CO₂ and water into organic compounds and oxygen, and it is one of the most important physiological process for plant survival. The factors affecting photosynthesis are not only those determined by the own genes of plant species, but also those of improved varieties, and changes following growth stages, geographical locations, or environmental conditions such as light intensity, temperature, CO₂ concentration, and soil moisture content.

There is photosynthesis variation in *Abies firma* Sieb. et Zucc. (Kenzo *et al.*, 2017) and *Artemisia ordosica* (Zha *et al.*, 2017) in different seasons, and also in *Vitis vinifera* L. cv. Colombar (Van Zyl, 2017) in diverse conditions. There is variation even at individual leaves within the canopy of the same plant, different species of the same genus, or grown with distinct breeding methods (Ferraz *et al.*, 2016). The light response curve is the relationship between photon flux density and plant photosynthetic rate, and the ecological parameters of plant photosynthesis can be obtained by analyzing the light response curve. The concentration of CO₂ affects the photosynthesis rate and stomatal conductance, which in turn influences the water use efficiency of plants and increased CO₂ will promote photosynthetic rate and increase biomass production (Chen *et al.*, 2015).

Caragana intermedia is a perennial shrub with developed root system and root nodules which improves ecological functions such as soil and nitrogen fixation. Also, it seems adapted to severe drought and shows cold, wind erosion and sand burial resistance. Because of that, it is widely used in sand fixation and vegetation restoration in the arid regions of northwest China (Li *et al.*, 2014). Research on photosynthesis of *C. intermedia* is focused on comparing with other plants to select dominant species that are more adaptable for local conditions (Guo *et al.*, 2010).

The photosynthesis of *C. intermedia* in the alpine sandy land is still unclear as plants grow, and whether the difference of photosynthesis is affected by the harsh environmental conditions is not explained so far. Therefore, the objective of this study was to understand how the photosynthetic characteristics and water potential of *C. intermedia* change at

and is one of the physiological processes most important for the survival of plants. The factors that affect photosynthesis are not only those determined by the own genes of the plant species, but also those of improved varieties, and changes following growth stages, geographical locations, or environmental conditions such as light intensity, temperature, CO₂ concentration, and soil moisture content.

Existen variaciones de fotosíntesis en *Abies firma* Sieb. et Zucc. (Kenzo *et al.*, 2017) y *Artemisia ordosica* (Zha *et al.*, 2017) en temporadas diferentes, así como en *Vitis vinifera* L. cv. Colombar (Van Zyl, 2017) en condiciones diversas. Incluso existen variaciones en hojas individuales dentro de la copa de un mismo árbol, entre especies diferentes del mismo género, o manejadas con métodos diferentes de mejoramiento (Ferraz *et al.*, 2016). La curva de respuesta a la luz es la relación entre la densidad del flujo de fotones y la tasa fotosintética. Los parámetros ecológicos de la fotosíntesis en plantas se pueden obtener al analizar la curva de respuesta a la luz. La concentración de CO₂ afecta la tasa de fotosíntesis y la conductancia estomática, que a su vez influye en la eficiencia del uso de agua de plantas; un aumento del CO₂ aumentará la tasa fotosintética y aumentará la producción de biomasa (Chen *et al.*, 2015).

Caragana intermedia es un arbusto perenne con un sistema desarrollado de raíces y nódulos radicales, lo cual mejora funciones ecológicas como fijación del suelo y del nitrógeno. Además, parece haberse adaptado a sequías severas y presenta resistencia al frío, a la erosión por viento y ser cubierto por completo bajo arena. Por ello, se utiliza bastante en la fijación de arena y restauración de vegetación en las regiones áridas del noroeste de China (Li *et al.*, 2014). La investigación de la fotosíntesis de *C. intermedia* se enfoca en la comparación con otras plantas para elegir a las especies dominantes que sean más adaptables para las condiciones locales (Guo *et al.*, 2010).

La fotosíntesis de *C. intermedia* a lo largo del crecimiento de las plantas en tierras arenosas alpinas sigue siendo poco claro, y todavía no se ha explicado si la diferencia en fotosíntesis se debe a las condiciones ambientales adversas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue entender cómo cambian las características fotosintéticas y el potencial hídrico de *C. intermedia* en edades diferentes y cuáles factores influyen en esto. La hipótesis fue que las condiciones ambientales

different ages and what factors influence them. Under the hypothesis that environmental conditions can cause specific changes in photosynthesis or water use efficiency (WUE) as plant grows and matures.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study area is located in the Qinghai Gonghe Desert Ecosystem Research Station of the Gonghe Basin (36° 03'-36° 40' N; 99° 45'-100° 30' E), and it is a part of the Chinese Desert Ecosystem Research Network (CDERN) of the State Forestry Administration of P.R. China constructed by the Chinese Academy of Forestry and the Desertification Combating Station of Qinghai Province. The average elevation is 2871 m; average annual precipitation is 246 mm concentrated from May to September with an average annual temperature of 2.4 °C and average annual evaporation of 1717 mm. The mean annual number of windy days is 51 d and the mean annual number of sandstorms occurrence is 21 d. The mean annual wind speed is 2.7 m s⁻¹ and the maximum is 40 m s⁻¹. In the vegetation restoration area of the Gonghe Basin, the representative plots (30 × 30 m) were established in 5-, 7-, 10-, 12-, 18- and 32-year-old (A5, A7, A10, A12, A18 and A32) mono-specific plantations of *C. intermedia* as the sampling sites.

Photosynthetic measurements

Photosynthetic measurements were taken on the sunny days using the portable photosynthesis system (LI-6400, Li-COR Inc., Lincoln, NE, USA) in late June, July and August 2018. Each set of diurnal measurements was carried out at 2 h intervals from 08:00 to 16:00. Three complete and healthy green leaves growing on the third to fifth branch on top of canopy were selected from three shrubs in each plot to take the measurements. The variables were net photosynthetic rate (Pn), transpiration rate (Tr), intercellular CO₂ concentration (Ci), stomatal conductance (Gs), instantaneous water use efficiency (WUE_i = Pn/Tr) and stomatal limitation value (Ls = 1-Ci/Ca, Ca represents the concentration of air CO₂).

Each set of light and CO₂ response curve measurements were conducted between 09:00-11:30 on sunny days in late August 2018, in three complete and healthy green leaves from three shrubs in each plot. Intensities of photosynthetic effective radiation and CO₂ concentrations were set to 2000, 1600, 1200, 1000, 800, 600, 400, 300, 200, 150, 50, 20, 0 μmol m⁻² s⁻¹ and 400, 300, 200, 100, 50, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800 μmol s⁻¹, with a flow rate of 400 μmol s⁻¹ and 25 °C temperature.

pueden causar cambios específicos en la fotosíntesis o en la eficiencia en el uso del agua (WUE) a medida que la planta crece y madura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio se ubica en la Estación de Investigación de Ecosistemas Desérticos Qinghai Gonghe de la cuenca de Gonghe (36° 03'-36° 40' N; 99° 45'-100° 30' E) y es parte de la Red China de Investigación de Ecosistemas Desérticos (en inglés, CDERN) de la Administración Forestal Estatal de la República Popular China, construida por la Academia China Forestal y de Combate a la Desertificación de la provincia de Qinghai. La altitud promedio es 2871 m; la precipitación media anual es de 246 mm, concentrada entre mayo y septiembre, con una temperatura anual promedio de 2.4 °C y una evaporación media anual de 1717 mm. El promedio anual de días con viento es 51 d y la media anual de días con tormentas de arena es 21 d. La velocidad media del viento es de 2.7 m s⁻¹ y la máxima es de 40 m s⁻¹. En el área de restauración vegetal de la cuenca de Gonghe, las parcelas representativas (30 × 30 m) se establecieron como sitios de muestreo en plantaciones mono-específicas de *C. intermedia* de 5, 7, 10, 12, 18 y 32 años de edad (etiquetadas en este documento como A5, A7, A10, A12, A18 y A32).

Medidas fotosintéticas

Las medidas fotosintéticas se tomaron durante los días de sol, con un analizador portátil de fotosíntesis (LI-6400, Li-COR Inc., Lincoln, NE, EE.UU.) a finales de junio, julio y agosto de 2018. Cada conjunto de medidas diurnas se tomó en intervalos de 2 h de 08:00 a 16:00. Tres hojas verdes, sanas y completas se seleccionaron, de entre la tercera y quinta rama de la copa de tres arbustos de cada parcela, para tomar sus medidas. Las variables fueron tasa fotosintética neta (Pn), tasa de transpiración (Tr), concentración intercelular de CO₂ (Ci), conductancia estomática (Gs), eficiencia instantánea en el uso del agua (WUE_i = Pn/Tr) y valor de limitación estomática (Ls = 1-Ci/Ca, Ca representa la concentración de CO₂ en el aire).

Cada conjunto de medidas para la curva de respuesta a la luz y de CO₂ se realizó entre las 09:00 y las 11:30 en días soleados a finales de agosto 2018, en tres hojas verdes, sanas y completas de tres arbustos en cada parcela. Las intensidades de radiación fotosintética efectiva y de concentraciones de CO₂ se establecieron en 2000, 1600, 1200, 1000, 800, 600, 400, 300, 200, 150, 50, 20, 0 μmol m⁻² s⁻¹ y 400, 300, 200, 100, 50, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800 μmol s⁻¹, con un flujo de 400 μmol s⁻¹ y una temperatura de 25 °C.

Different models were used to establish the maximum net photosynthetic rate in light response curve (P_{max}) and the maximum net photosynthetic rate in CO_2 response curve (A_{max}), intrinsic quantum yield (AQY), dark respiration rate (R_d), initial carboxylation efficiency (CE), photorespiration rate (R_p), light saturation point (LSP), light compensation point (LCP); and CO_2 saturation point (CSP) and CO_2 compensation point (CCP) were calculated to test the optimal model.

Water potential measurements

The water potential (ψ) was determined with the WPC-4 dew point water potential meter (Decagon Devices, Inc., USA). Each set of diurnal measurements was carried out at 1 h intervals from 08:00 to 18:00, and three 5 cm complete and healthy branches growing on the third to fifth branch on top of canopy were selected from three shrubs in each plot.

Meteorological measurements

The meteorological factors were continuously monitored by an automatic weather station (Campbell Scientific, Logan, UT, USA). The photosynthetically active radiation (PAR), temperature (T_a), atmospheric relative humidity (RH), and air CO_2 concentrations (CO_2) were recorded every 30 min. The water vapor pressure deficit [$V_{pd} = 0.611 e^{\frac{17.502 T_a}{T_a + 240.97}} (1 - RH)$] was calculated accordingly.

Data analysis

All statistical tests were performed with IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) for Windows. Photosynthesis variables were analyzed using one-way ANOVA ($p \leq 0.05$) to compare differences between plant ages and evaluation months, as well as the effects and interactions of photosynthesis to physiology and meteorological factors using Pearson correlation coefficient, and graphs were constructed with Origin 9.0 (OriginLab Corporation, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Diurnal and monthly variation of photosynthesis

The main factors causing the decline of P_n are stomatal limitation and non-stomatal limitation. The former is mainly caused by the decrease of stomatal conductance due to stomatal closing, blocking the entry of CO_2 into the leaves; and the latter is mainly caused by metabolic damage of photosynthetic organs in mesophyll cells due to intense light, resulting in the

Modelos diferentes se usaron para establecer la tasa fotosintética neta máxima en la curva de respuesta a la luz (P_{max}) y la tasa fotosintética neta máxima en la curva de respuesta al CO_2 (A_{max}), rendimiento cuántico intrínseco (AQY), tasa de respiración en la oscuridad (R_d), eficiencia inicial de carboxilación (CE), tasa de fotorrespiración (R_p), punto de saturación lumínica (LSP), punto de compensación lumínica (LCP). Los puntos de saturación de CO_2 (CSP) y compensación de CO_2 (CCP) se calcularon para probar el modelo óptimo.

Medidas de potencial hídrico

El potencial hídrico (ψ) se determinó con el medidor de potencial hídrico WPC-4 (Decagon Devices, Inc., EE.UU.). Cada conjunto de medidas diurnas se registró en intervalos de 1 h de 08:00 a 18:00; tres ramas sanas y completas de 5 cm, que crecían en la tercera y quinta rama mayor de la copa, se seleccionaron de tres arbustos en cada parcela.

Medidas meteorológicas

Los factores meteorológicos se monitorearon de manera continua con una estación meteorológica automática (Campbell Scientific, Logan, UT, EE.UU.). La radiación fotosintéticamente activa (PAR), la temperatura (T_a), la humedad atmosférica relativa (RH), y las concentraciones de CO_2 en el aire (CO_2) se registraron cada 30 min. Con ellas se calculó el déficit de presión de vapor de agua [$V_{pd} = 0.611 e^{\frac{17.502 T_a}{T_a + 240.97}} (1 - RH)$].

Análisis de datos

Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo usando IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.) para Windows. Las variables de la fotosíntesis se analizaron con un ANDEVA de una vía ($p \leq 0.05$) para comparar diferencias entre edad de las plantas y meses de evaluación, así como los efectos e interacciones de la fotosíntesis con los factores fisiológicos y meteorológicos por medio del coeficiente de correlación de Pearson; los gráficos se crearon con Origin 9.0 (OriginLab Corporation, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variaciones diurnas y mensuales de la fotosíntesis

Los factores principales causantes de la disminución de P_n son la limitación estomática y la limitación no estomática. La reducción en la conductancia estomática causa la primera, debido al cierre estomático que impide la entrada de CO_2 a las hojas; los

inability of CO_2 to be fully assimilated. In fact, two factors above may occur at the same time, and the change of C_i determines which factor dominates. A stomatal limitation decreases P_n , so C_i also decreases (Figure 1); but, when P_n decreases by a non-stomatal limitation, thus C_i increases (Jiang *et al.*, 2000).

daños metabólicos en los organelos fotosintéticos de las células mesófilas causan la segunda, debido a la intensidad de la luz, lo cual da como resultado la incapacidad de asimilar completamente el CO_2 . En los hechos, ambos factores pueden ocurrir al mismo tiempo y el cambio en C_i determina cuál de los

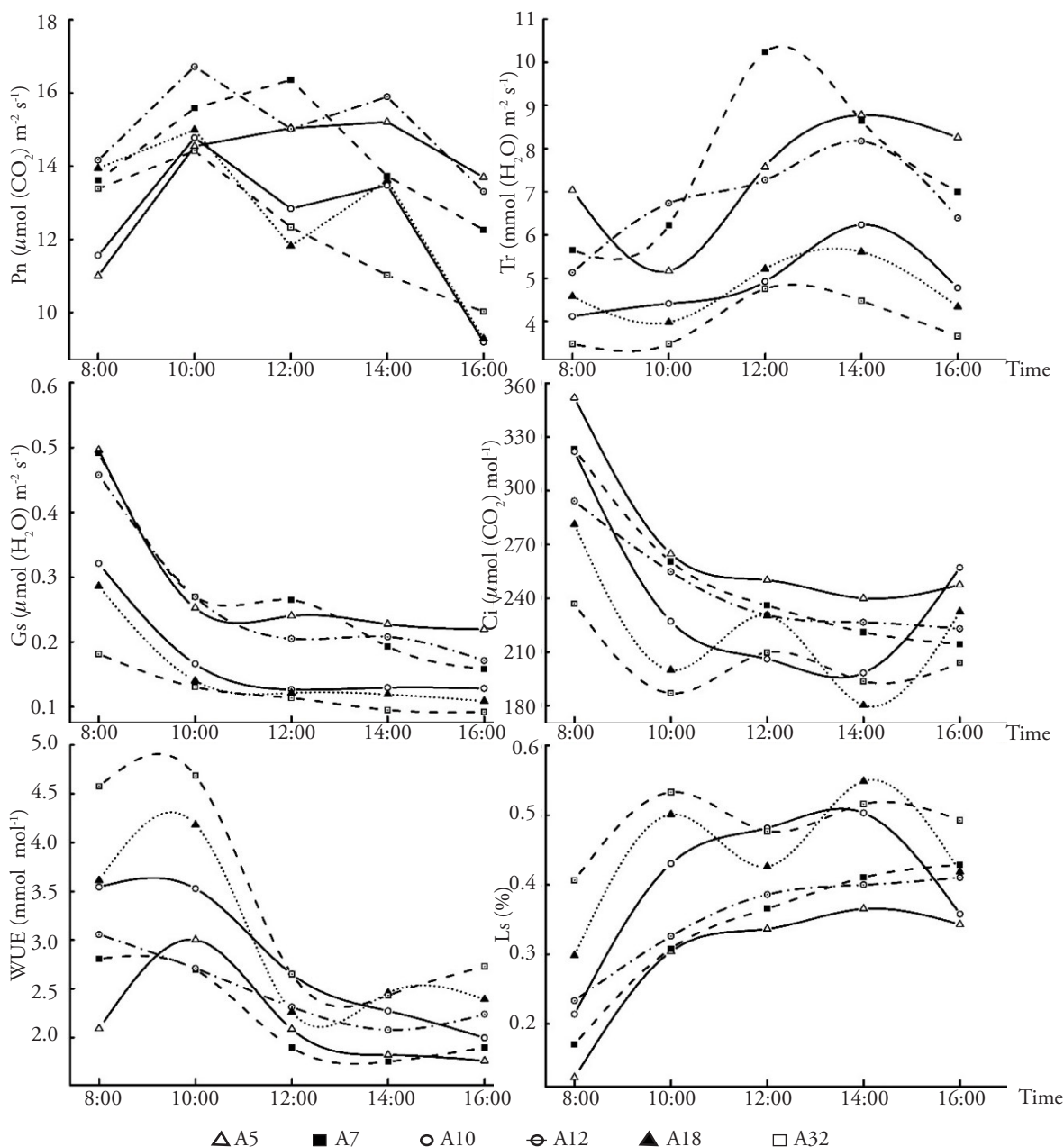


Figure 1. Diurnal variation of net photosynthetic rate (P_n), transpiration rate (Tr), intercellular CO_2 concentration (C_i), stomatal conductance (G_s), instantaneous water use efficiency (WUE_i), stomatal limitation value (L_s) of *Caragana intermedia* plants at ages 5-, 7-, 10-, 12-, 18- and 32-year-old.

Figura 1. Variación diurna de la tasa fotosintética neta (P_n), tasa de transpiración (Tr), concentración intercelular de CO_2 (C_i), conductancia estomática (G_s), eficiencia instantánea en el uso del agua (WUE_i), valor de limitación estomática (L_s) de plantas de *Caragana intermedia* de 5, 7, 10, 12, 18 y 32 años de edad.

When Pn of A5 and A7 fell, Tr and Ci also decreased with the increase of Ls synchronously, but Ci of A32 increased when the decline of Pn, together with a rise in Tr and a decline in Ls, which indicated that young-aged plant leaves resisted the external damage by closing the stomata, reducing the exchange of gas and energy with the outside, which led to the decrease of Pn. The old-aged plant leaves adopted defense mechanism to decrease the cell photosynthetic activity and release its own moisture to reduce the damage of the strong sunlight and high temperature, so that Pn decreased. Photosynthesis of middle-aged plant leaves showed obvious trends of “noon break” between 12:00 and 14:00. The Tr of A10 and A12 rose with Ci decrease and Ls increase, which indicated that the reason for the reduction of Pn included two aspects and the dominant factor was the leaf stomatal closure (Figure 1). The Tr and Ci of A18 increased with Ls decrease, which differed from the A10 and A12 response mechanism to the environment, indicating that the non-stomatal limitation dominated and led to a decrease of Pn.

WUEi can be used to characterize the instantaneous accumulation of dry matter in plants. Elevated WUEi will produce more dry matter mass per unit (Huang *et al.*, 2016). Plants constantly adjust their physiological processes in the long-term adaptability to the environment, and one approach is to improve WUEi by regulating the relationship between photosynthesis and water consumption to resist water shortage (Liu *et al.*, 2012). When the WUEi increased, Pn declined less than Tr, indicating that plants used transpiration to increase the water use efficiency, which was also showed plant drought resistance. WUEi increased with the growth of plantation age (Figure 1), indicating that the continuous adaptation of the plant to the environment was followed by the accumulation efficiency of dry matter and the drought resistance improvement (Tomás *et al.*, 2012).

No difference of daily average Pn was found between A7 and A10, A12 and A18 (Table 1), but there were differences among the other plantations ($p \leq 0.05$), indicating that physiological changes during growth from A5 to A7, A10 to A12, and A18 to A32 were more obvious than at other periods. The daily average of Ci, WUEi and Ls increased with plants growth but Tr and Gs did the opposite, indicating that maturity (years of growth) significantly affected photosynthesis.

factores predomina. Una limitación estomática reduce Pn, y también reduce Ci (Figura 1); pero cuando Pn se reduce por una limitación no estomática, aumenta la Ci (Jiang *et al.*, 2000).

Cuando se redujo Pn de A5 y A7, Tr y Ci también se redujeron con el aumento sincrónico de Ls, pero la Ci de A32 aumentó con la reducción de Pn, junto con un aumento en Tr y una caída de Ls, lo cual indicó que las hojas de las plantas jóvenes resistieron el daño externo al cerrar sus estomas, lo cual redujo el intercambio de gas y energía con el exterior, esto condujo a la reducción de Pn. Las hojas de plantas de edad madura adoptaron un mecanismo de defensa para reducir la actividad fotosintética celular y producir su propia humedad para reducir los daños por la luz solar fuerte y la temperatura alta, por lo tanto se redujo la Pn. La fotosíntesis de plantas de edades intermedias presentaron tendencias obvias de “descanso de mediodía” entre las 12:00 y las 14:00. La Tr de A10 y A12 creció con la reducción de Ci y el aumento de Ls, lo cual indicó que la razón detrás de la reducción de Pn incluyó dos aspectos y el factor dominante fue el cierre de los estomas en las hojas (Figura 1). Tr y Ci de A18 aumentaron con la reducción de Ls, lo cual difirió de los mecanismos de respuesta al ambiente de A10 y A12; esto indicó que la limitación no estomática predominó y fue la que condujo al decremento de Pn.

La WUEi se puede usar para caracterizar la acumulación instantánea de materia seca en plantas. Una WUEi elevada producirá más materia seca por unidad (Huang *et al.*, 2016). Las plantas ajustan constantemente sus procesos fisiológicos para adaptarse al ambiente en el largo plazo, y una forma es mejorar la WUEi por medio de regular la relación entre la fotosíntesis y el consumo de agua para resistir la escasez de agua (Liu *et al.*, 2012). Cuando aumentó la WUEi, la Pn se redujo menos que la Tr; esto indica que las plantas usaron la transpiración para aumentar su eficiencia en el uso del agua, lo cual también significó resistencia de las plantas a sequía. La WUEi aumentó con la edad de la plantación (Figura 1), lo cual indica que a la adaptación continua de la planta al ambiente siguió la eficiencia en la acumulación de materia seca y el mejoramiento de la resistencia a sequía (Tomás *et al.*, 2012).

No se encontró una diferencia en el promedio diario de Pn entre A7 y A10, A12 y A18 (Cuadro 1), aunque sí hubo diferencias con las otras plantaciones ($p \leq 0.05$); esto indica que los cambios fisiológicos

Table 1. Daily mean of net photosynthetic rate (Pn), transpiration rate (Tr), intercellular CO₂ concentration (Ci), stomatal conductance (Gs), instantaneous water use efficiency (WUEi), stomatal limitation value (Ls) of *Caragana intermedia* plants at ages 5-, 7-, 10-, 12-, 18- and 32-year-old.**Cuadro 1.** Media diaria de tasa fotosintética (Pn), tasa de transpiración (Tr), concentración intercelular de CO₂ (Ci), conductancia estomática (Gs), eficiencia instantánea en el uso del agua (WUEi), valor de limitación estomática (Ls) de plantas de *Caragana intermedia* de 5, 7, 10, 12-, 18- y 32 años de edad.

Ages	Pn	Gs	Ci	Tr	WUEi	Ls
A5	13.2±4.3a	0.61±1.49a	288±54a	6.8±3.3a	2.2±0.9a	0.27±0.12a
A7	14.0±4.0b	0.40±1.14b	257±52b	6.8±3.2a	2.3±0.9a	0.33±0.13b
A10	14.6±3.7b	0.24±0.24c	247±39c	5.9±2.4b	2.7±1.0b	0.36±0.10c
A12	10.8±6.1c	0.15±0.15cd	243±76c	4.3±2.6c	2.9±2.0b	0.39±0.18d
A18	9.8±6.1d	0.13±0.12d	245±77c	4.1±2.3c	2.7±1.8b	0.39±0.19d
A32	10.1±5.9d	0.10±0.07d	215±74d	3.4±2.0d	3.3±2.0c	0.46±0.18e

†Averages with different letter indicate statistical difference (HSD; $p \leq 0.05$) (mean±SD). ♦ †Promedios (media ±SD) con letra diferente indican diferencias estadísticas (HSD; $p \leq 0.05$).

The photosynthetic variables increased first and then decreased with the month, and the order in different months was consistent with the daily mean (Figure 2). The difference in each month was mainly in the young-aged and others ($p \leq 0.05$). The Tr increased first and then decreased with the month, which was higher in July than those in June ($p \leq 0.05$). The young-aged Gs was the opposite of the middle-aged and old-aged, and the monthly difference was mainly between young-aged and others ($p \leq 0.05$). WUEi of different plantation ages showed no regularity with the increase of months; the Ci differences in three months were significant except A5 ($p \leq 0.05$), and the Ls of A5 was different from other ages in each month.

The difference in Pn in three months showed a progress from scratch with the increase of the plantation age, which also indicated that the ability to cope with environmental changes improved as the plants grew with the environmental adaptability. The indicators showed a trend of increase first and then decrease with the change of the months, and the order of photosynthesis index values of different ages was basically consistent with the daily average value.

The daily variations of meteorological factors in the study area were obvious smooth curves (Figure 3). The change trend of Ta and RH was opposite, the maximum and minimum were at 07:00 and 16:00 with value of 7.0 °C and 22.3 °C, 96.5% and 37.0%, respectively. The PAR increased from 07:00 and reached the maximum of 1736 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 13:00, and then decreased to zero at 20:00. The

durante el crecimiento de A5 respecto a A7, de A10 a A12, y de A18 a A32 fueron más obvios que en otros periodos. El promedio diario de Ci, WUEi y Ls aumentó con el crecimiento de las plantas. Con Tr y Gs ocurrió lo contrario, lo cual indicó que la madurez (años de crecimiento) afectaron la fotosíntesis de manera significativa.

Las variables fotosintéticas aumentaron primero y luego se redujeron cada mes y el orden en meses diferentes fue consistente con la media diaria (Figure 2). La diferencia por mes se encontró principalmente entre las plantas jóvenes y las otras ($p \leq 0.05$). La Tr aumentó primero y después se redujo cada mes, y fue mayor en julio que en junio ($p \leq 0.05$). Gs en plantas jóvenes fue lo contrario que en edades mediana y madura, y la diferencia mensual estuvo sobre todo entre las jóvenes y las otras ($p \leq 0.05$). La WUEi de plantaciones de edades diferentes no presentó regularidad con el pasar de los meses; las diferencias en Ci durante tres meses fueron significativas, excepto en A5 ($p \leq 0.05$), y Ls de A5 fue diferente a la de otras edades cada mes.

La diferencia en Pn de tres meses presentó mejora desde cero con el aumento de la edad de las plantas, lo cual también indicó que la habilidad para enfrentar los cambios ambientales mejoró a medida que las plantas crecieron con adaptabilidad ambiental. Los indicadores mostraron una tendencia de aumento primero y después una reducción con el paso de los meses, y el orden de los valores del índice de fotosíntesis en edades diferentes fue consistente con el valor del promedio diario.

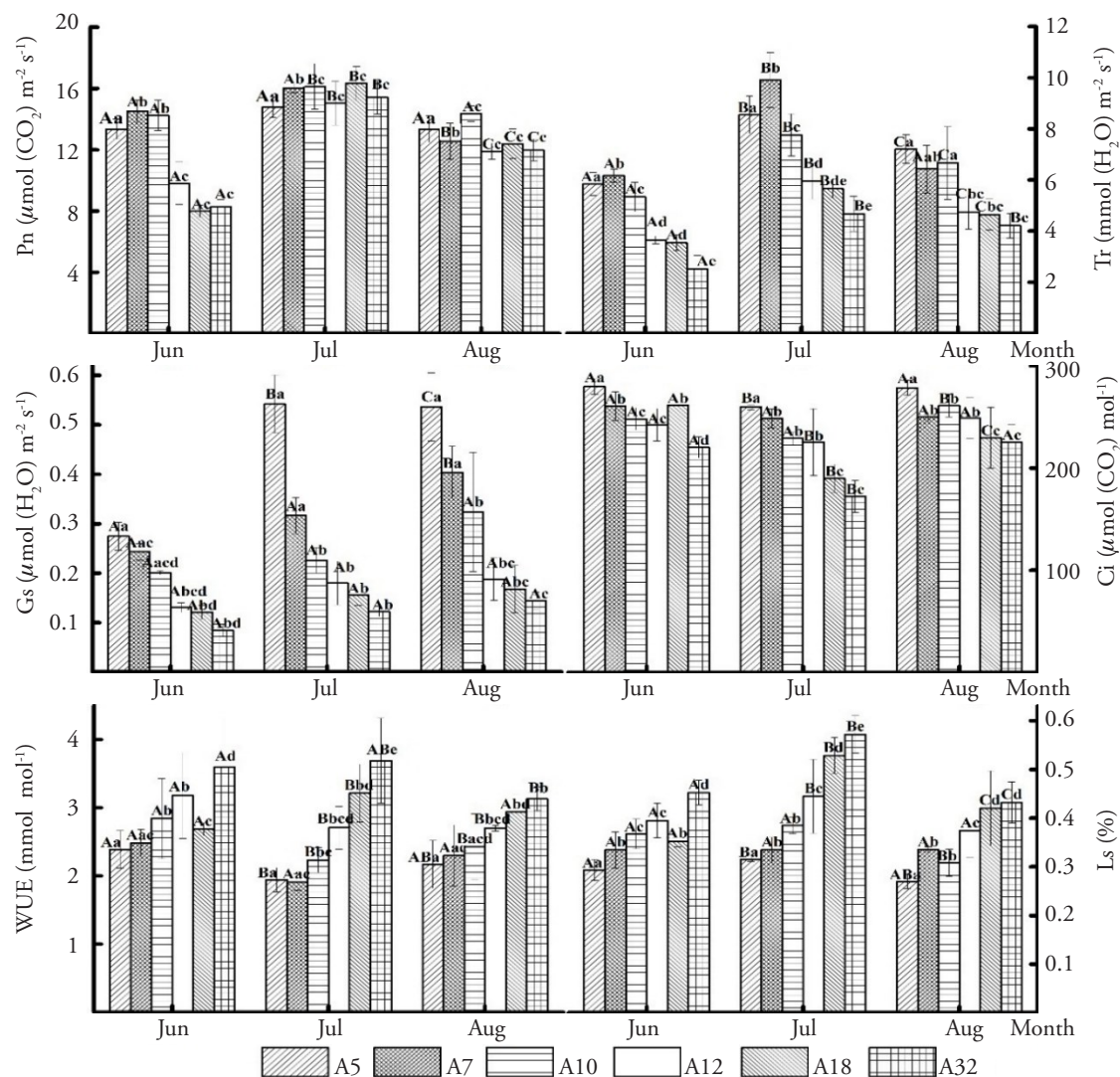


Figure 2. Monthly variation of net photosynthetic rate (Pn), transpiration rate (Tr), intercellular CO₂ concentration (Ci), stomatal conductance (Gs), instantaneous water use efficiency (WUEi), stomatal limitation value (Ls) of *Caragana intermedia* plants at ages 5-, 7-, 10-, 12-, 18- and 32-year-old. Different uppercase letters indicate significant difference in different months; different lowercase letters indicate significant difference of ages (HSD, $p \leq 0.05$).

Figura 2. Variación mensual de la tasa fotosintética neta (Pn), tasa de transpiración (Tr), concentración intercelular de CO₂ (Ci), conductancia estomática (Gs), eficiencia instantánea en el uso del agua (WUEi), valor de limitación estomática (Ls) de plantas de *Caragana intermedia* a los 5, 7, 10, 12, 18 y 32 años de edad. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre meses; letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre edades (HSD, $p \leq 0.05$).

maximum of V_{pd} was 1.73 kPa at 16:00, and the minimum value was 0.03 kPa at 06:00. The peak in concentration of CO₂ was at 08:00, then started to fall rapidly with the largest slope between 08:00 and 12:00, and then remained low followed by a slight increase at 19:00.

The growth age positively correlated with Pn, Gs, Ci, and Tr, while negatively correlated with Ls and WUEi. Pn was negatively correlated with Ci,

Las variaciones diarias de los factores meteorológicos en el área de estudio fueron curvas obviamente suaves (Figura 3). Las tendencias de cambio en T_a y RH fueron opuestas; el valor máximo y el mínimo fueron a las 07:00 y 16:00 con valores de 7.0 °C y 22.3 °C, 96.5% y 37.0%, respectivamente. PAR aumentó desde las 07:00 y alcanzó el máximo de 1736 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a las 13:00 y para caer luego hasta cero a las 20:00. El V_{pd} máximo fue de 1.73 kPa a las

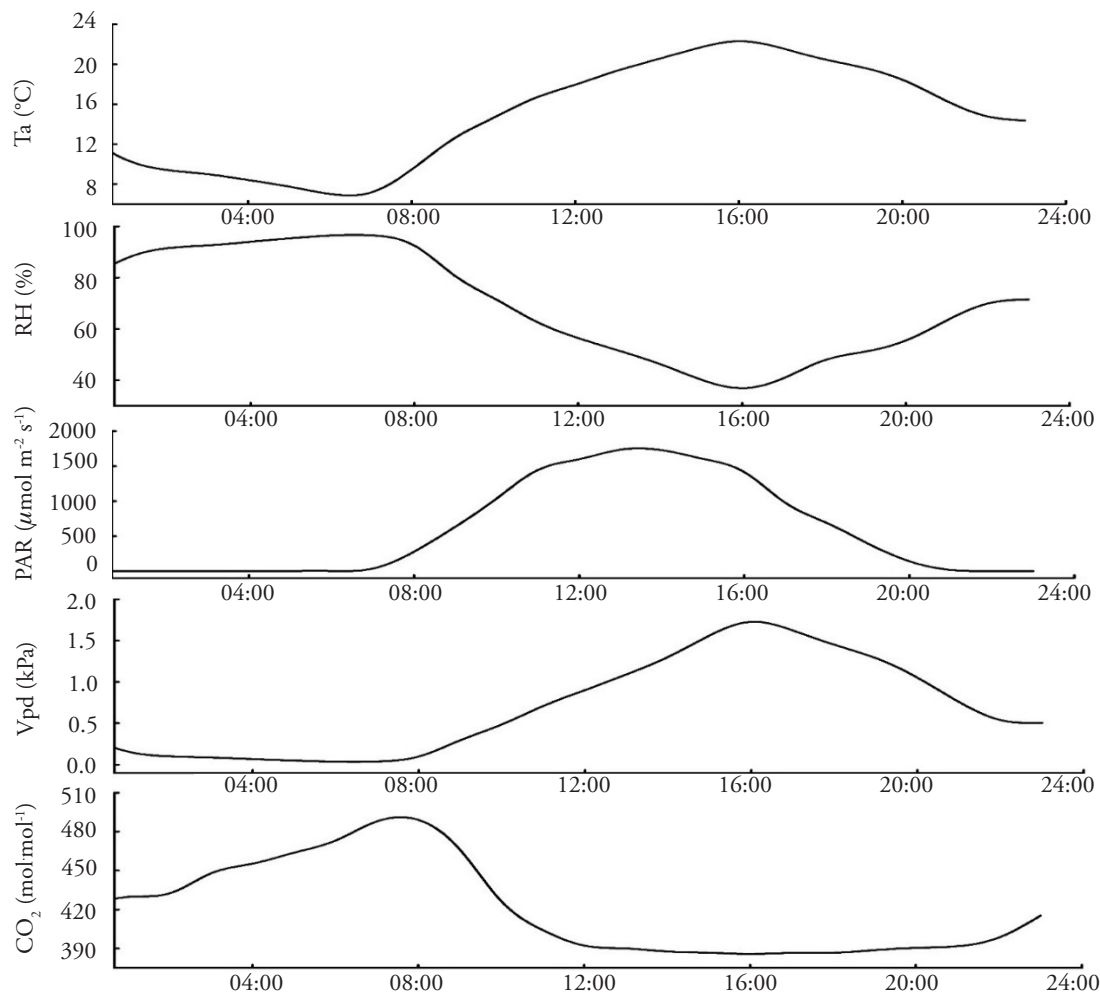


Figure 3. Diurnal variation of temperature (T_a), atmospheric relative humidity (RH), photosynthetically active radiation (PAR), water vapor pressure deficit (Vpd) and air CO_2 concentrations.

Figura 3. Variación diurna de temperatura (T_a), humedad atmosférica relativa (RH), radiación fotosintéticamente activa (PAR), déficit de presión de vapor de agua (Vpd) y (CO_2) concentraciones de CO_2 en el aire.

CO_2 and Vpd, and positively correlated with other variables, and the correlation coefficient with T_r was up to 0.62 (Table 2) indicating that T_r was the most influential factor for P_n in the study area of harsh desert environmental conditions with strong lightness, high temperature and low humidity at noon.

Diurnal variation of water potential

The diurnal variation of water potential of *C. intermedia* decreased first and then increased (Figure 4 A). The maximum values of A7 and A10 were at 14:00 and 13:00 with the minimum at 13:00, while maximum and minimum values of other ages were at 18:00 and 14:00. The daily average value of the

16:00, y el valor mínimo fue de 0.03 kPa a las 06:00. El valor asintótico en la concentración de CO_2 se dio a las 08:00, después empezó a caer rápidamente, con el declive mayor entre las 08:00 y las 12:00, después de eso permaneció bajo, hasta un aumento leve a las 19:00.

La edad de crecimiento se correlacionó de forma positiva con P_n , G_s , C_i y T_r , y de forma negativa con L_s y WUE_i . P_n mostró correlación negativa con C_i , CO_2 y Vpd, y positiva con las otras variables, y el coeficiente de correlación con T_r alcanzó 0.62 (Cuadro 2), todo lo cual indica que T_r fue el factor más influyente sobre P_n en el área de estudio, bajo condiciones desérticas hostiles con luminosidad fuerte, temperaturas altas y contenido de humedad bajo en el mediodía.

Table 2. Correlation coefficients between pairs of physiological and environmental variables; net photosynthetic rate (Pn), transpiration rate (Tr), intercellular CO₂ concentration (Ci), stomatal conductance (Gs), instantaneous water use efficiency(WUEi), stomatal limitation value (Ls) and temperature (Ta), atmospheric relative humidity (RH), photosynthetically active radiation (PAR), water vapor pressure deficit (Vpd) and air CO₂ concentrations (CO₂).

Cuadro 2. Coeficientes de correlación entre pares de variables fisiológicas y ecológicas; tasa fotosintética neta (Pn), tasa de transpiración (Tr), concentración intercelular de CO₂ (Ci), conductancia estomática (Gs), eficiencia instantánea del uso del agua (WUEi), valor de limitación estomática (Ls) y temperatura (Ta), humedad atmosférica relativa (RH), radiación fotosintéticamente activa (PAR), y concentración de CO₂ en el aire (CO₂).

	Pn	Gs	Ci	Tr	WUEi	Ls	Ta	CO ₂	RH	PAR	Vpd
Age	0.23	0.49	0.27	0.43	-0.18	-0.31	-0.09	-0.25	0.06	-0.10	-0.16**
Pn	1	0.61	-0.28	0.62	0.39	0.24	-0.02 ^{ns}	-0.14	0.06	0.03 ^{ns}	-0.12**
Gs	0.61	1	0.50	0.75	-0.09	-0.54	-0.42	-0.07	0.39	-0.29	-0.52**
Ci	-0.28	0.50	1	0.18	-0.55	-0.99	-0.50	0.17	0.43	-0.32	-0.50**
Tr	0.62	0.75	0.18	1	-0.41	-0.23	0.23	-0.27	-0.25	0.16	0.13**
WUEi	0.39	-0.09	-0.55	-0.41	1	0.55	-0.36	0.14	0.42	-0.23	-0.36**
Ls	0.24	-0.54	-0.99	-0.23	0.55	1	0.49	-0.07	-0.43	0.33	0.51**

[†]All values were significant (p≤0.01); except when indicated: ns = no significant. ♦ [†]Todos los valores fueron significativos (p≤0.01); excepto donde se indique: ns = no significativo.

water potential increased with age increasing, and the old-aged was significantly lower (p≤0.05) than that of the younger ages (Figure 4 B). The trends in water potential change of six different growth ages synchronized with the meteorological factors to some extent.

According to the correlation test (Table 3), the ψ was negatively correlated with PAR, Ta, and Vpd, and positively correlated with RH and WUEi. The ψ significantly correlated with PAR indicating that

Variación diaria del potencial hídrico

La variación diaria en el potencial hídrico de *C. intermedia* se redujo primero y luego aumentó (Figura 4 A). Los valores máximos de A7 y A10 fueron a las 14:00 y las 13:00, con el mínimo a las 13:00, mientras que los valores máximo y mínimo de otras edades ocurrieron a las 18:00 y 14:00. El promedio diario del potencial hídrico aumentó con la edad y en edades maduras fue significativamente más bajo

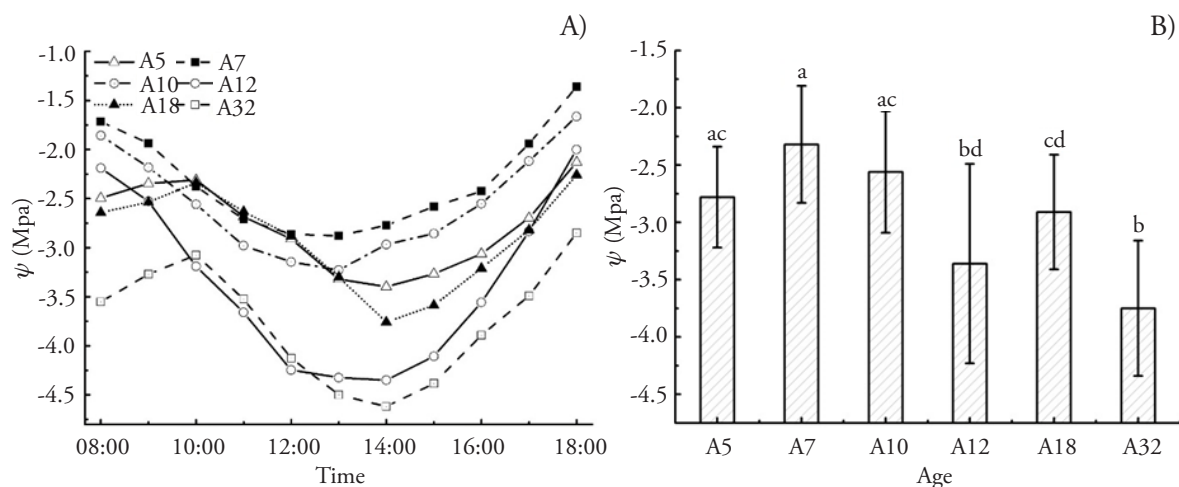


Figure 4. Diurnal variation (A) and daily mean (B) of water potential (ψ) of *Caragana intermedia* plants at ages 5-, 7-, 10-, 12-, 18- and 32-year-old.

Figura 4. Variación diaria (A) y media diaria (B) del potencial hídrico (ψ) de plantas de *Caragana intermedia* a los 5, 7, 10, 12, 18 y 32 años de edad.

the intense radiation improved water absorption capacity and water consumption of the plant to face the external environment. The correlation of ψ to WUEi and PAR increased first and then decreased with the age increasing. The ψ of the young-aged was significantly higher than that of the old-aged, while the middle-aged was in a transitional stage, which was significantly different from the young- and the old-aged, indicating that the ability of plants to obtain water from the soil increased as plants grew.

Water potential is an indicator of the ability of plants to absorb water (Othman *et al.*, 2014). The experiment showed that plants growing in plots at drought had significantly lower water potentials compared to ambient or irrigated treatments (Maricle and Addler, 2011). The same as *C. intermedia*, the water potential of *Ilex paraguariensis* diminished in an increasing water restriction (Acevedo *et al.*, 2013). The water potential diurnal variation trend of *C. intermedia* is similar with that of maize and triticale, but the water potential values were lower than the values in those cereals (Grzesiak *et al.*, 2013); likewise, *O. europaea* L. cv. *Arbequina* growing in non-arid conditions during the same period (Ahumada-Orellana *et al.*, 2017).

Meteorological and physiological factors both affect the water potential of the plants (Klein, 2014). The same as *C. intermedia*, PAR influenced water potential of *Allocasuarina verticillat* (Wang *et al.*, 2014). But different from *C. intermedia*, high correlation coefficients were obtained for the relationship between water potential and physiological

($p \leq 0.05$) que el de edades más jóvenes (Figura 4 B). Las tendencias en el cambio del potencial hídrico en las seis edades, se sincronizaron en nivel con los factores meteorológicos.

De acuerdo con el análisis de correlación (Cuadro 3), ψ se correlacionó en forma negativa con PAR, Ta y Vpd, y en forma positiva con RH y WUEi. El ψ se correlacionó de forma significativa con PAR, lo cual indica que la radiación solar intensa mejoró la capacidad de absorción y el consumo del agua por parte de la planta para enfrentar al ambiente externo. La correlación del ψ con WUEi y PAR primero aumentó y después se redujo con el aumento en la edad. El ψ de las plantas jóvenes fue significativamente mayor que el de las de edad madura, mientras que las de edad media estuvieron en etapa de transición, lo cual resultó significativamente diferente a las jóvenes y a las de edad madura; es decir, la habilidad de las plantas para obtener agua del suelo aumentó conforme las plantas crecieron.

El potencial hídrico es un indicador de la habilidad de las plantas de absorber agua (Othman *et al.*, 2014). El experimento demostró que las plantas que crecieron en las parcelas con sequía tuvieron un potencial hídrico significativamente menor en comparación con los tratamientos bajo ambiente natural o riego (Maricle y Addler, 2011). Al igual que *C. intermedia*, el potencial hídrico de *Ilex paraguariensis* se redujo a medida que se incrementó la restricción del agua (Acevedo *et al.*, 2013). La tendencia de variación diurna del potencial hídrico de *C. intermedia* es similar a la del maíz y el híbrido triticale, aunque

Table 3. Correlation between water potential (ψ) of *Caragana intermedia* and transpiration rate (Tr), instantaneous water use efficiency (WUEi) and photosynthetically active radiation (PAR), temperature (Ta), atmospheric relative humidity (RH), water vapor pressure deficit (Vpd).

Cuadro 3. Correlación entre el potencial hídrico (ψ) de *Caragana intermedia* y tasa de transpiración (Tr), eficiencia instantánea en el uso del agua (WUEi) y radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura (Ta), humedad atmosférica relativa (RH) y déficit de presión de vapor de agua (Vpd).

Age	Tr	WUEi	PAR	Ta	RH	Vpd
A5	-0.665	0.681	-0.835 [§]	-0.53	0.553	-0.479
A7	-0.525	0.931 [†]	-0.905 [§]	-0.275	0.294	-0.126
A10	-0.634	0.938 [†]	-0.915 [§]	-0.288	0.303	-0.129
A12	-0.59	0.980 [§]	-0.963 [§]	-0.453	0.47	-0.318
A18	0.325	0.064	-0.732 [†]	-0.529	0.551	-0.508
A32	0.449	0.202	-0.781 [§]	-0.389	0.411	-0.332

Significant at [†] $p \leq 0.05$; [§] $p \leq 0.01$. ♦ xx

factors like stomatal WUE for *Pelargonium hortorum* (Boyle *et al.*, 2016), maize and triticale (Grzesiak *et al.*, 2013). This is due to meteorological factors change not only affects the water potential, but also affects the changes of the physiological factors of the plant. In comparison to physiological factors, the meteorological factors influenced more the water potential.

Light response curves

The Pn increased fast when $PAR < 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and the increment of Pn decreased with PAR, indicating that the restriction of PAR for Pn reduced. The Pn remained basically unchanged after reaching a certain value, indicating that PAR was not the main factor affecting leaf photosynthesis. The light response curves of different growth age plants were as follows $A12 > A32 > A18 > A10 > A7 > A5$ (Figure 5).

The results of AQY and Pmax calculated by the rectangular hyperbola were generally higher than those by other models, while which by exponential equation were lower on the contrary. The LSP of non-rectangular hyperbola and rectangular hyperbola simulations were far less than those of the exponential equation and modified rectangular hyperbola as well as measured data.

The light response curves of six growth ages plants was well described by modified rectangular hyperbola comprehensively comparing four different models combining the measured data. This simulation results were basically the same as the measured results. When $PAR < 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the Pn of A32 was higher than that of A10, while the Pn of A10 was higher than that of A32 when $PAR > 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. When $PAR < 1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Pn of A32 was higher than that of A18, while $PAR > 1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was just the opposite, indicating that the adaptive high-intensity illumination range for leaf photosynthesis at A32 was significantly less than A18.

The AQY of photosynthesis of different ages *C. intermedia* was $A32 > A7 > A5 > A18 > A10 > A12$ (Table 4). The AQY decreased first and then increased when plants get older. The order of Pmax was basically consistent with that of the light response curve, except that the Pmax of A5 was higher than that of A7, indicating that the increase in leaf photosynthetic capacity of A5 was greater than

los valores de potencial hídrico fueron menores que los valores en dichos cereales (Grzesiak *et al.*, 2013); lo mismo ocurrió con *O. europaea L. cv. Arbequina* cuando se cultivó en condiciones no áridas durante el mismo periodo (Ahumada-Orellana *et al.*, 2017). Tanto los factores meteorológicos como los fisiológicos afectan el potencial hídrico de las plantas (Klein, 2014). Al igual que con *C. intermedia*, PAR influyó sobre el potencial hídrico de *Allocasuarina verticillat* (Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, a diferencia de *C. intermedia*, se obtuvieron coeficientes de correlación altos para la relación entre el potencial hídrico y factores fisiológicos como la WUE estomática en *Pelargonium hortorum* (Boyle *et al.*, 2016), maíz y triticale (Grzesiak *et al.*, 2013). Esto se debe a que los cambios en factores meteorológicos no solo afectan el potencial hídrico, sino también cambian los factores fisiológicos de la planta. En comparación con los factores fisiológicos, los meteorológicos ejercieron una influencia mayor sobre el potencial hídrico.

Curvas de respuesta a la luz

La Pn aumentó rápido cuando $PAR < 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el aumento de Pn se redujo con PAR, lo cual indica que la restricción de PAR sobre Pn se redujo. Pn permaneció básicamente sin cambios después de alcanzar cierto valor, y significa que PAR no fue el factor principal que afectó la fotosíntesis foliar. Las curvas de respuesta a la luz de plantas de diferentes edades de crecimiento se ordenaron como sigue: $A12 > A32 > A18 > A10 > A7 > A5$ (Figura 5).

Los resultados de AQY y Pmax calculados por la hipérbola rectangular fueron, en términos generales, mayores que los obtenidos con otros modelos, mientras que, al contrario, fueron menores cuando se calcularon con una ecuación exponencial. Los LSP de las simulaciones por hipérbolas no rectangulares y rectangulares fueron mucho menores a los de la ecuación exponencial y la hipérbola rectangular modificada, así como a los datos medidos.

Las curvas de respuesta a la luz de seis edades de plantas se describieron bien por hipérbolas rectangulares modificadas, al comparar exhaustivamente cuatro modelos diferentes para combinar los datos medidos. Los resultados de esta simulación fueron básicamente los mismos que los resultados medidos. Cuando $PAR < 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la Pn de A32 fue mayor a la de A10, mientras que la Pn de A10 fue mayor a la de A32 cuando $PAR > 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

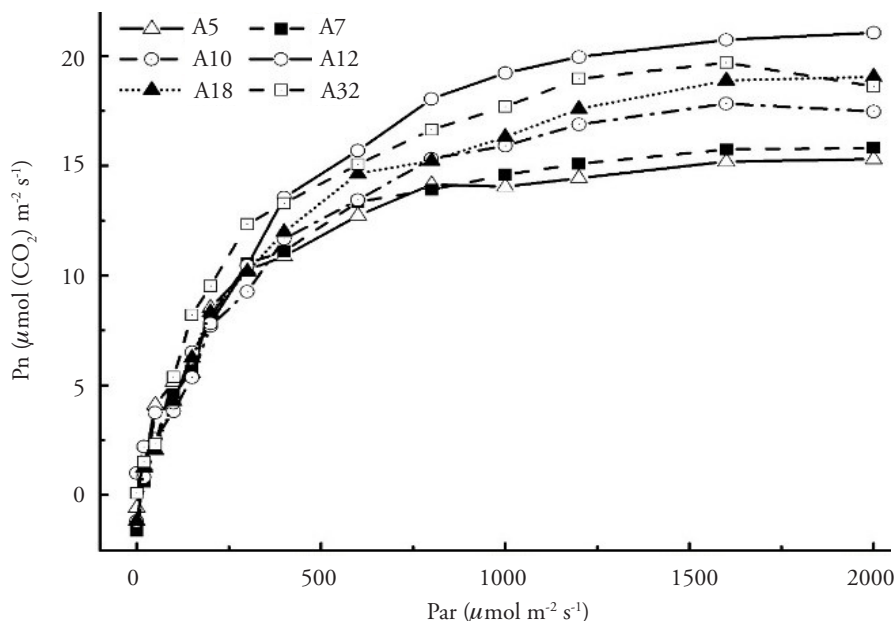


Figure 5. Measured light response curves of *Caragana intermedia* at ages 5-, 7-, 10-, 12-, 18- and 32-year-old. Pn, net photosynthetic rate; PAR, photosynthetically active radiation.

Figura 5. Curvas de medida de respuesta a la luz de *Caragana intermedia* a los 5, 7, 10, 12, 18 y 32 años de edad. Pn, tasa fotosintética; PAR, radiación fotosintéticamente activa.

that of A7. The LSP of A7 and A18 were significantly higher than those of others, indicating that the maximum light intensity available to photosynthesis of A7 and A18 was higher, as well as a larger range of light intensity utilization. The Rd of A12 was the largest but their AQY was minimal, representing the photosynthetic capacity of the plant.

The response curve of plant leaf photosynthesis is an important method to reflect the photosynthesis efficiency of plants. The AQY calculated from the light response curve model is an indicator of the utilization efficiency of vegetation on weak lightness. The utilization efficiency of light energy in the leaves of *C. intermedia* decreased first and then increased as the plants grew, as well as Pmax. The AQY of A32 was the maximum of all plantations, indicating that the light energy conversion efficiency of the leaves was high of this age with the high ability to assimilate CO₂. The AQY of A7 was large with the smallest Pmax of all plantations, which meant that AQY could not determine Pmax. The LSP can indicate the ability of plants using light intensity. The LCP represents the minimum PAR that plants use to maintain their survival. The higher LSP with the lower LCP indicates the wider the PAR range that plants can utilize for photosynthesis. The LSP of A10

Cuando PAR < 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la Pn de A32 fue mayor a la de A18, mientras que con PAR > 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sucedió lo contrario. Esto indica que el intervalo de adaptabilidad a la radiación de alta intensidad de la fotosíntesis foliar en A32 fue significativamente menor que en A18.

El AQY de la fotosíntesis por edades de *C. intermedia* se ordenó A32 > A7 > A5 > A18 > A10 > A12 (Cuadro 4). AQY primero se redujo y luego aumentó a medida que las plantas maduraron. El orden de Pmax fue básicamente consistente con el de la curva de respuesta a la luz, excepto por que la Pmax de A5 fue mayor a la de A7, lo cual indica que el aumento en la capacidad fotosintética en A5 fue mayor a la de A7. Los LSP de A7 y A18 fueron significativamente más altos que los de otras plantas, significa que la intensidad lumínica máxima disponible para la fotosíntesis fue mayor en A7 y A18 y contaron con un intervalo mayor de uso de la intensidad lumínica. La Rd de A12 fue la mayor, pero su AQY fue mínimo, este valor representa la capacidad fotosintética de la planta.

La curva de respuesta de la fotosíntesis foliar es un método importante para expresar la eficiencia fotosintética de las plantas. AQY calculado a partir del modelo de la curva de respuesta a la luz es un indica-

Table 4. Model fitting results of light response curves for different ages *C. intermedia* (AQY - apparent quantum efficiency, Pmax - the maximum net photosynthetic rate, LSP - light saturation point, Rd-dark respiration rate, R²- correlation coefficient).

Cuadro 4. Resultados de ajuste de modelos de curvas de respuesta a la luz de *C. intermedia* por edades (AQY – rendimiento cuántico intrínseco, Pmax – tasa fotosintética neta máxima, LSP - punto de saturación lumínica, Rd-tasa de respiración en la oscuridad, R²- coeficiente de determinación).

Age	Model	AQY	Pmax	LSP	LCP	Rd	R ²
A5	Non-rectangular hyperbola	0.072	17.12	384.16	22.066	1.376	0.98
	Rectangular hyperbola	0.090	17.86	394.937	20.519	2.108	0.978
	Exponential equation	0.054	14.92	757.291	19.204	0.979	0.977
	Modified rectangular hyperbola	0.082	16.03	1506.37	20.981	1.884	0.979
A7	Non-rectangular hyperbola	0.072	18.39	407.322	17.409	1.182	0.992
	Rectangular hyperbola	0.093	19.52	429.189	17.575	1.467	0.991
	Exponential equation	0.058	15.32	700.491	19.283	1.057	0.989
	Modified rectangular hyperbola	0.085	15.83	2294.26	17.244	1.317	0.992
A10	Non-rectangular hyperbola	0.049	19.82	575.095	6.601	0.218	0.978
	Rectangular hyperbola	0.065	22.95	625.527	11.519	0.53	0.975
	Exponential equation	0.043	18.22	1240.7	14.094	0.954	0.984
	Modified rectangular hyperbola	0.064	17.47	1671.01	7.156	0.562	0.929
A12	Non-rectangular hyperbola	0.056	24.93	597.244	32.263	2.261	0.979
	Rectangular hyperbola	0.074	27.3	618.267	30.854	2.891	0.976
	Exponential equation	0.052	21.34	1261.54	22.164	1.008	0.978
	Modified rectangular hyperbola	0.062	21.77	1681.62	31.014	2.451	0.979
A18	Non-rectangular hyperbola	0.069	22.57	532.06	30.445	1.388	0.991
	Rectangular hyperbola	0.076	23.48	537.199	30.932	1.602	0.99
	Exponential equation	0.05	18.49	1261.54	24.504	1.019	0.985
	Modified rectangular hyperbola	0.071	20.53	2709.43	20.441	1.02	0.99
A32	Non-rectangular hyperbola	0.103	23.65	477.559	32.868	1.886	0.972
	Rectangular hyperbola	0.114	24.62	478.703	33.602	1.959	0.969
	Exponential equation	0.063	19.15	893.741	19.247	1.023	0.97
	Modified rectangular hyperbola	0.088	20.89	1679.68	33.756	1.84	0.959

was not high, but the LCP was much lower than other plantations, indicating that the range of available weak light was greater than the other cases. Rd can represent the metabolic intensity of plant leaves, and the Rd of A10 was significantly smaller than other plantations, indicating that plants maintained their own life activities required less energy, so the Pmax of A10 was not the least of all plantations.

CO₂ response curve

The Pn-Ci curves of different ages *C. intermedia* showed the same trend (Figure 6 A). When Ci < 300 μmol mol⁻¹, Pn elevated with the increase of Ci and the Pn-Ci curve was almost a straight line. When Ci > 300 μmol mol⁻¹, the slope of the Pn-Ci curve decreased with Pn increasing slowly. The Pn remained basically unchanged after reaching a certain value, indicating that CO₂ was not the main factor affecting

dor de la eficiencia en el uso energía lumínica por la vegetación bajo luz tenue. La eficiencia en el uso de energía lumínica en las hojas de *C. intermedia* primero se redujo y luego aumentó a medida que las plantas maduraron, como también fue el caso de Pmax. El AQY en A32 fue el máximo entre todas las plantaciones, lo cual indica que la eficiencia de conversión de energía lumínica de las hojas fue alta en esa edad, con la capacidad mayor para asimilar CO₂. El AQY de A7 fue alto, pero con la Pmax menor de todas las plantaciones, esto significa que AQY no determinó la Pmax. El LSP puede indicar la capacidad de las plantas para usar la intensidad lumínica. El LCP representa la PAR mínima que las plantas usan para mantener su supervivencia. Un LSP más alto con LCP menor indica el intervalo más amplio de PAR que las plantas pueden usar para la fotosíntesis. El LSP de A10 no fue alto, pero su LCP fue mucho menor al de otras plantaciones, indicando que el rango de

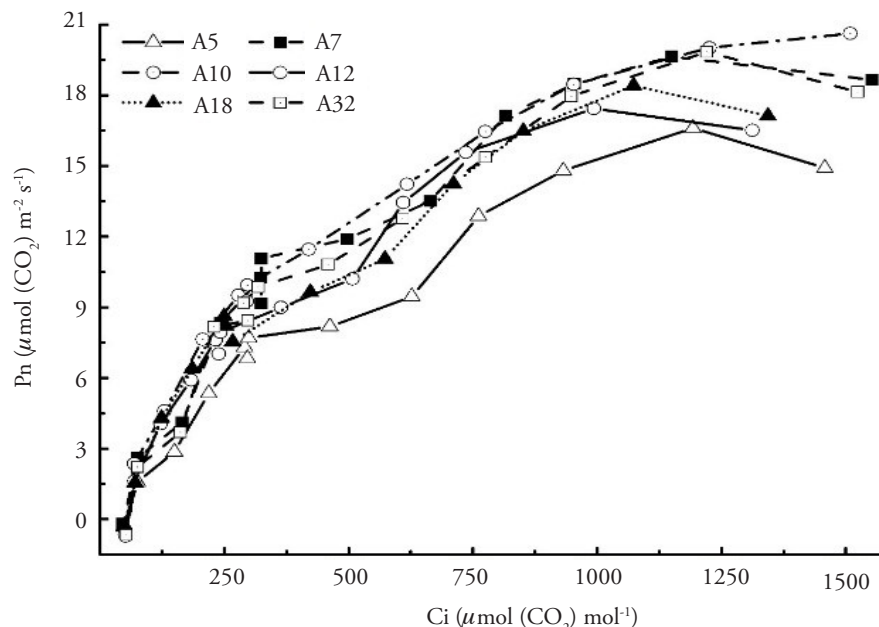


Figure 6. Measured Pn-Ci curves of different ages *Caragana intermedia* (Pn-net photosynthetic rate, PAR-photosynthetically active radiation).

Figura 6. Curvas Pn-Ci medidas de diferentes edades de *Caragana intermedia* (Pn-tasa fotosintética neta, PAR-radiación fotosintéticamente activa).

leaf photosynthesis, and the value is the maximum net photosynthetic rate under the CO₂ concentration. When the CO₂ concentration continued to increase, Pn began to decrease indicating that high CO₂ concentration restricted the photosynthesis. The Pn-Ci curve of A5 was significantly lower than others, and CO₂ response curves of different age plants ranked A10 > A7 > A32 > A18 > A10 > A5. And the determination coefficients of the rectangular hyperbola were smaller than those of the modified rectangular hyperbola. The CE, Amax, CCP and Rp calculated by the modified rectangular hyperbola were lesser, while the CSP was much higher than that of rectangular hyperbola.

The Pn-Ci response curves of different age plants were well described by modified rectangular hyperbola comprehensively comparing two models combining the measured data (Table 5). The simulation results were basically the same as the measured results. The Pn-Ci curve of A5 leaves was significantly lower than others, as well as the slope of the curve when Ci < 750 μmol mol⁻¹, which was coupled with CE and Pmax were lower than those of others, while the slope of the Pn-Ci curve of A12 was significantly higher than those of others and consistent with the higher CE.

luz tenue disponible fue mayor que en otros casos. La Rd puede representar la intensidad metabólica de las hojas, y la Rd de A10 fue significativamente menor que en las otras plantaciones, lo cual indica que las plantas que desarrollaron actividades vitales particulares requirieron menos energía, por eso la Pmax de A10 no fue la menor de todas las plantaciones.

Curva de respuesta al CO₂

Las curvas de Pn-Ci de *C. intermedia* a diferentes edades mostraron la misma tendencia (Figura 6 A). Cuando Ci < 300 μmol mol⁻¹, Pn aumentó con el incremento de Ci y la curva Pn-Ci fue una línea casi recta. Cuando Ci > 300 μmol mol⁻¹, la pendiente de la curva Pn-Ci se redujo con el aumento lento de Pn. La Pn se mantuvo prácticamente sin cambios después de haber alcanzado cierto valor, lo cual indica que el CO₂ no fue el factor principal que influyó sobre la fotosíntesis foliar, y el valor es la tasa fotosintética neta máxima bajo esa concentración de CO₂. Cuando la concentración de CO₂ continuó aumentando, la Pn comenzó a reducirse, significa que una concentración alta de CO₂ restringió la fotosíntesis. La curva de Pn-Ci para A5 fue significativamente menor que otras y

Table 5. Model fitting results of CO₂ response curves for different ages *C. intermedia* (Amax - the maximum net photosynthetic rate, CE - initial carboxylation efficiency, photorespiration rate (Rp), LCP- light compensation point, CSP - CO₂ saturation point, CCP - CO₂ compensation point, R²- correlation coefficient).

Cuadro 5. Resultados del ajuste de modelos de curvas de respuesta al CO₂ de *C. intermedia* por edades (Amax - tasa fotosintética neta máxima, CE - eficiencia inicial de carboxilación, tasa de fotorrespiración (Rp), LCP- punto de compensación lumínica, CSP - punto de saturación de CO₂, CCP - punto de compensación de CO₂, R²- coeficiente de determinación).

Age	Model	CE	Amax	CSP	CCP	Rp	R ²
A5	Rectangular hyperbola	0.046	25.258	873.87	43.203	1.848	0.958
	Modified rectangular hyperbola	0.038	16.78	1720.802	31.859	1.279	0.959
A7	Rectangular hyperbola	0.074	29.661	720.494	38.24	2.821	0.958
	Modified rectangular hyperbola	0.054	19.401	1522.391	28.393	1.759	0.962
A10	Rectangular hyperbola	0.073	26.341	686.746	44.541	3.007	0.957
	Modified rectangular hyperbola	0.054	19.872	1837.312	38.816	1.992	0.959
A12	Rectangular hyperbola	0.082	30.9	753.589	35.621	2.987	0.984
	Modified rectangular hyperbola	0.076	26.092	1272.214	37.437	2.735	0.983
A18	Rectangular hyperbola	0.061	26.871	714.195	37.316	2.039	0.959
	Modified rectangular hyperbola	0.049	22.034	1279.154	27.34	1.231	0.959
A32	Rectangular hyperbola	0.069	28.904	715.168	51.336	3.142	0.965
	Modified rectangular hyperbola	0.056	20.877	1504.955	44.058	2.287	0.967

The photosynthesis of plant leaves is carried out by intracellular chloroplasts. The photosynthesis efficiency is restricted by Rubisco (Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase) activity and RuBP (Ribulose-1, 5-bisphosphate) in chloroplasts regeneration. It is generally believed that the CE of plant leaves is promoted when the activity of Rubisco elevates (Björkman, 1981). CE and Amax both increased first and then decreased as the plants grew in the study. A relatively slow-growth curve phase appeared after the initial linear increase in the Pn-Ci curve, indicating that plant leaf photosynthesis converted from the initial Rubisco enzyme activity limitation to the RuBP regeneration limitation. The CCP and Rp of A10 were high, indicating that the minimum amount of CO₂ absorbed by plants for organic matter accumulation was high, as well as the respiration under light conditions and energy consumption, so that LSP of A10 is the highest in all stands with the most widely available CO₂ and lower Amax.

CONCLUSIONS

The utilization efficiency of light energy in the leaves of *C. intermedia* decreases first and then increases with the growth of the plants, while the utilization efficiency of CO₂ increased first and then decreased. Plant photosynthesis response

curvas de respuesta al CO₂ de plantas de diferentes edades se ordenaron así: A10 > A7 > A32 > A18 > A10 > A5. Los coeficientes de determinación por hipérbola rectangular fueron menores a los obtenidos por hipérbola rectangular modificada. CE, Amax, CCP y Rp calculados por hipérbola modificada fueron menores, mientras que CSP fue mucho mayor que su valor obtenido por hipérbola rectangular.

Las curvas de respuesta Pn-Ci para edades de planta diferentes quedaron bien descritas por hipérbolas rectangulares modificadas, al comparar exhaustivamente dos modelos que combinan los datos medidos (Cuadro 5). Los resultados de la simulación fueron básicamente los mismos que los resultados medidos. La curva Pn-Ci en las hojas de A5 fue significativamente menor a las demás, al igual que la pendiente de la curva cuando Ci < 750 μmol mol⁻¹. Esto coincidió con que CE y Pmax fueron menores a los de las otras plantaciones, mientras que la pendiente de la curva Pn-Ci en A12 fue significativamente mayor que las de otras y consistente con la CE más alta.

La fotosíntesis en las hojas la realizan los cloroplastos intracelulares. La eficiencia de la fotosíntesis está restringida por la actividad de Rubisco (Ribulosa-1, 5-bifosfato carboxilasa) y RuBP (Ribulosa-1, 5-bifosfato) por la regeneración de los cloroplastos. En términos generales, se cree que la CE de las plantas se promueve cuando la actividad de la Rubisco se eleva (Björkman, 1981). Tanto CE como Amax

to environmental changes change from passive physical defense to a biochemical defense initiative, physiologically reducing the damage caused by environment.

Daily water potential of *C. intermedia* decreased then increased. And water potential had a strong negative correlation with the photosynthetically active radiation. The ability of plants to obtain water from the soil enhanced as plants grew. Also, plants water consumption as well as water absorption capacity increased to resist the external environment along with the increase of light, which expresses the adaptability of plant growth.

LITERATURE CITED

- Acevedo, R. M., S. J. Maiale, S. C. Pessino, R. Bottini, O. A. Ruiz, and P. A. Sansberro. 2013. A succinate dehydrogenase flavoprotein subunit-like transcript is upregulated in *Ilex paraguariensis* leaves in response to water deficit and abscisic acid. *Plant Physiol. and Biochem.* 65: 48 - 54.
- Ahumada-Orellana, L. E., S. Ortega-Farías, P. S. Searles, and J. B. Retamales. 2017. Yield and water productivity responses to irrigation cut-off strategies after fruit set using stem water potential thresholds in a super high-density olive orchard. *Frontiers in Plant Sci.* 8: 1280.
- Björkman O. 1981. Responses to different quantum flux densities. In: Lange, O. L., P. S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Ziegler (eds). *Physiological Plant Ecology I: Responses to the Physical Environment*. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg. pp: 57-107.
- Boyle, R. K. A., M. McAinsh, and Ian C. Dodd. 2016. Daily irrigation attenuates xylem abscisic acid concentration and increases leaf water potential of *Pelargonium × hortorum* compared with infrequent irrigation. *Physiol. Plantarum.* 158: 23 - 33.
- Chen Y. J., J. Yu, and H. Bingru. 2015. Effects of elevated CO₂ concentration on water relations and photosynthetic responses to drought stress and recovery during rewatering in tall fescue. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 140: 19 - 26.
- Ferraz T. M., W. P. Rodrigues, A. T. Netto, F. O. Reis, A. L. Peçanha, F. A. M. M. Figueiredo, E. F. Sousa, D. M. Glenn, and E. Campostrini. 2016. Comparison between single-leaf and whole-canopy gas exchange measurements in papaya (*Carica papaya* L.) plants. *Sci. Hortic.* 209: 73 - 78.
- Grzesiak, S., M. T. Grzesiak, T. Hura, I. Marcińska, and A. Rzepka. 2013. Changes in root system structure, leaf water potential and gas exchange of maize and triticale seedlings affected by soil compaction. *Environ. and Exp. Botany.* 88: 2 - 10.
- Guo W., B. Li, X. Zhang, and R. Wang. 2010. Effects of water stress on water use efficiency and water balance components of *Hippophae rhamnoides* and *Caragana intermedia* in the soil-plant-atmosphere continuum. *Agroforestry Syst.* 80: 423 - 435.
- Huang M., S. Piao, Z. Zeng, S. Peng, P. Ciais, L. Cheng, J. Mao, B. Poulter, X. Shi, Y. Yao, H. Yang, and Y. Wang.

aumentaron primero y luego se redujeron a medida que las plantas en estudio maduraron. Una fase de curva de crecimiento relativamente lento apareció después del aumento lineal inicial en la curva Pn-Ci, lo cual indica que la fotosíntesis foliar pasó de ser una limitante para la actividad enzimática de Rubisco, a ser una limitación para la regeneración de RuBP. CCP y Rp de A10 fueron elevados, significa que la cantidad mínima de CO₂ absorbido por plantas para la acumulación en estructuras orgánicas fue alta, así como la respiración bajo condiciones de luz y el consumo de energía, por lo tanto, el LSP en A10 fue el más alto de todos, con la cantidad mayor de CO₂ disponible y Amax menor.

CONCLUSIONES

La eficiencia en el uso de energía lumínica en las hojas de *C. intermedia* disminuye, primero, y luego aumenta a medida que crecen las plantas, mientras que la eficiencia de uso de CO₂ aumenta al principio y después disminuye. La respuesta en la fotosíntesis de las plantas a los cambios ambientales cambia de una defensa física pasiva hasta una iniciativa de defensa bioquímica, lo cual reduce de manera fisiológica los daños causados por el ambiente.

El potencial hídrico diario de *C. intermedia* disminuyó y después aumentó. Y el potencial hídrico mostró una correlación negativa fuerte con la radiación fotosintéticamente activa. La capacidad de las plantas para obtener agua del suelo aumentó conforme las plantas maduraron. Además, el consumo de agua de las plantas y su capacidad de absorción de agua aumentaron para resistir el ambiente externo, en conjunción con el aumento de luz, lo cual expresa la adaptabilidad en el crecimiento de las plantas.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

2016. Seasonal responses of terrestrial ecosystem water-use efficiency to climate change. *Global Change Biol.* pp: 2165 - 2177.
- Jiang H., and D. Xu. 2000. Physiological basis of the difference in net photosynthetic rate of leaves between two maize strains. *Photosynthetica* 38:199-204.

- Kenzo T., R. Yoneda, and I. Ninomiya. 2017. Seasonal changes in photosynthesis and starch content in Japanese fir (*Abies firma* Sieb. et Zucc.) saplings under different levels of irradiance. *Trees* pp:1-11.
- Klein, T. 2014. The variability of stomatal sensitivity to leaf water potential across tree species indicates a continuum between isohydric and anisohydric behaviours. *Funct. Ecol.* 28: 1313-1320.
- Li Q., Y. Wang, Y. Zhu, H. Li, Z. Jia, and H. Liu. 2014. Effects of soil improvement of *Caragana intermedia* plantations in alpine sandy land on Tibet Plateau. *Acta Ecol. Sinica.* 34:123-221.
- Liu B., W. Zhao, and Z. Wen. 2012. Photosynthetic response of two shrubs to rainfall pulses in desert regions of northwestern China. *Photosynthetica* 50:109-119.
- Maricle, B. R., and P. B. Adler. 2011. Effects of precipitation on photosynthesis and water potential in *Andropogon gerardii* and *Schizachyrium scoparium* in a southern mixed grass prairie. *Environ. and Exp. Bot.* 72: 223-31.
- Othman, Y., C. Steele, D.n VanLeeuwen, R. Heerema, S. Bawazir, and R. St. Hilaire. 2014. Remote sensing used to detect moisture status of pecan orchards grown in a desert environment. *Int. J. of Rem. Sens.* 35: 949-66.
- Tomás, M., H. Medrano, A. Pou, J. M. Escalona, S. Martorell, M. Ribas-Carbó, J. Flexas. 2012. Water-use efficiency in grapevine cultivars grown under controlled conditions: effects of water stress at the leaf and whole-plant level. *Austral. J. of Grape and Wine Res.* 18: 164-172.
- Van Zyl J. 2017. Diurnal variation in grapevine water stress as a function of changing soil water status and meteorological conditions. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 8:45-52.
- Wang, H., H. Guan, Z. Deng, and C. T. Simmons. 2014. Optimization of canopy conductance models from concurrent measurements of sap flow and stem water potential on Drooping Sheoak in South Australia. *Water Resources Res.* 50: 6154-67.
- Zha T., Y. Wu, X. Jia, M. Zhang, Y. Bai, P. Liu, J. Ma, P. A. Bourque, and H. Peltola. 2017. Diurnal response of effective quantum yield of PSII photochemistry to irradiance as an indicator of photosynthetic acclimation to stressed environments revealed in a xerophytic species. *Ecol. Indic.* 74:191-197.

METALES PESADOS, ARSÉNICO Y BORO EN AGUA DE RIEGO SUBTERRÁNEA EN ZACOALCO DE TORRES Y AUTLÁN DE NAVARRO, JALISCO

HEAVY METALS, ARSENIC AND BORON IN UNDERGROUND IRRIGATION WATER OF ZACOALCO DE TORRES AND AUTLÁN DE NAVARRO, JALISCO

Oscar Raúl **Mancilla-Villa**¹, Blanca Noemy **Anzaldo-Cortes**², Rubén Darío **Guevara-Gutiérrez**², Omar **Hernández-Vargas**², Héctor Manuel **Ortega-Escobar**³, Héctor **Flores-Magdalen**³, Álvaro **Can-Chulim**⁴, José Luis **Olguín-Lopez**², Isabel **Mendoza-Saldivar**⁵, Edgar Iván **Sánchez-Bernal**⁶, Elia **Cruz-Crespo**⁴, Oscar Arturo **Barreto-García**²

¹Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara; Avenida Independencia Nacional # 151. 48900, Autlán de Navarro, Jalisco, México. (oscar.mancilla@academicos.udg.mx). ²Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa Sur, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Avenida Independencia Nacional # 151, Autlán de Navarro, Jal. 48900. ³Hidrociencias. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México, México. ⁴Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. 63155. Xalisco, Nayarit, México. ⁵Instituto Tecnológico Superior del Oriente del Estado de Hidalgo ITESA; Carretera Apan-Tepeapulco, Las Peñitas, 43900 Apan, Hidalgo. ⁶Departamento de Ecología, Universidad del Mar. Ciudad Universitaria. 70902. Puerto Ángel, Pochutla, Oaxaca, México.

RESUMEN

Las concentraciones altas de metales pesados en aguas subterráneas utilizadas para el riego tienen el potencial de causar daños fisiológicos en los cultivos agrícolas, disminuir la calidad y el rendimiento de las cosechas. Además hay efectos en la salud humana por el consumo de productos contaminados. El objetivo de esta investigación fue determinar la concentración de Cd, Hg, Pb, As y B en el agua subterránea de uso agrícola en los municipios de Autlán de Navarro y Zacoalco de Torres, Jalisco, México, ambos con una gran actividad agrícola. El estudio se realizó de febrero a abril y de agosto a noviembre de 2017, y se analizaron 24 muestras de agua subterránea por temporada. Las evaluaciones fueron: potencial de hidrogeno (pH) y la conductividad eléctrica (C.E.); cuantificación de los metales pesados cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb) y el metaloide arsénico (As); contenido de boro (B) en el agua subterránea dada su importancia nutricional y tóxica. Los metales pesados se determinaron con la técnica de espectrometría de emisión atómica. Las concentraciones encontradas se compararon con los lineamientos de la NOM-001-ECOL-1996. En promedio la conductividad eléctrica fue $665 \mu\text{S cm}^{-1}$ y el pH 7.7, valores que no representan restricción en cuanto al uso del agua en riego agrícola. En los metales pesados el Hg excedió en 100% de las muestras los límites máximos

ABSTRACT

The high concentrations of heavy metals in groundwater used for irrigation have the potential of causing physiological damage in agricultural crops, as well as reducing the quality and yield of harvests. Furthermore, there are effects on human health due to the consumption of contaminated products. The objective of the present study was to determine the concentration of Cd, Hg, Pb, As and B in the groundwater for agricultural use in the municipalities of Autlán de Navarro and Zacoalco de Torres, Jalisco, Mexico, both with high agricultural activity. The study was conducted from February to April and from August to November of 2017, and 24 samples of groundwater were analyzed per season. The evaluations were as follows: potential of hydrogen (pH) and electric conductivity (C.E.); quantification of the heavy metals cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb) and the metalloid arsenic (As); content of boron (B) in the groundwater given its nutritional and toxic importance. The heavy metals were determined by atomic emission spectrometry and the concentrations found were compared with the guidelines of the NOM-001-ECOL-1996. On the average, electric conductivity was $665 \mu\text{S cm}^{-1}$ and the pH 7.7, values that do not represent restriction with respect to the use of agricultural irrigation water. In the heavy metals, the Hg exceeded in 100% of the samples the maximum limits established with an average concentration of 0.14 mg L^{-1} , the metalloid As exceeded in 16% of the samples the maximum limit with an average concentration of 0.13 mg L^{-1} , but Cd, Pb and B did not surpass the values established as

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.
Recibido: Mayo, 2020. Aprobado: Septiembre, 2020.
Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 995-1007. 2020.

establecidos con una concentración promedio de 0.14 mg L^{-1} , el metaloide As excedió en 16% de las muestras el límite máximo con una concentración promedio de 0.13 mg L^{-1} , pero Cd, Pb y B no superaron los valores establecidos como límite permisible para el uso del agua en riego agrícola.

Palabras clave: agricultura, calidad de agua, toxicología, elementos tóxicos.

INTRODUCCIÓN

Para la agricultura de riego la calidad del agua es muy importante, porque de esto depende la obtención de buenos resultados en la cosecha. En las aguas de riego se analizan las concentraciones iónicas, concentraciones de sales, conductividad eléctrica, etc. El análisis de metales pesados es de suma importancia dada su estrecha relación con el desarrollo fisiológico de las plantas, porque hay evidencia de que la presencia de estos elementos tóxicos afecta la germinación, el desarrollo de los cultivos, el rendimiento y la calidad de las cosechas (Olivares *et al.*, 2013). La evaluación de las concentraciones de metales pesados en el agua subterránea es importante porque estos metales son parte de la corteza terrestre, en forma de rocas o minerales, y no se pueden degradar mediante procesos biológicos o físicos, son bioacumulables y con alta toxicidad, lo cual causa problemas ambientales y de salud humana (Bautista *et al.*, 2017).

Los metales más analizados en diferentes matrices ambientales (agua, suelo, biota) son: plomo (Pb), arsénico (As), cadmio (Cd) y mercurio (Hg), que pueden introducirse a los mantos freáticos y contaminar las aguas subterráneas utilizadas en riego agrícola. Los metales proceden desde desechos industriales, vertederos de aguas urbanas sin tratamiento, lixiviados de basureros, y desde los campos agrícolas donde se utilizan herbicidas y pesticidas. Estos elementos tóxicos en las aguas subterráneas usadas para riego agrícola pueden acumularse en los suelos, y por su naturaleza no biodegradable ingresan a las plantas por medio de las raíces, lo que propicia riesgo de toxicidad y afectaciones en el desarrollo fisiológico; la consecuencia es una disminución de los rendimientos de la cosecha y la calidad de los productos (Reyes *et al.*, 2016).

Las plantas poseen mecanismos especializados en acumular, absorber y translocar sustancias, ya que los metales pesados son equivalentes químicamente a los

permisible limit for the use of water in agricultural irrigation.

Key words: agriculture, water quality, toxicology, toxic elements

INTRODUCTION

For irrigation agriculture, water quality is very important, because obtaining good results in harvest depends on it. In irrigation water, analyses are carried out of ionic concentrations, salt concentrations, electric conductivity, etc. The analysis of heavy metals is of vital importance because of its close relationship with the physiological development of the plants, given that there is evidence that the presence of these toxic elements affects the germination, crop development, yield and quality of harvests (Olivares *et al.*, 2013). The evaluation of the heavy metals concentrations in groundwater is important, because these metals are part of the earth's crust, in the form of rocks or minerals, and they cannot be degraded through biological or physical processes, they are bio-accumulable and with high toxicity, which causes problems for the environment and human health (Bautista *et al.*, 2017).

The metals most analyzed in different environmental matrices (water, soil, biota) are: lead ((Pb), arsenic (As), cadmium (Cd) and mercury (Hg), which can be introduced to the groundwater and contaminate the underground water used in agricultural irrigation. The metals proceed from industrial waste, untreated urban waste water, lixiviates from garbage dumps, and from agricultural fields where herbicides and pesticides are used. These toxic elements in the groundwater used for agricultural irrigation can accumulate in the soils, and due to their non-biodegradable nature, enter plants by means of the roots, which propitiates risk of toxicity and impact on physiological development; the consequence is a reduction in yields of the crops and in quality of the products (Reyes *et al.*, 2016).

Plants have mechanisms that are specialized in accumulating, absorbing and translocating substances, given that the heavy metals are chemically equivalent to the nutrients that they normally absorb. The heavy metals enter the trophic chain in plants irrigated with contaminated water. By their nature, the metals are not biodegradable and bioaccumulate in the tissues of organisms, causing chronic toxic effects (Reyes *et al.*, 2016).

nutrientes que absorben de manera normal. Los metales pesados ingresan a la cadena trófica en las plantas irrigadas con aguas contaminadas. Por su naturaleza los metales no son biodegradables y se bioacumulan en los tejidos de los organismos, lo cual causa efectos tóxicos crónicos (Reyes *et al.*, 2016).

La mayoría de las aguas superficiales contienen cantidades aceptables de boro (B), pero las aguas de los pozos profundos en algunas áreas contienen cantidades tóxicas (Can-Chulim, 2011). Este elemento entra a las aguas superficiales y subterráneas a través de dos vías: el intemperismo de rocas que contienen B (borosilicatos del tipo turmalina y axinita), y aguas residuales (Mancilla-Villa *et al.*, 2014). El B es un elemento esencial pero tóxico para las plantas cuando excede apenas ligeramente el nivel óptimo; los límites establecidos de tolerancia al B aplican para varios cultivos, por lo cual se proponen intervalos de toxicidad para: 1) cultivos sensibles ($< 0.33 \text{ mg L}^{-1}$); 2) cultivos semitolerantes ($< 0.67 \text{ mg L}^{-1}$); y 3) cultivos tolerantes ($< 1.00 \text{ mg L}^{-1}$) (Mancilla-Villa *et al.*, 2014).

En los municipios de Autlán de Navarro y Zacoalco de Torres, estado de Jalisco, México, existe una alta actividad agrícola y los cultivos principales son caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays*) y hortalizas. Esta actividad es muy importante para la economía de las dos regiones y municipios estudiados. Además del agua de riego superficial, se utiliza agua subterránea para irrigar los campos de cultivo. El objetivo de este estudio fue determinar las concentraciones de los metales pesados: plomo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg), el metaloide arsénico (As) y boro (B) en el agua subterránea, así como definir el riesgo de utilizar esa agua para regar los campos agrícolas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

El municipio de Zacoalco de Torres está en el sureste del estado de Jalisco, en $20^{\circ} 01' 30''$ a $20^{\circ} 21' 05''$ N y $103^{\circ} 30' 30''$ a $103^{\circ} 41' 25''$ O, a una altitud promedio de 1354 m; el clima es semiárido cálido con precipitación media anual de 828 mm y temperatura promedio anual de 20.2°C (CEA, 2015) (Figura 1). El municipio de Autlán de Navarro está en el suroeste del estado, en $19^{\circ} 34' 30''$ a los $19^{\circ} 53' 45''$ N, y $104^{\circ} 07' 00''$ a $104^{\circ} 27' 35''$ O; su clima es semiseco y semicálido con precipitación media de 719.9 mm, temperatura media anual de 23.5°C , y una

Most of the surface water contains acceptable amounts of boron (B), but the waters of the deep wells in some areas contain toxic amounts (Can-Chulim, 2011). This element enters the surface and underground water in two ways: the weathering of rocks that contain B (borosilicates of the types tourmaline and axinite) and waste water (Mancilla-Villa *et al.*, 2014). Boron is an essential element, but toxic for plants when it even slightly exceeds the optimal level; the established limits of tolerance to B apply to a variety of crops, thus intervals of toxicity are proposed for: 1) sensitive crops ($< 0.33 \text{ mg L}^{-1}$); 2) semi-tolerant crops ($< 0.67 \text{ mg L}^{-1}$); and 3) tolerant crops ($< 1.00 \text{ mg L}^{-1}$) (Mancilla-Villa *et al.*, 2014).

In the municipalities of Autlán de Navarro and Zacoalco de Torres, state of Jalisco, Mexico, there is high agricultural activity, and the principal crops are sugar cane (*Saccharum officinarum*), maize (*Zea mays*) and vegetables. This activity is very important for the economy of the two regions and municipalities studied. In addition to surface irrigation water, groundwater is used to irrigate the field crops. The objective of the present study was to determine the concentrations of the heavy metals: lead (Pb), cadmium (Cd), mercury (Hg), the metalloid arsenic (As) and boron (B) in the groundwater, as well as to define the risk of utilizing this water to irrigate agricultural fields.

MATERIALS AND METHODS

Description of the study area

The municipality of Zacoalco de Torres is in the southeast of the state of Jalisco, at $20^{\circ} 01' 30''$ to $20^{\circ} 21' 05''$ N and $103^{\circ} 41' 25''$ to $103^{\circ} 30' 30''$ W, at an average altitude of 1354 m; the climate is warm semiarid with mean annual precipitation of 828 mm and average annual temperature of 20.2°C (CEA, 2015) (Figure 1). The municipality of Autlán de Navarro is located in the southwest of the state, at $19^{\circ} 34' 30''$ to $19^{\circ} 53' 45''$ N, and $104^{\circ} 27' 35''$ W; its climate is semidry and semi-warm with mean rainfall of 719.9 mm, mean annual temperature of 23.5°C , and an average altitude of 920 m (CEA, 2015). The study zone was comprised of phaeozems, regosols and cambisols; although in a lesser proportion of vertisols, luvisols and lithosols. The origin of these soils is due to the presence of extrusive igneous rock, alluvial soils, rhyolite limestone rock, andesite and basalt, among others (CONAGUA, 2018).

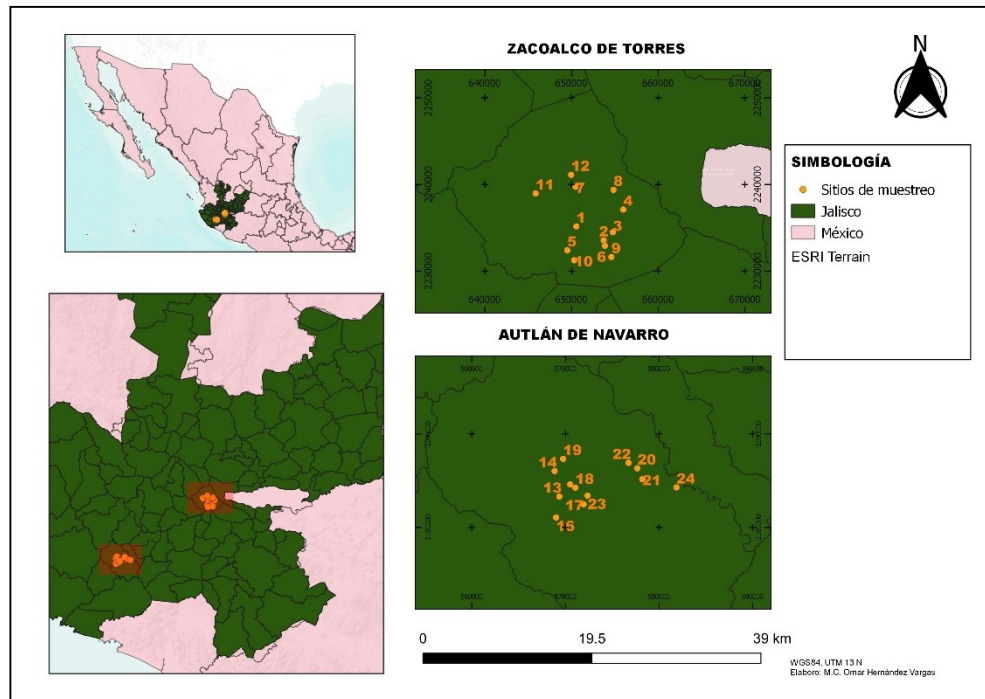


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en los municipios de Autlán de Navarro y Zacoalco de Torres.
Figure 1. Geographic location of sampling sites in the municipalities of Autlán de Navarro and Zacoalco de Torres.

altitud promedio de 920 m (CEA, 2015). La zona de estudio se conforma por suelos feozems, regosoles y cambisoles; aunque en menor proporción se presentan los vertisoles, luvisoles y litosoles. El origen de estos suelos se debe a la presencia de roca ígnea extrusiva, suelos aluviales, roca caliza riolita, andesita y basalto, entre otros (CONAGUA, 2018).

En el estudio se analizaron 24 pozos de agua, 12 en el municipio de Zacoalco de Torres y los demás se distribuyen en el municipio de Autlán de Navarro. Los pozos seleccionados en el municipio de Zacoalco de Torres están en un área en la cual se cultiva alfalfa (*Medicago sativa*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), aguacate (*Persea americana*), zarzamora (*Rubus fruticosus*), arándano (*Vaccinium myrtillus*), higo (*Ficus carica*) y limón (*Citrus limon*); en el municipio de Autlán de Navarro los pozos se distribuyen en su mayoría sobre el valle donde se desarrolla el cultivo de caña de azúcar, hortalizas y maíz.

Muestreo y análisis

Por temporada se seleccionaron 24 sitios, 12 en Zacoalco de Torres y 12 en Autlán de Navarro. Estos sitios se eligieron por ser pozos de agua subterránea destinada para riego agrícola, y la información de ellos se obtuvo de las capas de aprovechamientos subterráneos inscritos en el Registro Público de Derechos de

An analysis was made of 24 water wells, 12 in the municipality of Zacoalco de Torres, and the others were distributed in the municipality of Autlán de Navarro. The wells selected in the municipality of Zacoalco de Torres are in an area of cultivation of alfalfa (*Medicago sativa*), sugar cane (*Saccharum officinarum*), avocado (*Persea americana*), blackberry (*Rubus fruticosus*), bilberry (*Vaccinium myrtillus*), fig (*Ficus carica*) and lemon (*Citrus limón*); in the municipality of Autlán de Navarro, most of the wells are distributed over a valley where sugar cane, garden vegetables and maize are grown.

Sampling and analysis

Per season, 24 sites were selected, 12 in Zacoalco de Torres and 12 in Autlán de Navarro. These sites were chosen for being wells of groundwater destined for agricultural irrigation, and the information pertaining to them was obtained from the layers of underground deposits registered in the Registro Público de Derechos de Agua (Public Registry of Water Rights) (REPDA) and from the Sistema de Información Geográfica del Agua (Geographic Water Information System) (SIGA) obtained from CONAGUA (2015). All of the sites were geo-referenced by means of GPS Garmín MAP 60, which was also used to establish the approximate altitude of each site (Figure 1).

Agua (REPDA) y a través del Sistema de Información Geográfica del Agua (SIGA) obtenidos de CONAGUA (2015). Todos los sitios se georreferenciaron mediante un GPS Garmín MAP 60, el cual también se usó para establecer la altitud aproximada de cada sitio (Figura 1).

Dos muestreos de tipo probabilístico dirigido se realizaron; es decir, los sitios se seleccionaron por sus características funcionales (pozos de agua subterránea destinada para riego agrícola); de febrero a abril y de agosto a noviembre en 2017. Para recolectar las muestras se utilizaron frascos de polietileno de alta densidad y de 500 mL, cada muestra se recolectó por duplicado y se analizó por triplicado; a cada una se le agregó ácido nítrico concentrado (pH < 2), se colocaron en hieleras para su transporte (Mancilla-Villa *et al.*, 2017), y en cada envase se colocó una etiqueta con la fecha, nombre y localización del sitio. Después, en los laboratorios del Centro Universitario de la Costa Sur (CUCSUR) de la Universidad de Guadalajara y en el Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, se determinó pH y conductividad eléctrica (Ortiz-Vega *et al.*, 2019), metales pesados, As y B (Mancilla-Villa *et al.*, 2012).

La determinación de los metales pesados Cd, Hg, Pb y el metaloide As se realizó con la técnica de espectrometría de emisión atómica con el ICP Perkin Elmer 5300 Óptima. Los límites de cuantificación para los metales fueron: Cd (5.0), Hg (0.024), Pb (8.0) y As (1.5) $\mu\text{g L}^{-1}$. Los valores de recuperación obtenidos en las muestras fortificadas en agua desionizada fueron: Cd 100.35%, Hg 106.15%, Pb 96.93% y As 109.1%, y están dentro del intervalo recomendado y cercanos a 100% (Mancilla-Villa *et al.*, 2011).

Para evaluar la calidad del agua subterránea, así como definir el riesgo de su utilización, se tomaron como referencia los criterios de la NOM-001-SEMARNAT-1996, que establecen los límites máximos permisibles para metales pesados contenidos en el agua para uso agrícola y urbano (Cuadro 1). El análisis estadístico se realizó con ANDEVA ($p \leq 0.05$) en el programa SPSS v. 25.0; así como la comparación de las medias de las variables analizadas con la prueba de Tukey entre las dos temporadas de muestreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ANDEVA mostró efecto significativo ($p \leq 0.05$) sólo en la variable pH (Cuadro 2) entre las variables fisicoquímicas y los metales determinados en las aguas subterráneas de los 24 sitios de muestreo.

Variables fisicoquímicas

En la Figura 2 se presentan los valores de conductividad eléctrica. El valor promedio de la C.E. en la

Two directed probabilistic samplings were made; that is, the sites were selected for their functional characteristics (groundwater wells destined for agricultural irrigation), from February to April and from August to November in 2017. To collect the samples, high density polyethylene jars of 500 mL were used, each sample was collected in duplicate and analyzed in triplicate; concentrated nitric acid (pH < 2) was added to each one. These were placed in coolers for their transport (Mancilla-Villa *et al.*, 2017), and each container was labelled with the date, name and location of the site. Later, in the laboratories of the Centro Universitario de la Costa Sur (CUCSUR) of the Universidad de Guadalajara and in the Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, pH and electric conductivity were determined (Ortiz-Vega *et al.*, 2019), along with heavy metals, As and B (Mancilla-Villa *et al.*, 2012).

The determination of the heavy metals Cd, Hg, Pb and the metalloid As was made with the technique of atomic emission spectrometry with the ICP Perkin Elmer 5300 Óptima. The limits of quantification for the metals were: Cd (5.0), Hg (0.024), Pb (8.0) and As (1.5) $\mu\text{g L}^{-1}$. The values of recovery obtained in the samples fortified in deionized water were: Cd 100.35%, Hg 106.15%, Pb 96.93% and As 109.1%, and are within the recommended interval and close to 100% (Mancilla-Villa *et al.*, 2011).

To evaluate the quality of the groundwater, and to define the risk of its use, the criteria of the NOM-001-SEMARNAR-1996 were taken as reference, which establish the maximum limits permissible for heavy metals contained in water for agricultural and urban use (Table 1). The statistical analysis was made with ANOVA ($p \leq 0.05$) in the program SPSS v. 25.0; the comparison of means of the variables was made with the Tukey test between the two sampling seasons.

RESULTS AND DISCUSSION

The ANOVA showed significant effect ($p \leq 0.05$) only in the variable pH (Table 2) between the

Cuadro 1. Límites máximos permisibles para metales pesados en agua para uso en riego agrícola.

Table 1. Maximum limits permissible for heavy metals in water for use in agricultural irrigation.

Metal (mg L^{-1})	Uso en riego agrícola		Aguas naturales
	Promedio	Diario	
As	0.2	0.4	0.05
Cd	0.2	0.4	0.01
Hg	0.01	0.02	0.002
Pb	0.5	1	0.0015

Mancilla-Villa *et al.*, 2012.

Cuadro 2. Análisis de varianza para las variables fisicoquímicas, metales pesados y boro determinados en las aguas subterráneas de Autlán de Navarro y Zacoalco de Torres, Jalisco.

Table 2. Analysis of variance for the physiochemical variables, heavy metals and boron determined in the groundwater of Autlán de Navarro and Zacoalco de Torres, Jalisco.

Parámetro	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	p≤0.05
pH	16.38	1	6.09	27.27	0.02 [†]
C.E.	2653699.47	1	9775	0.17	0.68
As	0.27	1	0.004	0.71	0.40
Cd	0.10	1	0.002	1.04	0.31
Hg	0.11	1	0.002	0.65	0.42
Pb	0.25	1	0.001	0.16	0.68
B	0.11	1	0.001	0.01	1.0

[†]Diferencia significativa (Tukey, p≤0.05). ♦ [†]Significant difference (Tukey, p≤0.05).

estación seca fue 648 $\mu\text{S cm}^{-1}$ y en la estación lluviosa 523 $\mu\text{S cm}^{-1}$ ($p > 0.05$). Estos valores no representan riesgo alguno para el uso del recurso hídrico para el riego agrícola en las regiones de estudio, porque los valores de restricción se establecen al superar los 1000 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Can-Chulim *et al.*, 2014).

En la Figura 3 se presentan los valores de pH determinados en los sitios de muestreo; en la estación seca los valores promedio fueron 7.4 y en la estación lluviosa 8.1, y las diferencias fueron significativas ($p=0.02$) entre ambas temporadas de muestreo. Estos valores se consideran de alcalinidad media (7.4-8.5) y no representan restricción en el uso del agua en riego agrícola. Para usar el recurso hídrico en el riego se

physiochemical variables and the metals determined in the groundwater of the 24 sampling sites.

Physiochemical variables

Figure 2 shows the values of electric conductivity. The average value of the C.E. in the dry season was 648 $\mu\text{S cm}^{-1}$ and in the rainy season 523 $\mu\text{S cm}^{-1}$ ($p > 0.05$). These values do not represent any risk for the use of the hydric resource for agricultural irrigation in the regions of study, because the values of restriction are established at above 1000 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Can-Chulim *et al.*, 2014).

Figure 3 presents the values of pH determined in the sampling sites; in the dry season the average

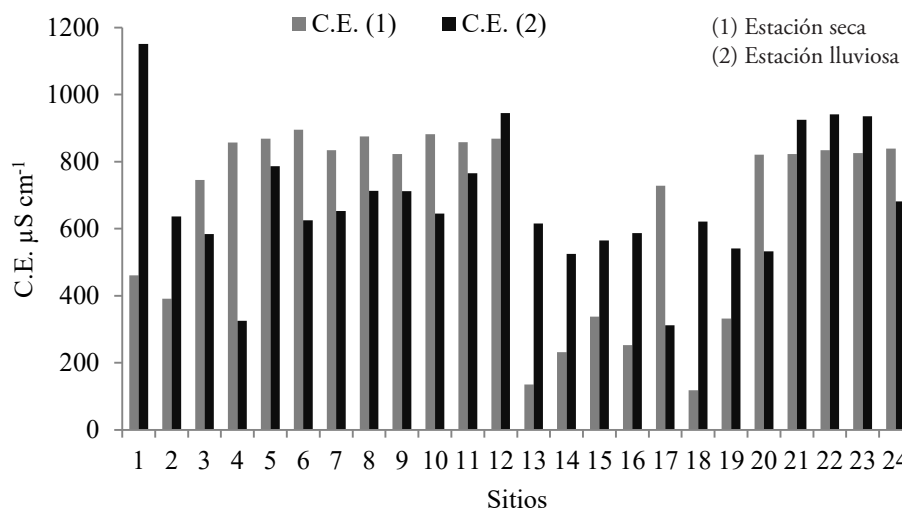


Figura 2. Valores de conductividad eléctrica por temporada de muestreo.
Figure 2. Values of electric conductivity by sampling season.

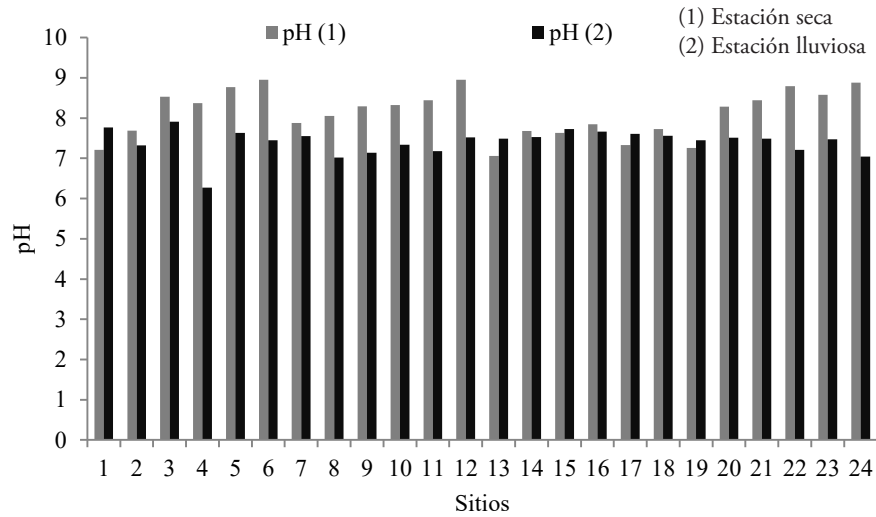


Figura 3. Valores de pH por temporada de muestreo.
Figure 3. Values of pH by sampling season.

recomiendan valores de 5.5 a 6.5, porque la mayoría de los iones estará disponible para la planta (Ortiz-Vega *et al.*, 2019).

El contenido de metales pesados en las temporadas evaluadas mostró fluctuaciones (Figura 4); el Cd

values were 7.4 and in the rainy season 8.1, and the differences were significant ($p=0.02$) between the two sampling seasons. These values are considered to be of medium alkalinity (7.4 - 8.5) and do not represent restriction in the use of agricultural irrigation water.

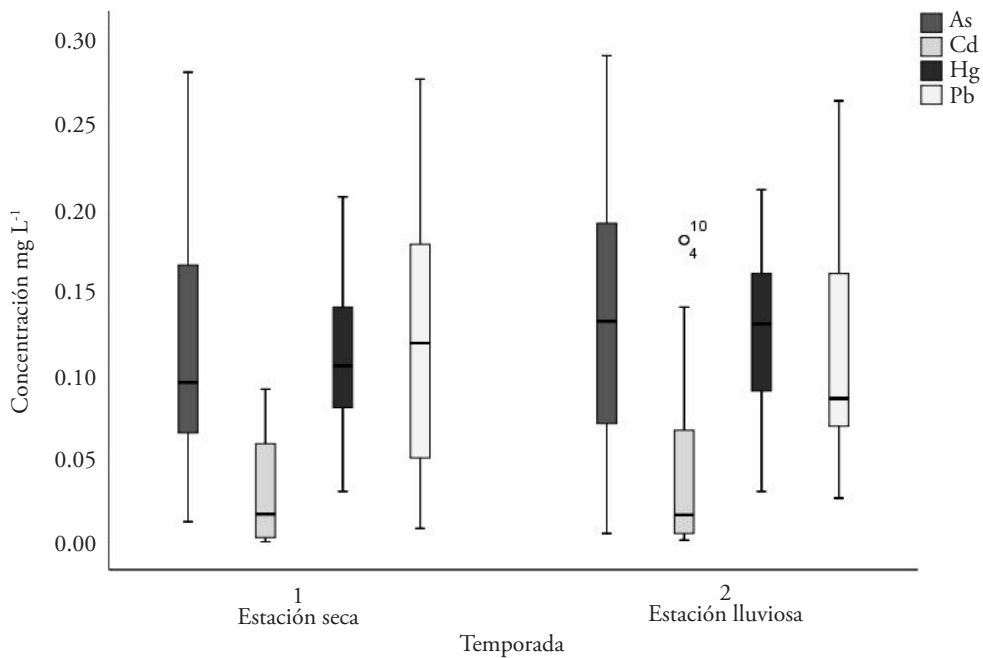


Figura 4. Diagrama de cajas (desviación estándar y cuartiles) de las concentraciones de metales pesados determinadas en las aguas subterráneas de Autlán de Navarro y Zacoalco de Torres, Jalisco.

Figure 4. Diagram of boxes (standard deviation and quartiles) of the concentrations of heavy metals determined in the groundwater of Autlán de Navarro and Zacoalco de Torres, Jalisco.

presentó los valores más bajos con un límite superior de 0.06 mg L⁻¹, en contraparte para el metaloide As los valores más altos tienen un límite superior de 0.14 mg L⁻¹. La secuencia de concentraciones de metales pesados de mayor a menor es la siguiente: As > Pb > Hg > y Cd.

Las concentraciones de As en ambas regiones de estudio variaron de 0.1 a 0.29 mg L⁻¹, sin diferencias significativas (p=0.40) entre temporadas de muestreo (Figura 5).

En el municipio de Zacoalco de Torres en la estación seca ninguna de las muestras superó el límite permisible para riego agrícola (0.2 mg L⁻¹), pero en la estación lluviosa el sitio dos rebasó el límite establecido. En el municipio de Autlán de Navarro en la estación seca, tres sitios de muestreo fueron mayores a los límites para riego agrícola.

For use of the hydric resource in irrigation, values of 5.5 to 6.5 are recommended, given that most of the ions will be available for the plant (Ortiz-Vega *et al.*, 2019).

The content of heavy metals in the seasons evaluated showed fluctuations (Figure 4); the Cd presented the lowest values with an upper limit of 0.06 mg L⁻¹, in counterpart for the metalloid As the highest values have an upper limit of 0.14 mg L⁻¹. The sequence of concentrations of heavy metals from higher to lower is as follows: As > Pb > Hg > and Cd.

The concentrations of As in both regions of study varied from 0.1 to 0.29 mg L⁻¹, without significant differences (p=0.40) between sampling seasons (Figure 5).

In the municipality of Zacoalco de Torres in the dry season, none of the samples surpassed the

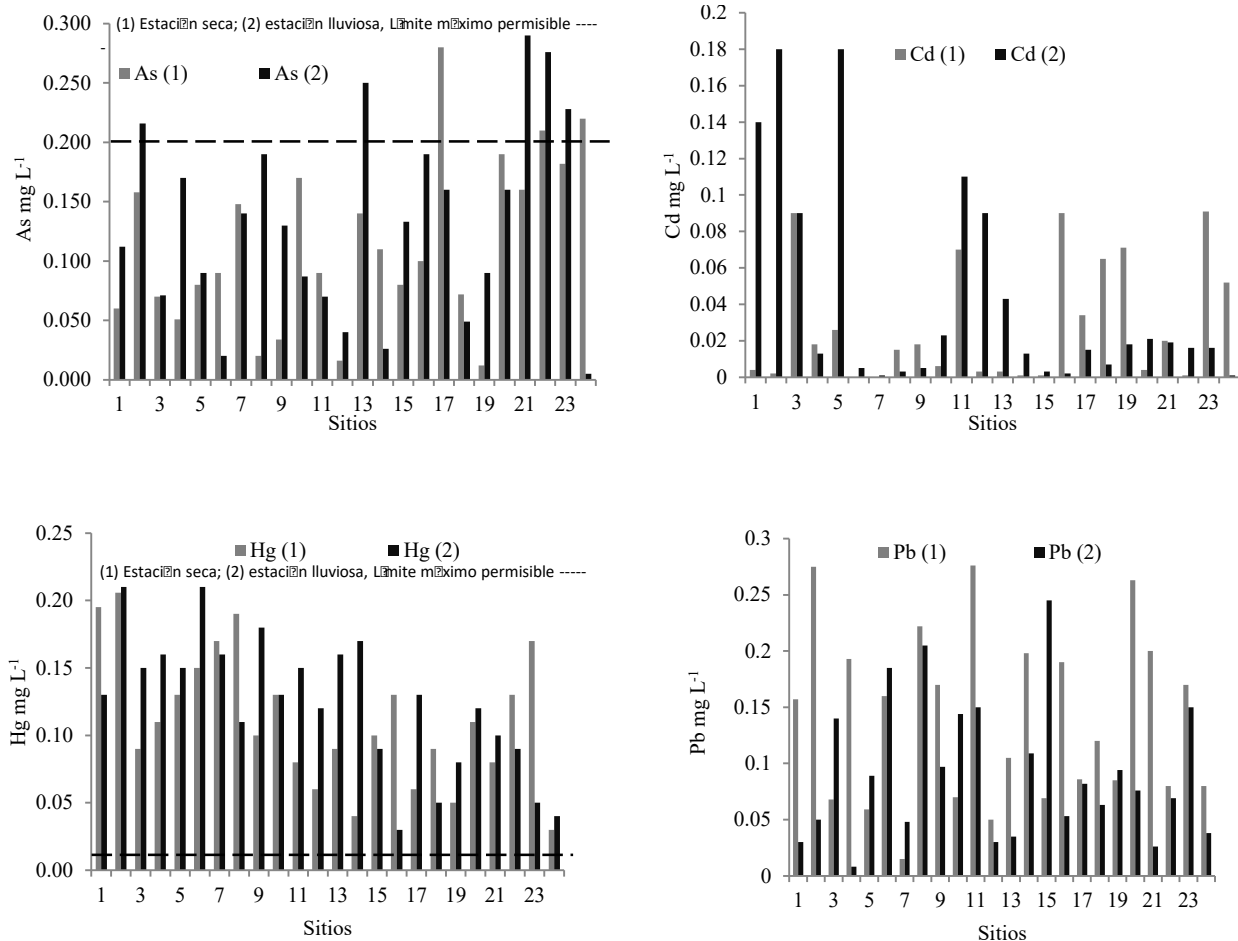


Figura 5. Concentración de metales pesados en las aguas subterráneas de los sitios muestreados.
 Figure 5. Concentration of heavy metals in the groundwater of the sampled sites.

La contaminación por As se debe de manera principal a actividades antropogénicas, es uno de los metales más distribuidos en la naturaleza y se encuentra como material de cobalto en el subsuelo y en la superficie combinado con azufre o metales, pero el principal mineral del As es el FeAsS (arsenopirita) y se usa en tratamiento de maderas y en productos agrícolas (pesticidas, herbicidas). Por lo tanto, es posible que las concentraciones y las variaciones encontradas correspondan de forma principal a la geología de las regiones de estudio y a la utilización de pesticidas y herbicidas en la agricultura (Londoño-Franco *et al.*, 2016).

En un estudio realizado en aguas subterráneas de Córdoba-Argentina por Bécher y Blarasin (2014), se encontraron concentraciones de As en el agua similares a las del presente estudio. La provincia de Córdoba exhibe problemas asociados con el recurso hídrico, entre ellos, la agricultura intensiva y el uso de pesticidas; situación muy similar a la de nuestra zona de estudio.

Las concentraciones de Cd en las dos regiones de estudio variaron de 0.01 a 0.18 mg L⁻¹, sin diferencias significativas entre temporadas de muestreo ($p=0.31$); ninguna de las muestras superó el límite permisible (0.2 mg L⁻¹). En las plantas el Cd es un metal no nutritivo que interfiere en la entrada, transporte y uso de elementos esenciales; además, se encuentra de manera natural en los suelos agrícolas de los cultivos tropicales. Las razones son la composición natural de los suelos, enmiendas y abonos provenientes de fertilizantes fosforados. El cadmio se moviliza desde el perfil del suelo a la cadena trófica a través de los cultivos y puede afectar la salud humana (Quevedo y Meneses, 2014).

Las aguas subterráneas de los municipios presentan concentraciones relativamente bajas de Cd, en comparación con sitios asociados con afluentes de contaminación minera donde las concentraciones exceden 1 mg L⁻¹. Entonces, se infiere que la contaminación por Cd en las regiones de estudio procede de los fondos geológicos, el uso de pesticidas y herbicidas, la introducción de lixiviados de rellenos sanitarios urbanos y depósito atmosférico en los suelos agrícolas debido a quemas agrícolas e incendios forestales (Cartagena *et al.*, 2018).

En un estudio en aguas subterráneas en Argentina, Espósito *et al.* (2017) reportaron concentraciones de Cd de 0.001 a 0.006 mg L⁻¹, valores bajos comparados con los de nuestro estudio, y esos autores infieren

permissible limit for agricultural irrigation (0.2 mg L⁻¹), but in the rainy season site two exceeded the established limit. In the municipality of Atlán de Navarro in the dry season, three sampling sites were above the established limits for agricultural irrigation.

Contamination by As is principally due to anthropogenic activities. It is one of the most highly distributed metals in nature and is found as material of cobalt in the subsoil and on the surface combined with sulfur or metals, but the principal mineral of the As is the FeAsS (arsenopyrite), which is used in treatment of wood and agricultural products (pesticides, herbicides). Therefore, it is possible that the concentrations and variations found correspond principally to the geology of the regions of study and to the utilization of pesticides and herbicides in agriculture (Londoño-Franco *et al.*, 2016).

In a study carried out in groundwaters of Córdoba-Argentina by Bécher and Blarasin (2014), concentrations of As were found in the water similar to those of the present study. The province of Córdoba exhibits problems associated with the hydric resource, among them, intensive agriculture and the use of pesticides; a situation very similar to that of our study zone.

The concentrations of Cd in both study regions fluctuated from 0.01 to 0.18 mg L⁻¹, with no significant differences between sampling seasons ($p=0.31$); none of the samples surpassed the permissible limit (0.2 mg L⁻¹). In plants, Cd is a non-nutritious metal that interferes in the access, transport and use of essential elements, and agricultural soils contain it naturally in the soils of the tropical crops. The reasons for this include the natural composition of the soils, amendments and fertilizers from phosphorated fertilizers. Cadmium mobilizes from the soil profile to the trophic chain through the crops and can affect human health (Quevedo and Meneses, 2014).

The groundwaters of the municipalities present relatively low concentrations of Cd, compared with sites associated with affluents of mining contamination where the concentrations exceed 1 mg L⁻¹. Therefore, it is inferred that the contamination by Cd in the regions of study proceed from the geological depths, the use of pesticides and herbicides, the introduction of lixiviates of urban waste landfills and atmospheric deposit in the agricultural soils due to agricultural burns and forest fires (Cartagena *et al.*, 2018).

In a study in groundwater in Argentina, Espósito *et al.* (2017) reported concentrations of Cd of

que tales concentraciones son de origen litológico y no derivados de alguna actividad antropogénica. En comparación con nuestra zona de estudio, los incendios forestales y las quemadas agrícolas, así como el lixiviado de rellenos sanitarios, se podrían inferir como fuentes posibles de contaminación.

Las concentraciones de Hg en ambas regiones de estudio fluctuaron de 0.03 a 0.21 mg L⁻¹ y no hubo diferencias significativas entre temporadas de muestreo ($p=0.42$), pero todas las muestras superaron el límite permisible (0.01 mg L⁻¹). El Hg se libera al ambiente como resultado de la ruptura de minerales de rocas y suelos a través de la exposición al viento y agua. Aunque gran parte del Hg se libera de manera natural, algunas actividades humanas como la aplicación de fertilizantes en la agricultura y los vertidos de aguas residuales son las responsables de su emisión hacia los suelos o el agua (Montilla-Bravo *et al.*, 2016).

Las concentraciones de Hg en cada área de estudio no se deben a la contaminación por actividades antropogénicas mineras, sino que se relacionan con la fluctuación en los valores de pH de las aguas subterráneas. En los sitios con valores de pH ácidos-neutros, las concentraciones de Hg aumentaron porque este metal se concentra y se moviliza en pH de 5 a 7. Otra causa es que 70% de las muestras se recolectaron en zonas agrícolas y se infiere que la presencia de mercurio se relaciona con el uso de fertilizantes y pesticidas (Díaz-Arriaga, 2014).

En un estudio realizado en Castellón, España, por López-Gutiérrez *et al.*, (2010), se determinó que la concentración máxima de Hg en aguas subterráneas fue 0.007 mg L⁻¹, la cual es baja en comparación con las de nuestro estudio. Esos autores señalaron que la presencia del Hg en las aguas subterráneas de Castellón no se asociaba del todo con la actividad antropogénica, sino con el origen geológico y la litología de la zona. En comparación con nuestra zona de estudio, hay fuentes posibles de contaminación como la extracción minera, el uso de pesticidas en la agricultura y la introducción de aguas residuales urbanas sin tratamiento a los cauces hídricos.

Mancilla-Villa *et al.* (2017) evaluaron el contenido de metales pesados en las aguas superficiales en la cuenca del río Ayuquila-Tuxcacuesco-Armería, Jalisco, y en 100% de las muestras las concentraciones (0.02 a 0.23 mg L⁻¹) fueron mayores a los límites permisibles para riego agrícola y uso urbano por la

0.001 to 0.006 mg L⁻¹, low values compared with those of our study, and these authors infer that these concentrations are of lithologic origin and not derived from any anthropogenic activity. In comparison with our zone of study, forest fires and agricultural burns, as well as leachates from waste landfills could be inferred as possible sources of contamination.

The concentrations of Hg in both study regions fluctuated from 0.03 to 0.21 mg L⁻¹, without significant differences between sampling seasons ($p=0.42$); none of the samples surpassed the permissible limit (0.01 mg L⁻¹). The Hg is released into the environment as a result of the rupture of minerals of rocks and soils through the exposure to wind and water. Although a large part of Hg is released naturally, some human activities such as the application of fertilizers in agriculture and waste water channels are responsible for its emission into soils or water (Montilla-Bravo *et al.*, 2016).

The concentrations of Hg in each area of study are not the result of contamination from anthropogenic mining activities, but rather, are related to the fluctuation in the values of pH of the groundwaters. In the sites with values of pH acid-neutral, the concentrations of Hg increased because this metal is concentrated and is mobilized in pH of 5 to 7. Another cause is that 70% of the samples were collected in agricultural zones and it is inferred that the presence of mercury is related to the use of fertilizers and pesticides (Díaz-Arriaga, 2014).

In a study conducted in Castellón, Spain, by López-Gutiérrez *et al.* (2010), the concentration of Hg was determined in groundwater and the maximum concentration was 0.007 mg L⁻¹, which is low compared with those of our study. These authors pointed out that the presence of Hg in the groundwater of Castellón was not totally associated with anthropogenic activity, but with geologic origin and the lithology of the zone. In comparison with our study zone, there are possible sources of contamination such as mining extraction, the use of pesticides in agriculture and the introduction of untreated urban waste water to the waterways.

Mancilla-Villa *et al.* (2017) evaluated the content of heavy metals in the surface waters in the basin of the river Ayuquila-Tuxcacuesco-Armería, Jalisco, and in 100% of the samples the concentrations (0.02 to 0.23 mg L⁻¹) surpassed the permissible limits for agricultural irrigation and urban use outlined by

NOM-001-ECOL-1996. Esos valores coinciden con las concentraciones máximas y mínimas encontradas en las dos áreas de estudio.

Las concentraciones de Pb en ambas regiones de estudio variaron de 0.01 a 0.28 mg L⁻¹, sin diferencias significativas entre temporadas de muestreo (p=0.68). Ninguna muestra superó el límite permisible (0.5 mg L⁻¹). El Pb representa cerca de 0.002% de la corteza de la tierra y es el elemento más abundante entre los metales pesados. El contenido de Pb de las rocas ígneas varía de 8 mg kg⁻¹ a 20 mg kg⁻¹ y niveles similares se encuentran en rocas sedimentarias, desde 7 mg kg⁻¹ a 20 mg kg⁻¹ (Londoño-Franco *et al.*, 2016).

En las plantas el Pb no es un elemento esencial para el crecimiento, pero está en los sistemas suelo-agua de las plantas, y permanece en los suelos ya sea por adsorción o formando complejos con componentes inorgánicos y orgánicos del suelo. El Pb tiende a acumularse cerca de la superficie del suelo proveniente de las aguas de riego. Los cultivos con raíces poco profundas están expuestos a concentraciones relativamente más altas que los cultivos con raíces más profundas y éstas tienden a reducir su crecimiento (Isaza-Guzmán, 2013).

En un estudio sobre la inhibición de germinación y crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y maíz (*Zea mays*) en el laboratorio de la Universidad del Valle Sede Pacífico, Isaza-Guzmán (2013) encontró que una concentración de 5 g L⁻¹ de Pb afecta el proceso de germinación en los cultivos, y es más visible en el frijol. Además, se redujo el porcentaje de germinación y crecimiento en ambas especies, en especial en los órganos de raíz, tallo y hoja; por lo tanto, se producen efectos negativos en el crecimiento de los cultivos.

Las concentraciones de B en ambas regiones de estudio varían de 0.01 a 0.07 mg L⁻¹ (Figura 6), sin diferencias significativas entre temporadas de muestreo (p=1.0). Las concentraciones de B en las aguas subterráneas fueron menores a 0.1 mg L⁻¹; por lo tanto, las aguas muestreadas no presentan restricción en su uso. Las aguas subterráneas son de excelente calidad (< 0.33 mg L⁻¹), y se pueden usar para cultivos sensibles como trigo (*Triticum aestivum*), cebolla (*Allium cepa*), limón (*Citrus limón*), naranjo (*Citrus sinensis*) y aguacate (*Persea americana*) (Mancilla-Villa *et al.*, 2014).

Mancilla-Villa *et al.* (2014) estudiaron las aguas superficiales de Tlaxcala, Puebla y Veracruz,

NOM-001-ECOL-1996. These values coincide with the maximum and minimum concentrations in the two study areas.

The concentrations of Pb in both regions fluctuated between 0.01 and 0.28 mg L⁻¹, with no significant differences between sampling seasons (p=0.68). None of the samples surpassed the permissible limit (0.5 mg L⁻¹). Pb represents close to 0.002% of the earth's crust and is the most abundant element among the heavy metals. The content of Pb of igneous rocks varies from 8 mg kg⁻¹ to 20 mg kg⁻¹ and similar levels can be found in sedimentary rocks, from 7 mg kg⁻¹ to 20 mg kg⁻¹ (Londoño-Franco *et al.*, 2016).

In plants, Pb is not an essential element for growth, but is in the soil-water systems of plants, remains in the soils, whether by absorption or forming complexes with inorganic and organic components of the soil. Lead tends to accumulate close to the surface of the soil from irrigation water. The crops with shallow roots are exposed to relatively higher concentrations than the crops with deeper roots and tend to reduce their growth (Isaza-Guzmán, 2013).

In a study about the inhibition of germination and growth of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and maize (*Zea mays*) at the laboratory of the Universidad del Valle Sede Pacífico, Isaza-Guzmán (2013) found that with a concentration of 5 g L⁻¹ of Pb, the process of germination in crops is affected, and is more visible in bean. Furthermore, the percentage of germination and growth was reduced in both species, especially in the organs of root, stem and leaf; therefore, negative effects are produced in crop growth.

The concentrations of B in both regions of study vary from 0.01 to 0.07 mg L⁻¹ (Figure 6), with no significant differences between sampling seasons (p=1.0). The concentrations of B in the groundwaters were less than 0.1 mg L⁻¹; therefore, the waters sampled do not present restriction for their use. The groundwaters are of excellent quality (< 0.33 mg L⁻¹), and can be used for sensitive crops such as wheat (*Triticum aestivum*), onion (*Allium cepa*), lemon (*Citrus limón*), orange (*Citrus sinensis*) and avocado (*Persea americana*) (Mancilla-Villa *et al.*, 2014).

Mancilla-Villa *et al.* (2014) carried out a study in the surface waters of Tlaxcala, Puebla and Veracruz, and found concentrations of B of less than 1 mg L⁻¹, coinciding with our study. The low concentrations of B are attributed to the fact that in the region of study the waters are in contact with sedimentary

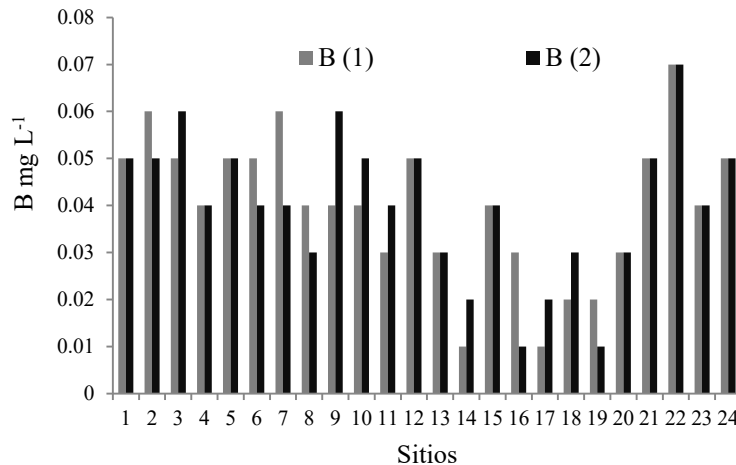


Figura 6. Concentración de boro (B) en las aguas subterráneas de los sitios muestreados.
Figure 6. Concentration of boron (B) in the groundwaters of the sampled sites.

y encontraron concentraciones de B menores a 1 mg L⁻¹, coincidente con nuestro estudio. Las concentraciones de B bajas se atribuyen a que en la región de estudio las aguas están en contacto con rocas sedimentarias, como calizas, lutitas, diatomitas, limonitas, yesos y lateritas. Además, se registraron niveles inferiores de C.E. a 1500 $\mu\text{S cm}^{-1}$ lo cual indica una concentración menor de sales disueltas (Can-Chulim *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Para los parámetros fisicoquímicos analizados pH y conductividad eléctrica, no se encontraron niveles que restrinjan el uso de las aguas subterráneas en el riego agrícola, pero se debe realizar un análisis de suelos para complementar la información y establecer de forma óptima los cultivos que se adecuen a estas condiciones.

En todas las muestras el mercurio superó los límites máximos establecidos por la NOM-001-ECOL-1996 para su uso en riego agrícola. En 16% de las muestras el arsénico superó los límites máximos, pero Cd y Pb no los superaron.

El uso de las aguas subterráneas para irrigar campos agrícolas en los municipios de Atlán de Navarro y Zacolaco de Torres, Jalisco, contamina los suelos agrícolas con mercurio y arsénico, lo que causaría efectos adversos en el desarrollo de las plantas y la introducción de los metales pesados a la cadena trófica, con los consecuentes daños a la salud humana.

rocks, such as limestone, lutite, diatomite, limonite, gypsums and laterites. In addition, levels of C.E. lower than 1500 $\mu\text{S cm}^{-1}$ were registered, which indicates a lower concentration of dissolved salts (Can-Chulim *et al.*, 2011).

CONCLUSIONS

For the physiochemical parameters pH and electric conductivity analyzed, levels were not found that would restrict the use of the groundwaters in agricultural irrigation, but an analysis of soils should be made to complement the information and optimally establish the crops that are adjusted to these conditions.

In all of the samples, mercury surpassed the maximum limits established by the NOM-001-ECOL-1996 for use in agricultural irrigation. In 16% of the samples, arsenic surpassed the maximum limits, but Cd and Pb did not.

The use of groundwaters to irrigate agricultural fields in the municipalities of Atlán de Navarro and Zacolaco de Torres, Jalisco, contaminate the agricultural soils with mercury and arsenic, which would cause adverse effects in the development of plants, and the introduction of heavy metals to the trophic chain, with consequential damage to human health.

—End of the English version—

—*—

LITERATURA CITADA

- Bautista, F., E. Campuzano, C. Delgado, y A. Goguitchaichvili. 2017. Índices de adsorción de metales pesados en suelos urbanos: el caso de Morelia, Michoacán. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 69: 433-445.
- Bécher, F., y M. Blarasin. 2014. Arsénico y Flúor en aguas subterráneas en la planicie sudoccidental de Córdoba. Un problema ambiental analizado desde la perspectiva hidrogeológica. *Rev. Est. Ambiem.* 2: 4-23.
- Can-Chulim, A., H. M. Ortega-Escobar, N. E. García-Calderón, A. L. Reyes-Ortigoza, V. A. González-Hernández, y D. Flores-Román. 2011. Origen y calidad del agua subterránea en la cuenca oriental de México. *Terra Latinoam.* 29: 189-200.
- Can-Chulim, A., H. M. Ortega-Escobar, E. I. Sánchez-Bernal, y E. Cruz-Crespo. 2014. Calidad de agua para riego en la Sierra Norte de Puebla, México. *Tecnol. Cienc. del Agua* 5: 77-96.
- Cartagena, R., D. López, E. Orantes, B. Enríquez, E. Benítez, y M. Jandrez. 2018. Determinación de mercurio, cadmio, plomo y arsénico en ríos de la zona minera de la subcuenca del río Titihuapa, Cabañas, El Salvador. *Revista Minerva* 1: 12-15.
- CEA (Comisión Estatal del Agua). 2015. Ficha Técnica Hidrológica Municipal. Zacoalco de Torres. Secretaría de Gobierno del estado de Jalisco. pp: 3-25.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2015. Capas de información de los aprovechamientos subterráneos inscritos del Registro Público de Derechos de Agua (REPGA) <http://siga.conagua.gob.mx/repda/menu/framekmz.htm> (Consulta: diciembre 2019).
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2018. Programa hídrico estatal 2014-2018 del estado de Jalisco. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-(SEMARNAT). Coyoacán, México, D. F. pp: 178.
- Covarrubias, S. A., y J. J. Peña. 2017. Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Rev. Int. Contam. Ambien.* 33: 7-21.
- Díaz-Arriaga, F. 2014. Mercurio en la minería del oro: impacto en las fuentes hídricas destinadas para consumo humano. *Rev. Salud Pública* 16: 947-957.
- Espósito, M. E., M. C. Blanco, J. D. Paoloni, y N. Amiotti. 2017. Variabilidad espacio-temporal del par As-Cd en el recurso hídrico y zonas de riesgo en el tramo sudoccidental de la llanura pampeana, Argentina. *Geoacta* 42: 24-37.
- Isaza-Guzmán, G. 2013. Efecto del plomo sobre la imbibición, germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. y *Zea mays* L. *Rev. Biotec. Veg.* 13: 161-167.
- Londoño-Franco, L. F., P. T. Londoño-Muñoz, y F. G. Muñoz-García. 2016. Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotec. Sect. Agrop. Agroindust.* 14: 145-153.
- López-Gutiérrez, J., O. García-Mendez, y B. J. Ballesteros-Navarro. 2010. El origen del mercurio presente en el acuífero costero de la plana de Castellón (este de España). *Bol. Geol. Min.* 121: 279-298.
- Mancilla-Villa, O. R., H. Ortega-Escobar, C. Ramírez-Ayala, E. Uscanga, M. Ramos-Bello, y A. Reyes-Ortigoza. 2012. Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambien.* 28: 39-48.
- Mancilla-Villa, O. R., A. L. Bautista-Olivas, H. M. Ortega-Escobar, C. Ramírez-Ayala, A. L. Reyes-Ortigoza, y H. Flores-Magdaleno. 2014. Contenido de boro en el agua superficial de Puebla, Tlaxcala y Veracruz. *Tecnol. Cienc. Agua* 5: 97-109.
- Mancilla-Villa, O. R., B. E. Fregoso-Zamorano, E. J. Hueso-Guerrero, R. D. Guevara-Gutiérrez, C. Palomera-García, J. L. Olguín-López, H. M. Ortega-Escobar, E. K. Medina-Valdovinos, y H. Flores-Magdaleno. 2017. Concentración iónica y metales pesados en el agua de riego de la cuenca de río Ayuquila-Tuxcacuesco-Armería. *IDESIA* 35: 115-123.
- Montilla-Bravo, B., R. García, M. Colina, y J. Rangel. 2016. Evaluación de la contaminación por mercurio en aguas y sedimentos del Río Catatumbo utilizando icp-ms. *Rev. CLIC* 12: 35-44.
- Olivares, S., D. García, L. Lima, I. Saborit, A. Llizo, y P. Pérez. 2013. Niveles de cadmio, plomo, cobre y zinc en hortalizas cultivadas en una zona altamente urbanizada de la ciudad de La Habana, Cuba. *Rev. Int. Contam. Ambien.* 29 :285-294.
- Ortiz-Vega, M. I., Á. Can, C. A. Romero, E. Cruz, y A. Madueño. 2019. Calidad del agua para uso agrícola del río Mololoa, México. *Terra Latinoam.* 37: 185-195.
- Quevedo, J., y L. Meneses. 2014. Determinación de factores de enriquecimiento e índices de geoacumulación de plomo, cadmio y níquel en suelos agrícolas del sector San Alfonso en Machachi. *Info Analítica* 2: 41-55.
- Reyes, Y. C., I. Vergara, O. E. Torres, M. Diaz, y E. E. González. 2016. Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Rev. Ing. Invest. Desarrollo* 16: 66-77.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y los Recursos Naturales). 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Diario Oficial de la Federación. 23 de abril de 1995. Ciudad de México, México. 35 p.

SÍNTESIS Y EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE FRIJOL

SYNTHESIS AND EFFECT OF HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES ON THE GERMINATION AND GROWTH OF COMMON BEAN

Nefertiti Laura **de la Vega-García**¹, Cecilia Beatriz **Peña-Valdivia**¹, Ma. del Carmen A. **González-Chávez**², Daniel **Padilla-Chacón**¹, Rogelio **Carrillo-González**^{2,1}

¹Botánica, ² Edafología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (crogelio@colpos.mx).

RESUMEN

Algunos fertilizantes se han diseñado en tamaño nanométrico para mejorar la eficiencia en la absorción de nutrientes, pero previo a su uso generalizado es necesario hacer pruebas de toxicidad. El objetivo de este estudio fue optimizar la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) y evaluar su efecto en la germinación de semillas y crecimiento de plantas frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). La hipótesis fue que las NPHA pueden suplir el P que necesita el frijol sin ser tóxicas. Las NPHA se obtuvieron con el método de precipitación química vía húmeda y la velocidad de adición de reactivos y agitación se variaron. La caracterización incluyó distribución de tamaño de partícula, potencial zeta, estructura cristalina y tamaño de partícula mediante difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier. El efecto de NPHA se evaluó en la germinación y el crecimiento de frijol, en un experimento completamente al azar. Las NPHA fueron altamente cristalinas, con tamaño entre 15.51 a 154.41 nm, con morfología similar a hojas. Las NPHA (250 a 1000 $\mu\text{moles P L}^{-1}$) no afectaron la germinación. El crecimiento de la raíz fue similar con las concentraciones entre (250 y 500 $\mu\text{moles P L}^{-1}$), pero disminuyó 23.7 y 48% en dosis mayores (750 y 1000 $\mu\text{moles P L}^{-1}$). Las NPHA no son tóxicas para frijol (hasta 31 mg L^{-1} P) y pueden ser útiles para aportar P a las plantas; además, en dosis de 20 $\mu\text{moles L}^{-1}$, incrementaron la altura de la planta entre 31.3 y 66.7%, respecto a las plantas regadas con solución Hoagland. Sin embargo, es necesario generar más información.

Palabras clave: nanofertilizantes, nanotoxicología, fósforo.

ABSTRACT

Some fertilizers have been designed in nanometric size to improve the efficiency in the absorption of nutrients, but it is necessary to make toxicity tests before their widespread use. This study aimed to optimize the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles (NPHA) and to evaluate its effect on seed germination and growth of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). The hypothesis was that NPHA can supply the P necessary for the bean, without being toxic. NPHA were synthesized by the wet chemical precipitation method, and the speed of addition of reagents and agitation were varied. The characterization included particle size distribution, zeta potential, crystalline structure and particle size by X-ray diffraction, transmission electron microscopy, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The effect of NPHA was evaluated on bean germination and growth, in a completely randomized experiment. The NPHA were highly crystalline, with a size between 15.51 to 154.41 nm, and with similar morphology to leaves. The NPHA (250 to 1000 $\mu\text{mol P L}^{-1}$) did not affect the germination. Root growth was similar, with concentrations between 250 and 500 $\mu\text{mol P L}^{-1}$ but decreased 23.7 and 48% in higher doses (750 and 1000 $\mu\text{mol P L}^{-1}$). The NPHA are not toxic for beans (up to 31 mg L^{-1} P) and can be useful to provide P to the plants; moreover in doses of 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ increased the height of the plant between 31.3 and 66.7%, compared to the plants watered with Hoagland solution. However, it is necessary to generate more information.

Key words: nanofertilizers, nanotoxicology, phosphorus.

INTRODUCTION

The use of nanotechnology in biomedicine, pharmacy, food industry, and agriculture increases rapidly, and its impact on the economy, society, and environment is evident.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 1009-1029. 2020.

INTRODUCCIÓN

El uso de la nanotecnología en biomedicina, farmacia, industria de los alimentos y agricultura aumenta rápidamente y su impacto en la economía, la sociedad y el ambiente es cada vez más relevante. Los nanomateriales (NM) con dimensiones menores de 100 nm se utilizan con mayor frecuencia en productos de alto valor de venta. En la agricultura se ha iniciado su comercialización en fertilizantes (Kin 32, Triple 20-n, Micro-n, Magno-n) y otros insumos. Sin embargo, la evaluación de la toxicidad de las nanopartículas (NP) sintéticas es importante desde el punto de vista de inocuidad, sus efectos en la germinación y el crecimiento de las plantas deben evaluarse previo a promover su uso comercial (Solanki *et al.*, 2015).

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), con relación estequiométrica Ca:P 1.67, es uno de los minerales con P que se encuentra principalmente en depósitos biogénicos de huesos (Brzezinska Miecznik., 2015) y en ambientes ígneos y metamórficos. La materia prima para la producción de fertilizantes fosfatados es la roca fosfórica (hidroxiapatita; < 200), cuyas mayores reservas probadas se encuentran en Sudáfrica (21×10^9 millones t), y por la cantidad de reservas México está debajo de la posición 15 (van Kaubewenberbh, 2010). Una fracción considerable del P aplicado a los cultivos queda inmovilizada en el suelo, por lo cual su eficiencia como fertilizante es relativamente baja. Con el aprovechamiento de las propiedades a escala nano (Kale y Gawade, 2016), las nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) podrían aumentar la eficiencia del uso de fertilizantes, al funcionar como fertilizantes de lenta liberación. Hay varios métodos para sintetizar NPHA como la precipitación química húmeda o seca (Zou *et al.*, 2012), la hidrólisis, los procesos hidrotérmicos, solgel, la preparación mecanoquímica y la vía sonoquímica, por lo que seleccionar los eficientes puede ayudar a bajar los costos (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Las rutas de síntesis usando fosfato cálcico y mediante emulsiones-microemulsiones (Zhou y Lee, 2011), también son prácticas.

Los puntos críticos de la producción de NP pueden controlarse efectivamente al variar los parámetros de proceso. La síntesis química vía húmeda es óptima para producir NPHA (Zou *et al.*, 2012) y se basa en reacciones de precipitación de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y H_3PO_4 .

Nanomaterials (NM), with dimensions less than 100 nm are more frequently used in products with high sales value. In agriculture, their commercialization has begun in fertilizers (Kin 32, Triple 20-n, Micro-n, Magno-n) and other inputs. However, the evaluation of the synthetic nanoparticles (NP) toxicity is important from a safety point of view, its effects on the germination and growth of plants should be evaluated before promoting its commercial use (Solanki *et al.*, 2015).

With Ca:P 1.67 stoichiometric ratio, hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) is one of the P-containing minerals found mainly in biogenic bone deposits (Brzezinska Miecznik., 2015), and in igneous and metamorphic environments. Phosphate rock is the supply for the production of phosphate fertilizers (hydroxyapatite; < 200), whose largest proven reserves are located in South Africa (21×10^9 million t), and given the amount of reserves Mexico is below position 15 (van Kaubewenberbh, 2010). A considerable fraction of the P applied to crops is immobilized in the soil, so its efficiency as a fertilizer is relatively low. Taking advantage of the properties at nano scale (Kale and Gawade, 2016), hydroxyapatite nanoparticles (NPHA) could increase the efficiency of fertilizer use by serving as slow-release fertilizers. There are several methods to synthesize NPHA, such as wet or dry chemical precipitation (Zou *et al.*, 2012), hydrolysis, hydrothermal processes, solgel, mechanochemical preparation, and sonochemical process, therefore, selecting the efficient methods can help lowering costs (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Synthesis routes using calcium phosphate and through emulsion-microemulsions (Zhou and Lee, 2011) are also practical.

The critical points of nanoparticle synthesis can be effectively controlled by varying the process parameters. Wet chemical synthesis is optimal for producing NPHA (Zou *et al.*, 2012), and is based on precipitation reactions of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and H_3PO_4 . In this reaction, the pH is the most important variable to be controlled (Ferraz *et al.*, 2004) to obtain homogeneous particles smaller than 100 nanometers. However, the geometric shape, size, and specific surface of the NPHA depend, to a great extent, on the temperature during the reaction and the speed of addition of the reagents (Engin *et al.*, 2000). Alkaline pH and temperature of 80 °C are necessary to obtain precipitates with low crystallinity

En esta reacción el pH es la variable más importante que debe controlarse (Ferraz *et al.*, 2004) para obtener partículas homogéneas de tamaño menor a los 100 nanómetros. Sin embargo, la forma geométrica, tamaño y superficie específica de las NPHA dependen, en gran medida, de la temperatura durante la reacción y de la velocidad de adición de los reactivos (Engin *et al.*, 2000). El pH alcalino y temperatura de 80 °C son necesarios para obtener precipitados con cristalinidad baja y mayor deficiencia en Ca. Las condiciones experimentales pueden variar según el tipo de apatita que se quiera sintetizar (Eichert *et al.*, 2009).

La germinación de la semilla depende de las condiciones ambientales y de la viabilidad de sus reservas (Koornneef *et al.*, 2002). El desarrollo de la planta depende además del éxito de la germinación, de los nutrientes en el sustrato.

Los efectos de NP, de diversa naturaleza química, se han evaluado en la germinación y desarrollo de las plántulas de especies agrícolas, pero las pruebas se han centrado en los compuestos metálicos por su posible efecto tóxico. Las NP de CuO no afectaron la germinación de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) ni maíz (*Zea mays* L.), pero inhibieron la elongación de la raíz (Stampoulis *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Las NP de ZnO, en dosis de 400 a 800 mg kg⁻¹, aumentaron la germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.) y no tuvieron efecto en la biomasa de sus raíces (Zhao *et al.*, 2014). La aplicación NP de TiO₂ a semillas de *Glycine max* L. aceleró la germinación. También incrementó el crecimiento de la planta, al aumentar la absorción y el uso del agua y nutrientes (Lu *et al.*, 2002). Las NP de TiO₂, en ciertas concentraciones, aumentaron el crecimiento de espinaca (*Spinacia oleácea*) junto con el metabolismo del N y la fotosíntesis (Yang *et al.*, 2007). En contraste con lo anterior, las NP pueden producir efectos tóxicos arriba de ciertas concentraciones (Rico *et al.*, 2011). Aunque el conocimiento sobre la fitotoxicidad de las NP aumenta (Wang *et al.*, 2012), nuestra comprensión sobre estas nanoestructuras y los mecanismos de toxicidad aún no se aclaran por completo para la mayoría de las NP y las especies vegetales. Las NP de CuO en concentraciones mayores de 0.5 mM disminuyeron la germinación de las semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) hasta en 71% (Shaw y Hossain, 2013). Los efectos de las NP en los procesos de germinación de semillas y desarrollo de

and higher Ca deficiency. Experimental conditions may vary according to the type of apatite to be synthesized (Eichert *et al.*, 2009).

Seed germination depends on environmental conditions and the viability of its reserves (Koornneef *et al.*, 2002). The development of the plant also depends on the success of germination and the nutrients in the substrate.

The effects of NPs, of diverse chemical nature, have been evaluated in the germination and seedling development of agricultural species, but the tests have focused on the metallic compounds due to their possible toxic effect. Nanoparticles of CuO did not affect the germination of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.) nor corn (*Zea mays* L.), but inhibited root elongation (Stampoulis *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Nanoparticles of ZnO, at doses of 400 to 800 mg kg⁻¹, increased the germination of cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) and did not affect the root biomass (Zhao *et al.*, 2014). The application of NPs of TiO₂ to *Glycine max* L. seeds speed up the germination. It also increased plant growth by augmenting absorption and the use of water and nutrients (Lu *et al.*, 2002). Nanoparticles of TiO₂ exposition increased spinach (*Spinacia oleácea*) growth along with N metabolism and photosynthesis (Yang *et al.*, 2007). In contrast, NPs can produce toxic effects above certain concentrations (Rico *et al.*, 2011). Although knowledge on the phytotoxicity of NPs is increasing (Wang *et al.*, 2012), the understanding of these nanostructures and the mechanisms of toxicity is not yet fully understood for most NPs and plant species. NPs of CuO in concentrations higher than 0.5 mM decreased the germination of rice seeds (*Oryza sativa* L.) by up to 71% (Shaw and Hossain, 2013). The effects of NPs on the processes of seed germination and seedling development are determined by the NP characteristics (chemical composition, size, surface area, reactivity, and concentration), and by the plant species (Solanki *et al.*, 2015).

The toxicity of non-metallic NPs that may be a source of nutrients has not been evaluated in plant beans. Toxicity studies in plants may be long-term (greater than eight weeks), to evaluate effects on biomass production and root length, and to measure chronic and acute toxicity. Short-term studies addressed changes in germination; these experiments are sensitive, simple, and reproducible at low cost (Wang *et al.*, 2001).

la plántula se determinan por las características de las NP (composición química, tamaño, área superficial, reactividad y concentración) y por la especie vegetal (Solanki *et al.*, 2015).

La toxicidad de NP no metálicas que pueden ser fuente de nutrientes no se ha evaluado en frijol. Los estudios de toxicidad en plantas pueden ser a largo plazo (mayores de ocho semanas), para evaluar los efectos en la producción de biomasa y longitud de raíz, y medir la toxicidad crónica y aguda. Los estudios de corto plazo incluyen los cambios en la germinación, estos tienen sensibilidad, simplicidad y reproducibilidad altas y bajo costo (Wang *et al.*, 2001).

Los objetivos del presente estudio fueron obtener NPHA mediante la adaptación de la metodología de la síntesis por precipitación química propuesta por Ortiz *et al.* (2017) y evaluar su efecto en la germinación de semillas y el crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). La hipótesis fue que las nanopartículas de hidroxiapatita aportan suficiente fósforo para el crecimiento de frijol sin ser tóxica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis química de NPHA

La síntesis de NPHA se basó en el método de síntesis húmeda, descrito por Ortiz *et al.* (2017) y al cual se hicieron modificaciones. La síntesis resulta de la reacción de precipitación en sistema abierto (Kumar *et al.*, 2004) entre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.1 M (100 mL) y el H_3PO_4 0.06 M (100 mL, grado reactivo, Meyer). El H_3PO_4 se adicionó lentamente (velocidad de flujo de $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), con una bomba peristáltica a la solución de hidróxido de calcio. La mezcla se mantuvo a $76 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ máximo. El pH se midió con potenciómetro (Orion Research 701 A) y se ajustó a 11, añadiendo una solución de KOH 1.0 M, para inducir la formación de la hidroxiapatita. La reacción finalizó al consumirse el ácido. Entonces se suspendió el calentamiento y la agitación continuó por 30 min. Para asegurar la cristalización de las NPHA se aplicó ultrasonido (Branson modelo 1510) por 15 min, y se mantuvieron en botella de polietileno a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su caracterización.

Determinación de la eficiencia de síntesis y caracterización de NPHA

La eficiencia en la síntesis de NPHA se determinó con la cuantificación de P y Ca en el sobrenadante, las interferencias por ionización se inhibieron con la adición de cloruro de lantano (500 mg L^{-1}) en medio ácido, después de centrifugar a 8000 g

The objectives of this study were to obtain NPHA by adapting the chemical precipitation synthesis methodology proposed by Ortiz *et al.* (2017) and to evaluate its effect on seed germination and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth. The hypothesis was that hydroxyapatite nanoparticles provide enough phosphorus for bean growth without being toxic.

MATERIALS AND METHODS

NPHA chemical synthesis

The synthesis of NPHA was based on the wet synthesis method, described by Ortiz *et al.* (2017), and to which modifications were made. The synthesis results from the open system precipitation reaction (Kumar *et al.*, 2004) between 0.1 M $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (100 mL) and 0.06 M H_3PO_4 (100 mL, reactive grade, Meyer). Orthophosphoric acid (H_3PO_4) was added slowly (1.5 mL min^{-1} flow rate) to the calcium hydroxide solution with a peristaltic pump. The mixture was kept at $76 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ max. The pH was measured with a potentiometer (Orion Research 701 A), buffered to 11, adding a 1.0 M KOH solution, to induce the formation of hydroxyapatite. The reaction ended when the acid was consumed. Heating was then suspended, and agitation continued for 30 min. To ensure crystallization of the NPHA, the solution was sonicated (Branson, model 1510) for 15 min, and NPHA were kept in polyethylene bottles at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ until the characterization.

The efficiency of NPHA synthesis and characterization of NP

The efficiency in the NPHA synthesis was determined through the quantification of P and Ca in the supernatant. The interferences by ionization were inhibited with the addition of lanthanum chloride (500 mg L^{-1}) in acid medium, after centrifugation at 8000 g for 10 min. Ca was determined by atomic absorption in a spectrophotometer (Perkin Elmer 3110), at 422.7 nm . P was measured by the method proposed by Murphey and Riley (1962), in which the complex formed from the reaction of P with Mo and Sb is quantified by colorimetry at 880 nm (UV-visible spectrophotometer; Varian Cary 50). For this process a calibration curve was used (prepared with Purity certified standards), with P between 0 and 1.2 mg L^{-1} .

Determination of size distribution, Z-potential, and polydispersity index

The NPHA size distribution was determined by Dynamic Light Scattering (DLS), in which the He-Ne laser measures

por 10 min. El Ca se determinó por absorción atómica en un espectrofotómetro (Perkin Elmer 3110), a 422.7 nm. El P se midió por el método propuesto por Murphey y Riley (1962), en el cual el complejo formado de la reacción de P con Mo y Sb se cuantifica por colorimetría a 880 nm (espectrofotómetro UV-visible; Varian Cary 50). Para esto se usó una curva de calibración (preparado con estándares certificados Purity), con P entre 0 y 1.2 mg L⁻¹.

Determinación de la distribución de tamaño, potencial Z e índice de polidispersidad

La distribución del tamaño de NPHA se determinó por dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering DLS), en la cual el láser de He-Ne mide el movimiento browniano de las partículas y lo relaciona con su tamaño nanométrico.

El potencial Zeta (pZ) es la medida de la magnitud de la electrostática (cargas en equilibrio) entre las partículas en un coloide y proporciona información sobre la dispersión, agregación o floculación del material en estudio. La evaluación es mediante dispersión de luz por electroforesis Doppler y un pZ de gran magnitud se correlaciona con mayor estabilidad coloidal. El índice de polidispersidad (PdI) se refiere a los tamaños de las NP en suspensión (valor 0 y 1). Si las partículas en la muestra son homogéneas, el valor PdI se aproximará a cero (Malvern Panalytical, 2018). La medición de los tres parámetros se realizó con el equipo Zetasizer Nano (ZS, Malvern Instruments Limited, UK). Para realizar estas mediciones las muestras se sonicaron por 10 min antes de la evaluación.

Identificación de los grupos químicos funcionales

Las NPHA se caracterizaron con espectroscopia infrarroja, con transformada de Fourier (FTIR). La frecuencia de vibración, características de la hidroxiapatita, se obtuvo en el intervalo de 4000 a 300 cm⁻¹ en el equipo Agilent Technologies Cary 630 FTIR.

Determinación de la pureza de NPHA sintetizadas

La pureza se determinó por difracción de rayos X en un difractómetro (GBC Spellman DF3) con tubo de rayos X, radiación de Cu K_α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) y foco lineal (40 kV y 15 mA) (Jenkins y Snyder, 1996). En el haz incidente se utilizó una rendija Soller (0.5 mm) con filtro de níquel. Los patrones de difracción de alta calidad se obtuvieron en tiempo mínimo con un detector ultra de alta velocidad. Las mediciones se hicieron en geometría simétrica o de polvos ($\theta - 2\theta$), con el barrido de 3.5 a 60°, tamaño de paso de 0.01 y velocidad de 3° min⁻¹.

the Brownian motion of the particles and relates it to their nanometric size.

The Zeta potential (pZ) is the measurement of the electrostatics magnitude (charges at equilibrium) between particles on a colloid and provides information on the dispersion, aggregation, or flocculation of the material under study. The evaluation is made through light scattering by Doppler electrophoresis, and a high magnitude pZ correlates with higher colloidal stability. The polydispersity index (PdI) refers to the sizes of NPs in suspension (0 and 1 value). If the particles in the sample are homogeneous, the PdI value will approach zero (Malvern Panalytical, 2018). The measurement of the three parameters was performed with Zetasizer Nano (ZS, Malvern Instruments Limited, UK) equipment. To perform these measurements, samples were sonicated for 10 min before the assessment.

Identification of functional chemical groups

NPHA were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The vibration frequency, which is characteristic of hydroxyapatite, was obtained in the range of 4000 to 300 cm⁻¹ in the Agilent Technologies Cary 630 FTIR equipment.

Determination of purity of synthesized NPHA

The purity was determined by X-ray diffraction in a diffractometer (GBC Spellman DF3) with X-ray tube, Cu K_α radiation ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$), and line focus (40 kV and 15 mA) (Jenkins and Snyder, 1996). A Soller slit (0.5 mm) with a nickel filter was used in the incident beam. High-quality diffraction patterns were obtained in minimal time with an ultra-high-speed detector. The measurements were made in symmetric or powder geometry ($\theta - 2\theta$), with scanning of 3.5 to 60°, step size of 0.01 and speed of 3° min⁻¹.

Determination of particle morphology and size

The NPHA morphology and size were determined in a transmission electron microscope (JEOL JEM-1011; JEOL Ltd. Tokyo, Japan), in samples covered by an amorphous C film. In these samples, the average diameter was determined by dynamic light scattering (DLS). The micrographs were obtained at 12 000 magnification.

Concentration of P available in NPHA

The release of available P was quantified by extraction as soluble P at 2% citric acid (Ordoñez and Castellanos, 1996).

Determinación de la morfología y tamaño de partículas

La morfología y tamaño de las NPHA se determinaron en microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1011; JEOL Ltd. Tokyo, Japan), en muestras recubiertas por una película de C amorfo. En éstas se determinó el diámetro promedio por dispersión de la luz dinámica (DLS). Las micrografías se obtuvieron con 12 000 aumentos.

Concentración de P disponible en NPHA

La liberación de P disponible se cuantificó por extracción como P soluble en ácido cítrico a 2% (Ordoñez y Castellanos, 1996). A 50 mL de NPHA, en suspensión, se adicionó 20 mL de solución de ácido cítrico, se agitó por 2 h, se aforó a 100 mL con agua destilada y el P se cuantificó por espectrometría (Murphy y Riley, 1962).

Cinética de solubilidad del P en NPHA en la solución Hoagland

La cinética de solubilidad de P en las NPHA se comparó con la de KH_2PO_4 (testigo) en solución Hoagland, con 20 μM de P (Millner y Kitt, 1992) por 90 min. La concentración de P se ajustó a la de la solución nutritiva completa. El P soluble se cuantificó con el método descrito por Murphy y Riley (1962).

Evaluación del efecto de NPHA en la germinación y crecimiento de frijol

Determinación de la germinación de las semillas

La toxicidad de las NPHA se evaluó en semillas de frijol variedad G-15. Las semillas no mostraban daños físicos aparentes, el color amarillo de su testa y tamaño fueron homogéneos a la vista. La superficie de 50 semillas se desinfectó mediante lavados con agua destilada, inmersión por 1 min en solución acuosa de hipoclorito de sodio comercial (5% v: v) y lavados con agua destilada. Los tratamientos se establecieron en las semillas (concentraciones equivalentes a 250, 500, 750, 1000 μmoles de P L^{-1} en NPHA, y un testigo sin NPHA). Las semillas se mantuvieron 1 h en frascos con 250 mL de agua o el equivalente al volumen de imbibición (Billard *et al.*, 2014) de suspensiones de NPHA a cada concentración de P. Después se colocaron en cajas Petri, con algodón y papel filtro humedecidos con agua destilada y se mantuvieron a 28 °C, en obscuridad (Ferguson, 1993). La germinación se consideró positiva cuando la radícula emergió 2 mm.

20 mL of citric acid solution were added to 50 mL of NPHA in suspension, stirred for 2 h, measured at 100 mL with distilled water, and the P was quantified by spectrometry (Murphy and Riley, 1962).

P Solubility kinetics in NPHA in the Hoagland solution

The P solubility kinetics in NPHA was compared with that of KH_2PO_4 (control) in Hoagland solution, with 20 μM of P (Millner and Kitt, 1992) for 90 min. The P concentration was adjusted to that of the complete nutrient solution. Soluble P was quantified by the method described by Murphy and Riley (1962).

Evaluation of the NPHA effect on bean germination and growth

Determination of seed germination

The NPHA toxicity was evaluated in bean seeds of the G-15 variety. The seeds showed no apparent physical damage, the yellow color of their heads and size were homogeneous at sight. The surface of 50 seeds was disinfected by washing it with distilled water, immersed for 1 min in an aqueous solution of commercial sodium hypochlorite (5% v: v), and washed again with distilled water. The treatments were established in the seeds (concentrations equivalent to 250, 500, 750, 1000 μmol of P L^{-1} in NPHA, and control without NPHA). Seeds were kept for 1 h in flasks with 250 mL of water or the equivalent to the imbibition volume (Billard *et al.*, 2014) of NPHA suspensions at each P concentration. Then, the seeds were placed in Petri dishes, with cotton and filter paper moistened with distilled water, and kept in darkness at 28 °C (Ferguson, 1993). The germination was considered positive when the radicle emerged 2 mm.

Determination of P in cotyledons and embryonic axis

The embryonic axis and cotyledons were separated from the seeds after 7 d of growth, weighed on the analytical balance, immersed in liquid nitrogen, and freeze-dried. The weight of the dehydrated tissues was recorded. The tissues were ground in a mortar, the mineralization of the tissues was done by wet digestion, and the P content was determined with the method of Murphy and Riley (1962).

Evaluation of the radicle length of the seedlings

The length of the radicle (cm) and the diameter below the neck were measured on the third day of germination. The

Determinación de P en cotiledones y eje embrionario

El eje embrionario y los cotiledones se separaron de las semillas después de 7 d de crecimiento, se pesaron en la balanza analítica, se sumergieron en nitrógeno líquido y se liofilizaron. El peso de los tejidos deshidratados se registró. Los tejidos se trituraron en un mortero, se hizo la mineralización de los tejidos por digestión húmeda y el contenido de P se determinó con el método de Murphy y Riley (1962).

Evaluación de la longitud de la radícula de las plántulas

La longitud de la radícula (cm) y el diámetro abajo del cuello se midieron al tercer día de la germinación. Las radículas se escanearon (escáner Hp officejet 6110, con resolución de 600 puntos por pulgada) y se midió con el editor gráfico Image J Windows 32 (GIMP 2).

Efecto en el crecimiento de la planta de frijol

Las plantas se cultivaron en invernadero (19° 30' N, 98° 51' O y altitud de 2250 m) entre el 20 de abril (siembra) y 3 de junio de 2018 (cosecha); la temperatura fue 28 a 41 °C, con 12-13 h de fotoperiodo; en un sistema hidropónico. Las semillas se sembraron en macetas de plástico de 4 kg de capacidad, con piedra roja volcánica (tezontle) y con partículas de diámetro ≤ 5 mm. Este sustrato se humedeció con agua potable a capacidad de campo. Las plantas se regaron cada 3 d con solución nutritiva Hoagland. La concentración común de P usado en la solución Hoagland es 40 μM , pero en la presente investigación se preparó a 20 μM , simulando un suelo bajo en fósforo. Catorce días después de la siembra las plantas se separaron en dos grupos; uno se mantuvo como testigo (regadas con solución Hoagland baja en P; Millner y Kitt, 1992), y otro con 50 mL de NPHA suspendidas en la solución nutritiva Hoagland, equivalente a 20 μmoles de P L^{-1} . La altura de las plantas se midió durante su desarrollo, se contabilizaron las inflorescencias el primer día de anthesis y se determinó la biomasa y longitud de las vainas en la cosecha.

Diseño experimental y análisis de resultados

El modelo experimental fue completamente al azar con número variable de repeticiones entre las determinaciones: ocho para la síntesis y caracterización de las NPHA, cinco para la germinación de las semillas (con diez semillas por repetición) y crecimiento de la raíz de las plántulas y cinco para evaluar el crecimiento de la planta, con una planta como unidad experimental. Los resultados se analizaron con el programa estadístico R x 64 3.4.3, mediante análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba

radicles were scanned (Hp Officejet 6110 scanner, 600 dots per inch resolution) and measured with the Image J Windows 32 (GIMP 2) graphics editor.

Effect on bean plant growth

The plants were grown in a greenhouse (19° 30' N, 98° 51' W and 2250 m altitude) between April 20 (planting) and June 3, 2018 (harvest); the temperature was 28 to 41 °C, with 12-13 h of photoperiod in a hydroponic system. Seeds were sown in 4 kg plastic pots, with volcanic red stone (tezontle) and with particles of ≤ 5 mm in diameter. This substrate was moistened with drinking water at field capacity. The plants were watered every 3 d with Hoagland nutrient solution. The common concentration of P used in the Hoagland solution is 40 μM , but in this research it was prepared at 20 μM , simulating a low phosphorous soil. Fourteen days after sowing, plants were separated into two groups; one was kept as control (irrigated with low P Hoagland solution; Millner and Kitt, 1992), and the other with 50 mL of NPHA suspended in the Hoagland nutrient solution, equivalent to 20 μmol of P L^{-1} . The height of the plants was measured during their development, the inflorescences were counted on the first day of anthesis, and the biomass and length of the pods were determined at harvest.

Experimental design and analysis of results

The experimental model was completely randomized with a variable number of replicates between determinations: eight for the synthesis and characterization of the NPHA, five for seed germination (with ten seeds per replicate) and root growth of the seedlings, and five to evaluate plant growth, with one plant as the experimental unit. The results were analyzed with the R x 64 3.4.3 statistical program, through analysis of variance (ANOVA) and Tukey's mean comparison test ($p \leq 0.05$), after verifying the normality assumptions.

RESULTS AND DISCUSSION

NPHA chemical synthesis

Before the procedure optimization, NPHA were variable in size, from 85 to 8902 nm, with an average of 99 nm. The adjustment of the procedure (Table 1) allowed to standardize the particle size to less than 100 nm. The reproducibility of the method modification was checked when evaluating eight successive syntheses: 10% with 5 nm size, 48% of 45 nm, and 30% of 154 nm (Figure 1). One of the advantages

comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), previa verificación de los supuestos de normalidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis química de NPHA

Previo a la optimización del procedimiento, las NPHA tenían tamaño variable, de 85 a 8902 nm, con promedio de 99 nm. El ajuste del procedimiento (Cuadro 1) permitió estandarizar el tamaño de partícula, menor a 100 nm. La reproducibilidad de la modificación del método se comprobó al evaluar ocho síntesis sucesivas; 10% con tamaño de 5 nm, 48% de 45 nm y 30% de 154 nm (Figura 1). Una ventaja del método es el control de la morfología y el tamaño de partícula (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Por lo tanto, éste fue uno de los métodos más utilizados (60%) en las investigaciones publicadas entre 1999 y 2011 (Sadat-Shojai *et al.*, 2013); aunque las desventajas

of the method lies in the control of morphology and particle size (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Therefore, this was one of the most used methods (60%) in the investigations published between 1999 and 2011 (Sadat-Shojai *et al.*, 2013); although, the disadvantages of the procedure are the difficulty to control the crystallinity, purity, and limitations for production of large quantities of NPHA.

The temperature control, speed of addition of reagents, and pH are fundamental in the synthesis of NPs (García *et al.*, 2006). The reaction temperature determines whether the crystals will be monocrystalline or polycrystalline. At a temperature lower than 60 °C, monocrystalline crystals are obtained, and polycrystalline at higher than 60 °C (Ferraz *et al.*, 2004), which means that many nuclei are formed where small crystals grow, with a different orientation, usually randomly, and with some irregularities in the atomic arrangement. This polycrystallinity increases the specific surface. In this

Cuadro 1. Modificación del método de síntesis química, vía húmeda, de nanopartículas de hidroxiapatita descrito por Ortiz *et al.* (2017).

Table 1. Modification of the wet chemical synthesis method of hydroxyapatite nanoparticles described by Ortiz *et al.* (2017).

Variables	Ortiz <i>et al.</i> (2017)	En el presente estudio
Temperatura de inicial	50 °C	74 - 76 °C
Velocidad de adición de reactivos	3 mL min ⁻¹	1.5 mL min ⁻¹
Velocidad de agitación	400 rpm	300 rpm
pH final	10	11
Tiempo de agitación	1.5 h	1.0 h
Tiempo de sonicación	30 min	15 min
Tamaño de partícula	85 - 8092 nm	46.37 - 154.41 nm
Tiempo total de reacción	8 h	4 h

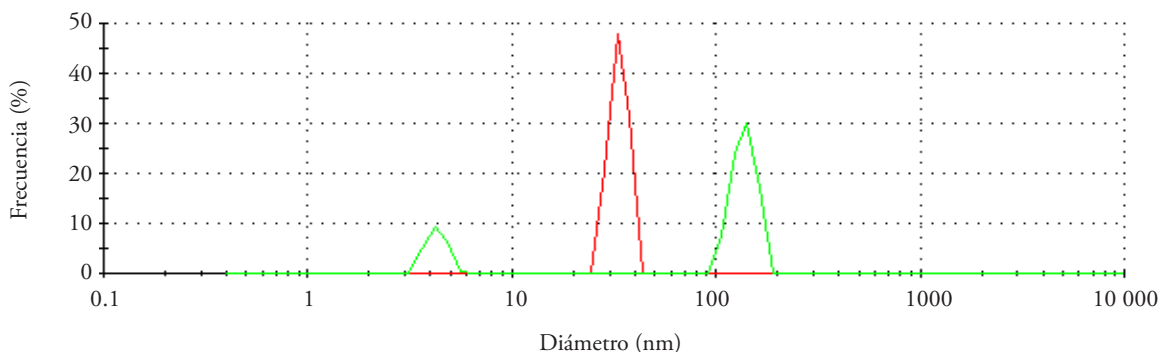


Figura 1. Frecuencia de distribución de diámetro de partículas con índice de polidispersidad de uno, en la síntesis optimizada.
Figure 1. Frequency of diameter distribution of particles with a polydispersity index of one, in the optimized synthesis.

del procedimiento son la dificultad para controlar la cristalinidad, la pureza y las limitaciones para producción de cantidades grandes de NPHA.

El control de temperatura, velocidad de adición de reactivos y pH son fundamentales en la síntesis de NP (García *et al.*, 2006). La temperatura de reacción determina si los cristales serán monocristalinos o policristalinos. A menos de 60 °C se obtienen los primeros y a más de 60 °C los policristalinos (Ferraz *et al.*, 2004), es decir se forman muchos núcleos donde crecen los cristales pequeños con diferente orientación, usualmente al azar, con algunas irregularidades en la disposición atómica. Esta poli-cristalinidad aumenta la superficie específica. En el presente estudio (Cuadro 1), con la temperatura de reacción mayor a 60 °C, se obtuvieron policristales de HAP. Rivera *et al.* (2010) observaron que la variación del pH durante la precipitación de las NP no afectó la pureza, pero la cristalinidad y la morfología sí se alteraron y el pH alcalino es necesario para la formación de NPHA (García *et al.*, 2006). En el presente estudio, el pH de la reacción se mantuvo en 11, para evitar la formación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - amorfo. La velocidad de adición de los reactivos (1.5 mL min^{-1}) y la temperatura inicial (mayor a 50 °C) favorecieron la nucleación de la NPHA. El flujo rápido de reactivos beneficia la formación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ amorfo (Liu *et al.*, 2001); así, la disminución de la velocidad de adición de reactivo, a la mitad de la propuesta por Ortiz *et al.* (2017), incrementó el tiempo de reacción y el rendimiento. Lo que permitió mejor control en el crecimiento de los cristales, pues al dispersarse mejor se evita la aglomeración.

Eficiencia de la síntesis

La eficiencia de la síntesis se determinó con el contenido de P y Ca en la solución de la síntesis. En el sobrenadante no se detectó P soluble, lo cual implica que éste se consumió por completo en la formación de hidroxiapatita, mientras que la concentración de Ca osciló entre 251.9 y 266.8 mg L^{-1} . La síntesis química permite formar $\text{Ca}(\text{OH})_2$, por el cambio acelerado del pH, esto puede disminuir la concentración del PO_4^{3-} , como especie predominante, y a su vez ser insuficiente para mantener la estequiometría ($\text{Ca/P} = 1.67$) y formar NPHA (Sequeda *et al.*, 2012). Además, debido a que el H_3PO_4 es un ácido triprótico débil, no se disocia completamente, favorece la obtención de NPHA deficiente en Ca (Pretto *et al.*

study (Table 1), NPHA polycrystals were obtained with a reaction temperature higher than 60 °C. Rivera *et al.* (2010) observed that pH variation during NP precipitation did not affect purity, but crystallinity and morphology were altered; alkaline pH is necessary for NPHA formation (García *et al.*, 2006). In this study, the reaction pH was kept at 11, to avoid the formation of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - amorphous. The speed of addition of the reagents (1.5 mL min^{-1}) and the initial temperature (higher than 50 °C) favored the NPHA nucleation. The rapid flow of reagents benefits the formation of amorphous $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Liu *et al.*, 2001); thus, the decrease in reagent addition rate in half of that proposed by Ortiz *et al.* (2017), increased the reaction time and yield. This allowed a better control in the growth of the crystals since better dispersion avoids agglomeration.

Synthesis efficiency

The efficiency of the synthesis was determined by the content of P and Ca in the synthesis solution. Soluble P was not detected in the supernatant, which implies that it was completely consumed in the formation of hydroxyapatite, while the concentration of Ca varied between 251.9 and 266.8 mg L^{-1} . The chemical synthesis allows the formation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$, due to the accelerated change of the pH, this can decrease the concentration of PO_4^{3-} as predominant species, and at the same time be insufficient to maintain the stoichiometry ($\text{Ca/P} = 1.67$) and form NPHA (Sequeda *et al.*, 2012). Besides, since H_3PO_4 is a weak triprotic acid, it does not dissociate completely, favoring attainment of NPHA deficient in Ca (Pretto *et al.*, 2003). This suggests that the efficiency of synthesis and the amount of formed NPHA increases at lower P and higher Ca concentration in the supernatant. In contrast, one of the main disadvantages of the method is the formation of Ca and P salts, different from NPHA (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Therefore, the control of factors such as temperature, speed of reagent addition, and pH is necessary to increase the efficiency of the synthesis; furthermore, to maintain the stoichiometric molar Ca/P ratio in the NPHA (Ledesma-Carrión, 2016). The synthesis efficiency of NPHA in this study was 99.3%.

et al., 2003). Esto sugiere que, a concentración menor de P y mayor de Ca en el sobrenadante, aumenta la eficiencia de la síntesis y la cantidad de NPHA que se forma. En contraste, una de las principales desventajas del método es la formación de sales de Ca y P, distintas a NPHA (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Por lo tanto, el control de factores como temperatura, velocidad de adición de reactivo y pH es necesario para incrementar la eficiencia de la síntesis; además, mantener la relación molar estequiométrica Ca/P en las NPHA (Ledezma-Carrión, 2016). La eficiencia de síntesis de NPHA en el presente estudio fue 99.3%.

Caracterización de NPHA

La caracterización de las partículas sintéticas, como frecuencia de los intervalos de tamaño, morfología, potencial Z, pureza, grupos químicos y concentración de P disponible, demuestra que se obtuvo el tamaño y composición del compuesto objeto de estudio.

Distribución de tamaño y potencial Z

La determinación de la distribución del tamaño de partícula requiere el índice de absorción de las NPHA. Una de estas bandas de absorción máxima es 232 nm, que corresponde a las NPHA del presente estudio. Además, su índice de refracción a 25 °C fue 1.33 nm, similar al del agua (Serway y Jewett, 2004), que fue el medio dispersante de las NP.

La DLS en la mezcla de NPHA de varias síntesis indicaron que el tamaño medio de partícula de las NPHA siguió una distribución monomodal (Stefanic *et al.*, 2017). La distribución del tamaño de partícula no fue homogénea, lo que pudo deberse a la policristalinidad inducida por la agitación y la temperatura. Los registros de frecuencia directa de muestras de NPHA concentradas (a 100%) reflejaron que el tamaño de partícula estuvo centrado en 6.654 nm. Las mezclas diluidas a 50% y a 25% mostraron abundancia de NP de diámetro de 14.47, 28.25, 33.37 y algunas de 132.4 nm, lo que mostró heterogeneidad en los diámetros. El PDI fue 1.000 en todas las muestras y este valor es indicativo de uniformidad (Stefanic *et al.*, 2017); por tanto, la muestra fue poli-dispersa en la suspensión (Figura 1).

NPHA characterization

The characterization of the synthetic particles, such as frequency of size intervals, morphology, Z potential, purity, chemical groups, and available P concentration, shows that the size and composition of the compound under study was obtained.

Size distribution and Z potential

The determination of particle size distribution requires the absorption rate of NPHA. One of these maximum absorption bands is 232 nm, which corresponds to the NPHA of this study. In addition, their refractive index at 25 °C was 1.33 nm, like that of water (Serway and Jewett, 2004), which was the means of dispersion for NPs.

The DLS in the NPHA mixture from various syntheses indicated that the mean particle size of the NPHA followed a monomodal distribution (Stefanic *et al.*, 2017). The particle size distribution was not homogeneous, which could be due to the polycrystallinity induced by agitation and temperature. Direct frequency records of concentrated NPHA samples (at 100%) reflected that the particle size was centered at 6.654 nm. The mixtures diluted at 50% and 25% showed an abundance of NPs with diameters of 14.47, 28.25, 33.37, and some of 132.4 nm, which showed heterogeneity. The PDI was 1.000 in all samples, whose value is indicative of uniformity (Stefanic *et al.*, 2017); therefore, the sample was poly-dispersed in the suspension (Figure 1).

Zeta potential

The pZ made it possible to determine the electrical charges on the surface of the NPHA. Particles with $pZ \geq 30$ mV or ≤ -30 mV are stable (Zetasizer Nano series, 2004). The NPHA mixtures at 100%, 50%, and 25% of this study presented pZ of -35.0, -35.3 and -33.5 mV, respectively (Figure 2). In other samples at 100%, it was -34.6 mV and -35.1 mV, and they were stable in aqueous medium. Therefore, the NPHA of this study were qualified as stable; they behave like the negatively charged colloids of the soil, so no negative effect on plants is expected.

Potencial Zeta

El pZ permitió determinar las cargas eléctricas en la superficie de las NPHA. Las partículas con $pZ \geq 30$ mV o ≤ -30 mV son estables (Zetasizer Nano series, 2004). Las mezclas de NPHA a 100%, 50% y 25% del presente estudio presentaron pZ de -35.0, -35.3 y -33.5 mV, respectivamente (Figura 2). En otras muestras a 100% fue -34.6 mV y -35.1 mV, y fueron estables en medio acuoso. Por lo tanto, las NPHA de este estudio se calificaron como estables; se comportan como los coloides con carga negativa del suelo, por lo que no se espera efecto negativo en las plantas.

La dispersión y distribución de las NPHA depende del tamaño de partícula, pero es conveniente usar un agente dispersante que les confiera estabilidad. En el presente estudio las NPHA se mantuvieron suspendidas en la solución por algunos días, pero eventualmente se sedimentaron y formaron un lecho. Stefanic *et al.* (2017) y Pleixats y Shafir (2017) mostraron que las NPHA forman suspensiones coloidales estables con polietilenglicol y otros polímeros, dendrímeros, b-ciclodextrinas, tensoactivos iónicos y no iónicos y ligandos orgánicos de distinta polaridad. El pZ depende también de la naturaleza del dispersante.

El pH influye en el pZ de las NP; el incremento del pH disminuye el valor del pZ (Cameiro-da-Cunha *et al.*, 2011), lo que permite que predomine la carga negativa y dispersas las partículas (Degen y Kosec, 2000). En el presente estudio, el pH 11 favoreció la estabilidad, ya que mantuvo su carga negativa. Los

The dispersion and distribution of NPHA depend on the particle size, but it is convenient to use a dispersing agent that increases stability. In this study, the NPHA were suspended in the solution for a few days, but eventually, they sedimented and formed a deposit. Stefanic *et al.* (2017) and Pleixats and Shafir (2017) showed that NPHA forms stable colloidal suspensions with polyethylene glycol and other polymers, dendrimers, b cyclodextrins, ionic and non-ionic surfactants, and organic ligands of different polarity. The pZ also depends on the nature of the dispersant.

The pH influences the pZ of NPs; increasing the pH decreases the pZ value (Cameiro-da-Cunha *et al.*, 2011), allowing negative charge to predominate and particles to be dispersed (Degen and Kosec, 2000). In this study, a pH of 11 favored stability since alkalinity maintained its negative charge. Nanoparticles are less stable at pH between 4 and 7.5 because NPs tend to neutralize charges and form aggregates (Zetasizer Nano series, 2004). Similarly, a pH of 11 during the reaction favored the polydispersity of the formed NPHA.

Particle size and morphology

The size ranged between 15.51 and 87.17 nm, and the nanostructure (leaf shape) of the NPHA was observed (Figure 3) by microscopy. Sadat-Shojai *et al.* (2013) described diverse forms of NPHA depending on their obtaining method. The sizes and shapes of the NPHA in this study matched those obtained

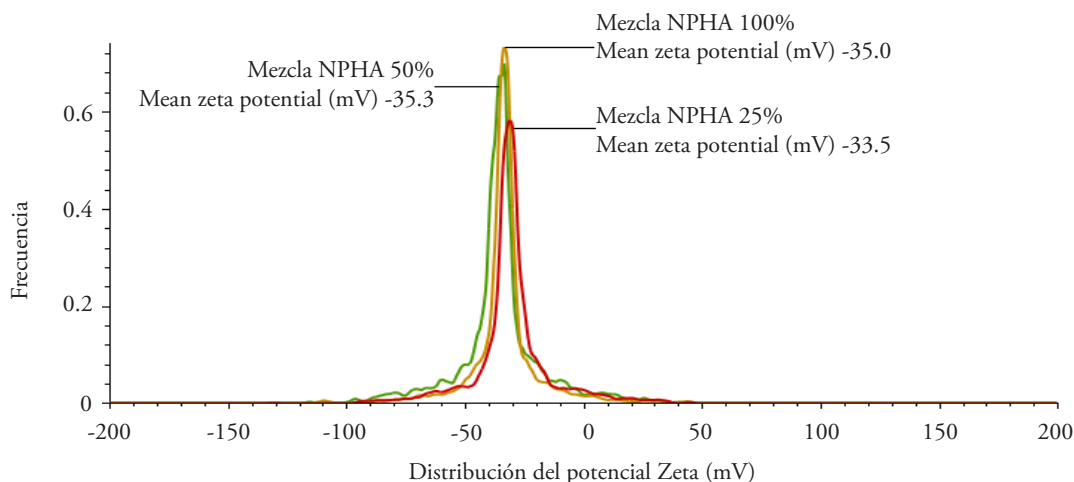


Figura 2. Distribución del potencial zeta de la mezcla de nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA).
Figure 2. Zeta potential distribution of the mixture of hydroxyapatite nanoparticles (NPHA).

sistemas son menos estables en pH entre 4 y 7.5, porque las NP tienden a neutralizar las cargas y formar agregados (Zetasizer Nano series, 2004). De igual manera, un pH de 11 durante la reacción favoreció la polidispersidad de las NPHA formadas.

Morfología y tamaño de partícula

Por microscopía se observó el tamaño entre 15.51 y 87.17 nm y la nanoestructura (forma de hoja) de las NPHA (Figura 3). Sadat-Shojai *et al.* (2013) describieron formas diversas de NPHA en función del método de obtención. Los tamaños y forma de las NP del presente estudio coincidieron con las obtenidas con un método convencional de precipitación química (Sadat-Shojai *et al.*, 2013), pero fueron mayores (3.5 ± 10 nm) a lo reportado por Suvorova y Buffat, (1999).

Pureza de las NP

Los difractogramas de rayos X de la mezcla de NPHA mostraron tres picos máximos estrechos; entre ellos se identificó el correspondiente a NPHA, con la intensidad mayor a $2\theta = 32$, en los picos de difracción que corresponden a los planos 211 y dos menos intensos en $2\theta = 25.5$ y $2\theta = 49$ en los planos 002 y 213. Además, otro pico con intensidad menor prueba la formación de otro fosfato de calcio. El pH es fundamental en la formación de NPHA cristalina

with a chemical precipitation conventional method (Sadat-Shojai *et al.*, 2013), but they were larger (3.5 ± 10 nm) than those reported by Suvorova and Buffat, (1999).

NP purity

X-ray diffractograms of the NPHA mixture showed three narrow maximum peaks; among them, the one corresponding to NPHA was identified, with the highest intensity at $2\theta = 32$ and diffractions peaks corresponding to the planes 211, and two less intense ones at $2\theta = 25.5$ and $2\theta = 49$ in planes 002, and 213. The pH is fundamental in the formation of crystalline NPHA (basic pH), and the order of addition of the reagents during the formation of the crystals and the aging period are the most relevant factors in the formation of NPHA crystals (García *et al.*, 2006). In this regard, the maximums of the X-ray diffraction pattern in this study matched the results in hydroxyapatite nanometric powder reported by Rivera *et al.* (2010).

Functional chemical groups

The regions of the FTIR spectrum that showed the presence of chemical groups were 472.8 , 567.1 , 604.8 , 964.8 , and 1028.4 cm^{-1} , which correspond to PO_4^{3-} group (Figure 4). In addition, the bands in 1418.3 and 877.6 cm^{-1} due to the presence of CO_3^{2-} ;

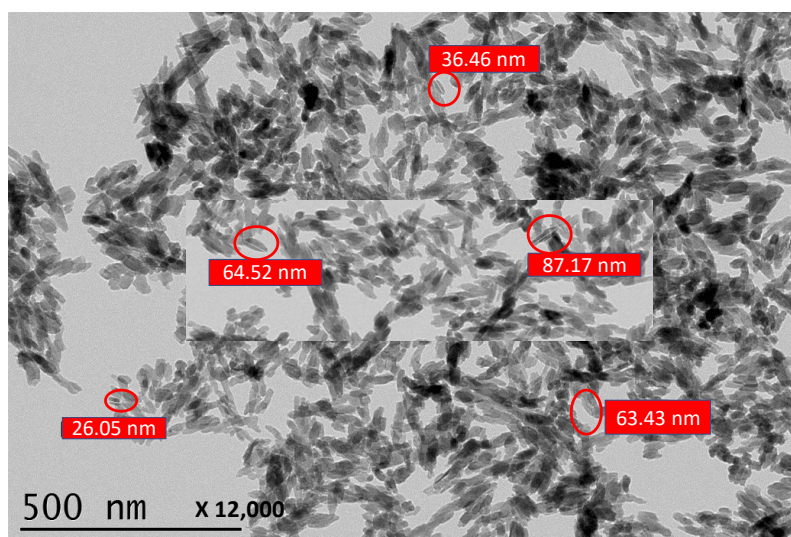


Figura 3. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de hidroxiapatita.
Figure 3. Transmission electron microscopy micrography of hydroxyapatite nanoparticles.

(pH básico), y el orden de adición de los reactivos durante la formación de los cristales y el periodo de envejecimiento son los factores más relevantes en la formación de cristales de NPHA (García *et al.*, 2006). Al respecto, los máximos del patrón de difracción de rayos X del presente estudio coincidieron con los resultados en polvo nanométrico de hidroxiapatita reportado por Rivera *et al.* (2010).

Grupos químicos funcionales

Las regiones del espectro IRTF que mostraron presencia de grupos químicos fueron 472.8, 567.1, 604.8, 964.8 y 1028.4 cm^{-1} , que corresponden a grupos PO_4^{3-} (Figura 4). Además, las bandas en 1418.3 y 877.6 cm^{-1} debido a la presencia de CO_3^{2-} ; éste se forma en la mezcla de reacción a partir del CO_2 atmosférico absorbido durante la síntesis de las NP (Uota *et al.*, 2005). Otras bandas típicas de la HA se presentaron a 3275 y 1639.2 cm^{-1} ; éstas corresponden a la vibración del grupo OH de la estructura de la HA (Uota *et al.*, 2005). El trazo nítido de las bandas mostró la cristalización esperada de HA.

Concentración de fósforo disponible en las NPHA

La concentración de P soluble en las muestras de NPHA, respecto al total, varió de 16.9 a 17.7% (169 588 a 17 7025 mg de P L^{-1}). Estos resultados fueron similares a los reportados por Sequeda *et al.*

carbonates are formed in the reaction mixture from atmospheric CO_2 absorbed during the NP synthesis (Uota *et al.*, 2005). Other typical bands of HA were presented at 3275 and 1639.2 cm^{-1} ; these correspond to the bending of the OH group of the HA structure (Uota *et al.*, 2005). The clear trace of the bands showed the expected crystallization of HA.

Available phosphorus concentration in NPHA

The concentration of soluble P in the NPHA samples, with respect to the total, varied from 16.9 to 17.7 % (169 588 to 17 7025 mg of P L^{-1}). These results were similar to those reported by Sequeda *et al.* These values contrasted with those of the phosphate rock included as a reference in the study, which ranged from 4.2 to 4.7% (40 707 to 47 227 mg P L^{-1}). The national phosphate rocks have variable content of P and the solubility is low in some of them (Ordoñez and Castellanos, 1996). Phosphate richness in Mexican continental rocks, such as Zimapán, is comparable to that of Florida and Morocco, but they contain less citrate-soluble P (Alcántar *et al.*, 2016).

Kinetics of solubility of P in the nutritive solution

The quantification of soluble P in the nutrient solution confirmed its release from the NPHA into this medium (Figure 5). The P solubility was rapid in the first 20 min, but slow after 30 min. The

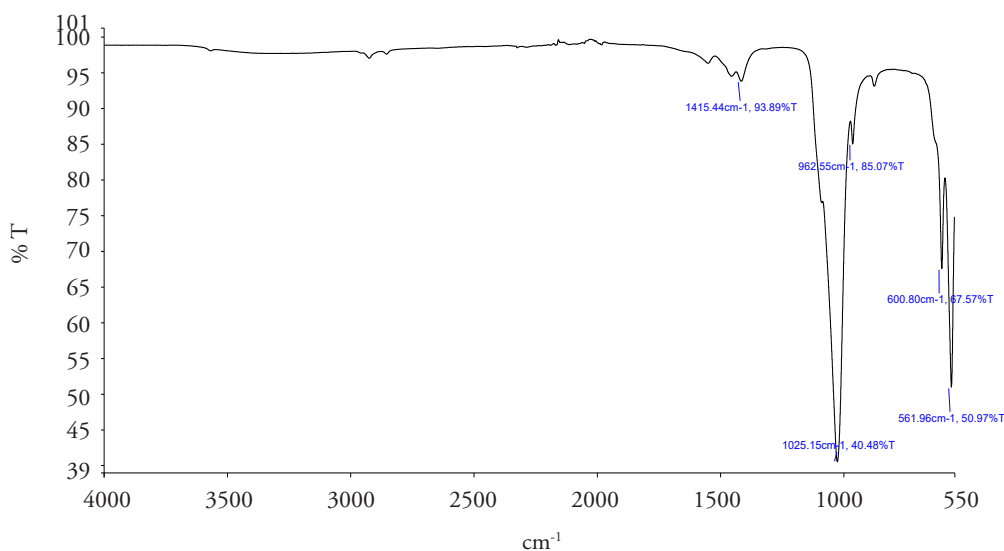


Figura 4. Espectro de IRTF de las nanopartículas de hidroxiapatita producidas por precipitación.
Figure 4. Diffractogram of hydroxyapatite nanoparticles produced by precipitation.

(2012). Estos valores contrastaron con los de la roca fosfórica incluida como referencia en el estudio y que varió entre 4.2 y 4.7% (40 707 a 47 227 mg de P L⁻¹). Las rocas fosfóricas nacionales tienen un contenido variable de P y en algunas la solubilidad es baja (Ordoñez y Castellanos, 1996). La riqueza de fosfatos en las rocas continentales mexicanas, como la de Zimapán, es comparable a las de Florida y Marruecos, pero contienen menos P soluble en citrato (Alcántar *et al.*, 2016).

Cinética de solubilidad de P en solución nutritiva

La cuantificación del P soluble en la solución nutritiva confirmó su liberación de las NPHA a este medio (Figura 5). La solubilidad fue rápida en los primeros 20 min, pero lenta después de 30 min. Esta última se considera responsable del efecto a largo plazo. El P solubilizado fue mayor en la solución nutritiva con K₂HPO₄ (testigo), que el liberado de las NPHA, lo cual se debe a que la liberación depende directamente de la solubilidad de la fuente fosforada. En este caso, el K₂HPO₄ es una sal inorgánica con solubilidad alta en agua (222 g L⁻¹ a 20 °C); por tanto, la liberación fue rápida y alta. De manera común, esta sal se utiliza como fuente de P en los fertilizantes comerciales; la desventaja es que, si el suelo fija P, éste no está disponible para la absorción por las plantas. La solubilidad de P proveniente de las NPHA es baja en medio acuoso; por lo cual la liberación del P fue paulatina (Figura 5). El P liberado en el tratamiento testigo fue 37% más que el solubilizado de las NPHA a los 90 min. La tasa de liberación de P por hora calculada fue 1.11 mg L⁻¹ (R² = 0.95) para el fosfato monobásico de potasio y 0.57 mg L⁻¹ (R² = 0.99) para la hidroxiapatita; por tanto, la liberación de P disminuye en función del tiempo. Esta característica permite asegurar que el P de las NP estará disponible más tiempo en el medio, durante el desarrollo de la planta. Giroto *et al.* (2017) observaron liberación lenta de P de un nanocomposito de urea e hidroxiapatita y alcanzó 90% a las 160 h.

Efecto de NPHA en la germinación de semillas de frijol

La fitotoxicidad o inocuidad de las NPHA puede evaluarse en la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas. Según la especie que se

depleta de la liberación es considerado responsable por el largo-term effect. The solubilized P was higher in the nutrient solution with K₂HPO₄ (control) than the one released from the NPHA, which is due to the release depends directly on the solubility of the phosphorus source. In this case, K₂HPO₄ is an inorganic salt with high water solubility (222 g L⁻¹ at 20 °C); therefore, the release was fast and high. This salt is commonly used as a source of P in commercial fertilizers; the disadvantage is that if the soil fixes P, then it is not available for plant absorption. The solubility of P from NPHA is low in an aqueous medium; therefore, the release of P was gradual (Figure 5). The P released in the control treatment was 37% more than the solubilized P from the NPHAs at 90 min. The calculated hourly P release rate was 1.11 mg L⁻¹ (R² = 0.95) for monobasic potassium phosphate and 0.57 mg L⁻¹ (R² = 0.99) for hydroxyapatite; therefore, P release depleted as a function of time. This characteristic ensures that the P in NP will be available for a longer period in the medium, during the plant's development. Giroto *et al.* (2017) observed slow P release from a urea and hydroxyapatite nanocomposite, and it reached 90% at 160 h.

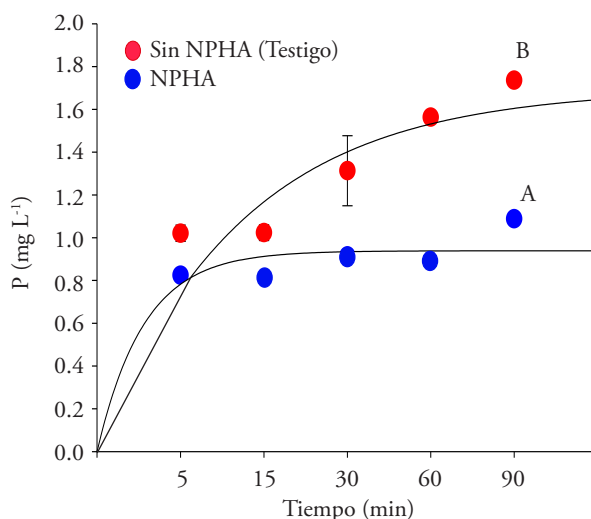


Figura 5. Solubilidad de P de las nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) y KH₂PO₄ en solución de Hoagland.

Figure 5. P solubility of hydroxyapatite nanoparticles (NPHA) and KH₂PO₄ in Hoagland solution.

evalúe, la prueba puede tardar 3 o 4 d. En el presente estudio las semillas de frijol germinaron en 2 o 3 d. En el testigo (sin NPHA), en presencia de NPHA, e independiente de la concentración de P (250 a 1000 $\mu\text{moles de P L}^{-1}$) se obtuvo 100% de germinación (Cuadro 2; Figura 6A). Esto mostró la inocuidad de las NPHA en la germinación. Los resultados coincidieron con los reportados por Ortiz *et al.* (2017) con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), en las que no detectaron toxicidad o inhibición aguda de la germinación por NPHA. En contraste, Bala *et al.* (2014) y Liu *et al.* (2015) observaron incremento en la germinación de la semilla y el crecimiento de la

NPHA effect on bean seeds germination

The phytotoxicity or safety of NPHAs can be evaluated in the germination of the seeds and the growth of the seedlings. The test can take 3 or 4 d, depending on the species being evaluated. In this study, bean seeds germinated in 2 or 3 d. In the control (without NPHA), in the presence of NPHA, and independently from the concentration of P (250 to 1000 $\mu\text{mol of P L}^{-1}$), 100% germination was obtained (Table 2; Figure 6A). This showed the innocuousness of the NPHAs in the germination. The results matched those reported by Ortiz *et al.* (2017) with

Cuadro 2. Germinación (porcentaje), biomasa fresca y seca en las plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a 25 ± 1 °C con y sin nanopartículas de hidroxapatita (NPHA) y contenido de P en la plántula.

Table 2. Germination (percentage), fresh and dry biomass in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings at 25 ± 1 °C with and without hydroxyapatite nanoparticles (NPHA), and P content in the seedling.

P ($\mu\text{moles L}^{-1}$) en NPHA	Germinación (%)	Biomasa fresca (g)	Biomasa seca (g)	Contenido de P ($\mu\text{moles L}^{-1}$)	
				Eje embrionario	Cotiledones
0	100	1.51 a	0.35 a	7506 ab	6706 b
250	100	1.23 b	0.35 a	7040 ab	6370 b
500	100	1.18 b	0.35 a	6444 b	10605 a
750	100	1.21 b	0.34 a	7416 ab	6071 b
1000	100	1.24 b	0.35 a	8357 a	7000 b

Medias con letras diferentes en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey; $p \leq 0.05$). n=50. ♦ Means with different letters in columns indicate significant statistical differences (Tukey; $p \leq 0.05$). n=50.

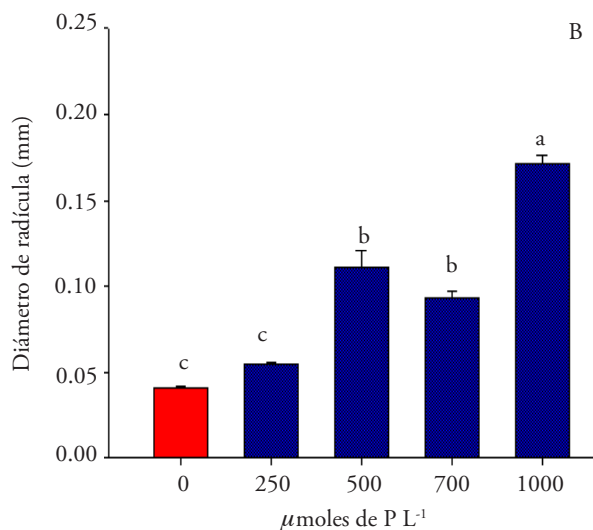
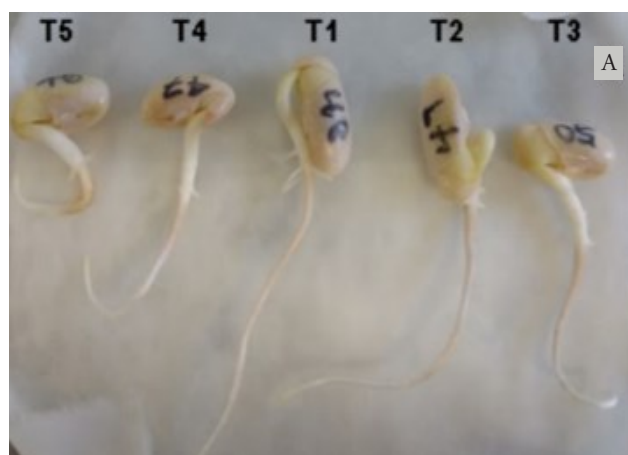


Figura 6. A) Semillas germinadas de frijol. B) Diámetro de radícula de plántulas de semillas embebidas en suspensiones de nanopartículas de hidroxapatita (NPHA; T1: 0 (testigo), T2: 250, T3: 500 T4: 750 y T5: 1000 $\mu\text{moles de P L}^{-1}$).

Figure 6. A) Sprouted bean seeds. B) Radicle diameter of seeds seedlings embedded in hydroxyapatite nanoparticles suspensions (NPHA; T1: 0 (control), T2: 250, T3: 500 T4: 750 and T5: 1000 $\mu\text{mol of P L}^{-1}$).

planta de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), así como en el porcentaje de germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.) a una concentración de 1000 mg L⁻¹ de NPHA.

Efecto de NPHA en el crecimiento de la raíz de plántulas de frijol

Las diferencias en la longitud de la raíz de las plántulas no fueron significativas (24 h después de la emergencia), en el intervalo de concentración entre 250 y 500 μ moles de P L⁻¹ proveniente de las NPHA. En contraste, con las concentraciones de 750 y 1000 μ moles de P L⁻¹ su crecimiento longitudinal disminuyó 23.7 y 48.0%, respecto al testigo. Esto coincidió con lo descrito por Liu *et al.* (2015) en sus experimentos de toxicidad aguda en semillas de pepino. Ellos evaluaron NPHA a una concentración equivalente a 2000 mg L⁻¹ de P y observaron 20% de inhibición en el crecimiento de la raíz. La presencia de NPHA modificó parcialmente el patrón de crecimiento de la raíz, con disminución en la longitud y aumento del diámetro (Figura 7 B), lo que se podría relacionar con el balance de nutrientes en el medio de

lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.), in which they did not detect toxicity or acute inhibition of germination by NPHA. In contrast, Bala *et al.* (2014) and Liu *et al.* (2015) observed increased seed germination and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.), as well as the germination rate of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds at a concentration of 1000 mg L⁻¹ NPHA.

NPHA effect on the root growth of bean seedlings

The differences in root length of the seedlings were not significant (24 h after emergence), in the concentration interval between 250 and 500 μ mol of P L⁻¹ of NPHA. In contrast, with the concentrations of 750 and 1000 μ mol of P L⁻¹, the longitudinal growth decreased 23.7 and 48.0%, with respect to the control. These results are in line with the report of Liu *et al.* (2015) about the toxicity experiments on cucumber seeds. They evaluated the addition of NPHA at a concentration equivalent to 2000 mg L⁻¹ of P and observed 20% inhibition in root growth. The presence of NPHA partially modified the root growth pattern, reduced the longitude, but increased the diameter (Figure 7 B), which could be

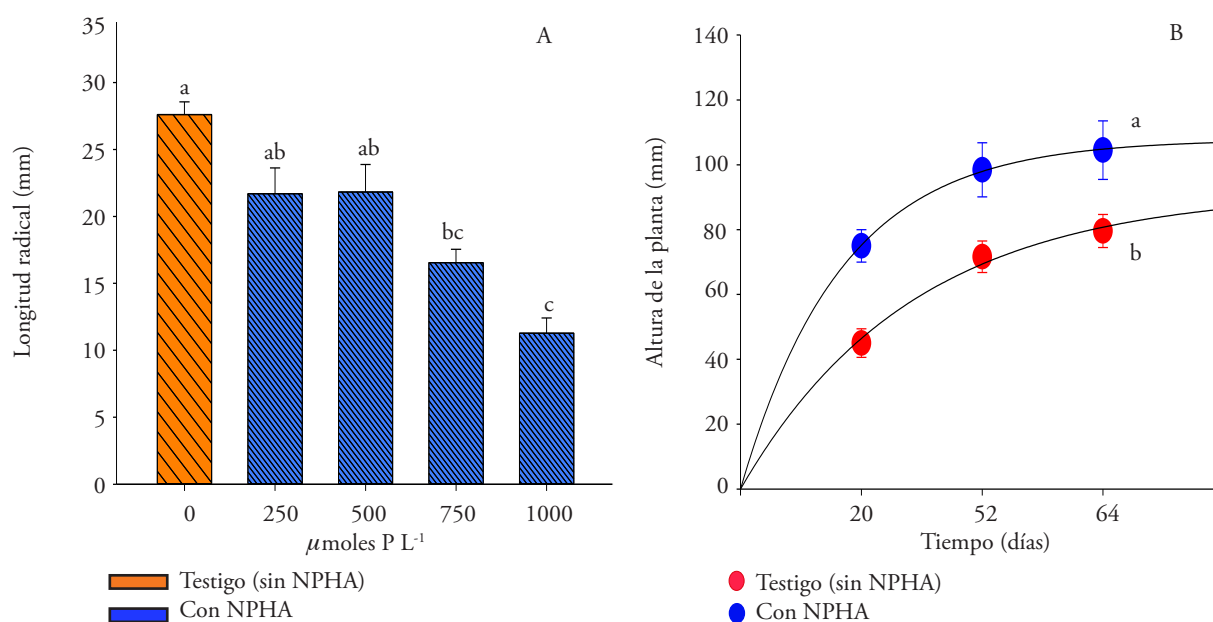


Figura 7. A) Longitud radical de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.; semillas embebidas en suspensiones de nanopartículas de hidroxiapatita NPHA; 250 a 1000 μ moles de P L⁻¹), n = 10. B) Altura de plantas de frijol sin NPHA y con NPHA (20 μ moles de P L⁻¹).

Figure 7. A) Root length of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.; seeds embedded in NPHA hydroxyapatite nanoparticle suspensions; 250 to 1000 μ mol of P L⁻¹), n = 10. B) Height of bean plants without NPHA and with NPHA (20 μ mol of P L⁻¹).

crecimiento (Ward *et al.*, 2008) y la disponibilidad de P, pues Hajabbasi y Shumacher (1993) reportan incremento de la superficie de absorción de la raíz al aumentar la dosis de P en el medio. La arquitectura de la raíz es fuertemente modificada por la disponibilidad de P (Wiliamson *et al.*, 2001). Las raíces del testigo fueron más delgadas (0.06 mm) pero el diámetro aumentó en las que crecieron en presencia de las NPHA (0.17 mm; Figura 6A; tratamientos T3 a T5).

La biomasa fresca de las plántulas del tratamiento testigo fue mayor que la de los otros tratamientos, y es posible que el contenido de agua en las raíces expuestas a las NPHA se haya reducido. Pues la biomasa seca fue similar entre ellos, por lo que la raíz no modificó su crecimiento, independiente de la concentración de NPHA (Cuadro 2).

Contenido de P en las estructuras seminales de frijol

El contenido de P en el eje embrionario fue mayor en las semillas expuestas a la concentración máxima de NPHA ($1000 \mu\text{mol L}^{-1}$), aunque en las plantas sometidas a los tres primeros tratamientos no hubo cambios respecto al testigo. En contraste, el contenido de P en los cotiledones fue mayor sólo a una concentración de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPHA, y entre los otros tratamientos no hubo diferencias (Cuadro 2).

Al considerar los resultados de concentración de P, se puede argumentar absorción y transporte de fósforo proveniente de NPHA en las estructuras seminales del frijol. Según Corredor *et al.* (2009), otras partículas nanométricas entran en los tejidos. Así mismo, las NPHA en *Glycine max* aumentaron la tasa de crecimiento y el rendimiento de las semillas en 32% y 20%, respectivamente, en comparación con un fertilizante fosforado a granel (Liu y Lal, 2014). La concentración de P en vástago del testigo (840 mg kg^{-1}) fue muy semejante al tratado con NPHA (851 mg kg^{-1}); en la raíz fue menor en ambos casos (1.3 y 1.65 mg kg^{-1} , respectivamente) y fueron diferente en las plantas testigos y las tratadas con NPHA.

Efecto de NPHA en el crecimiento de las plantas de frijol

La altura de las plantas aumentó exponencialmente hasta 65 d después de la siembra. En presencia de

related to the nutrient balance in the growth medium (Ward *et al.*, 2008), and the availability of P, since Hajabbasi and Shumacher (1993) reported a rise in the root absorption surface area by increasing the dose of P in the medium. The root architecture is strongly modified by P availability (Wiliamson *et al.*, 2001). The control roots were thinner (0.06 mm), but the diameter increased in those that grew in the presence of NPHA (0.17 mm; Figure 6A; T3 to T5 treatments).

The fresh biomass of the control treatment seedlings was higher than the other treatments, and the water content in the roots exposed to NPHA may have been reduced. As the dry biomass was similar between them, the root did not modify its growth, regardless of the NPHA concentration (Table 2).

P content in the seminal bean structures

The P content in the embryonic axis was higher in seeds exposed to the maximum concentration of NPHA ($1000 \mu\text{mol L}^{-1}$), although in plants subjected to the first three treatments there were no changes concerning the control. In contrast, P content in cotyledons was higher only at a concentration of $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ NPHA, and among the other treatments, there were no differences (Table 2).

When considering the results of P concentration, the absorption and transport of phosphorus from NPHA in the seminal structures of the bean can be argued. According to Corredor *et al.* (2009), other nanometric particles enter the tissues. Likewise, NPHAs in *Glycine max* increased growth rate and seed yield by 32% and 20%, respectively, compared to a regular phosphorous fertilizer (Liu and Lal, 2014). P concentration in the control stem (840 mg kg^{-1}) was very similar to the one treated with NPHA (851 mg kg^{-1}); P concentration in the root was lower in both cases (1.3 and 1.65 mg kg^{-1} , respectively), and was different in the control and NPHA-treated plants.

NPHA effect on bean plant growth

The height of the plants increased exponentially up to 65 d after planting. In the presence of NPHA, height increased by 66.7, 37.4, and 31.3% at 20, 53, and 65 d after planting, respectively; and was different from the height of control plants

NPHA, la altura aumentó en 66.7, 37.4 y 31.3% a los 20, 53 y 65 d después de la siembra, respectivamente; y fue diferente con respecto a la altura de plantas testigo (Figura 7B). No hubo diferencias estadísticas en la producción de inflorescencias (número), peso, ni longitud de vainas (Figura 8), pero la liberación de P de la NPHA fue suficiente para el crecimiento de la planta hasta la reproducción.

El peso y longitud de las vainas fue similar en los tratamientos con y sin NPHA (Figura 8B-C). Las NPHA como fertilizante de P son eficientes y permiten el desarrollo de estructuras reproductivas. Liu y Lal (2014) indicaron que las raíces de *G. max* absorbieron NPHA, fueron fuente de P y mantuvieron crecimiento saludable.

El intervalo de temperatura para el desarrollo óptimo de las plantas de frijol es 15 a 27 °C (Lardizabal *et al.*, 2013). El periodo de cultivo, primavera-verano de 2018, en el que se desarrolló el estudio fue atípicamente caluroso (CONAGUA, 2018). En el invernadero, aun con la ventilación, la temperatura fue superior a la óptima (entre 28 y 41 °C), 96% de los días de la etapa reproductiva (de prefoliación a llenado de semilla). Además, en

(Figure 7B). There were no statistical differences in inflorescence production (number), weight, neither pods length (Figure 8), but the P release from NPHA was enough for plant growth until reproduction.

The weight and length of the pods were similar in the treatments with and without NPHA (Figure 8B-C). NPHA as a P fertilizer is efficient and allows the development of reproductive structures. Liu and Lal (2014) indicated that *G. max* roots absorbed P, NPHA were a source of P and maintained healthy growth.

The temperature range for optimal development of bean plants is 15 to 27 °C (Lardizabal *et al.*, 2013). The cultivation period in which the study was developed (spring-summer 2018) was atypically hot (CONAGUA, 2018). In the greenhouse, even with ventilation, the temperature was higher than optimal (between 28 and 41 °C) 96% of the days of the reproductive stage (from pre-foiation to seed filling). In addition, in 37% of those days, there was some period of up to 5 h with temperatures above the maximum (34 °C) for bean growth, so it is assumed that the yield and its components were affected (data not shown).

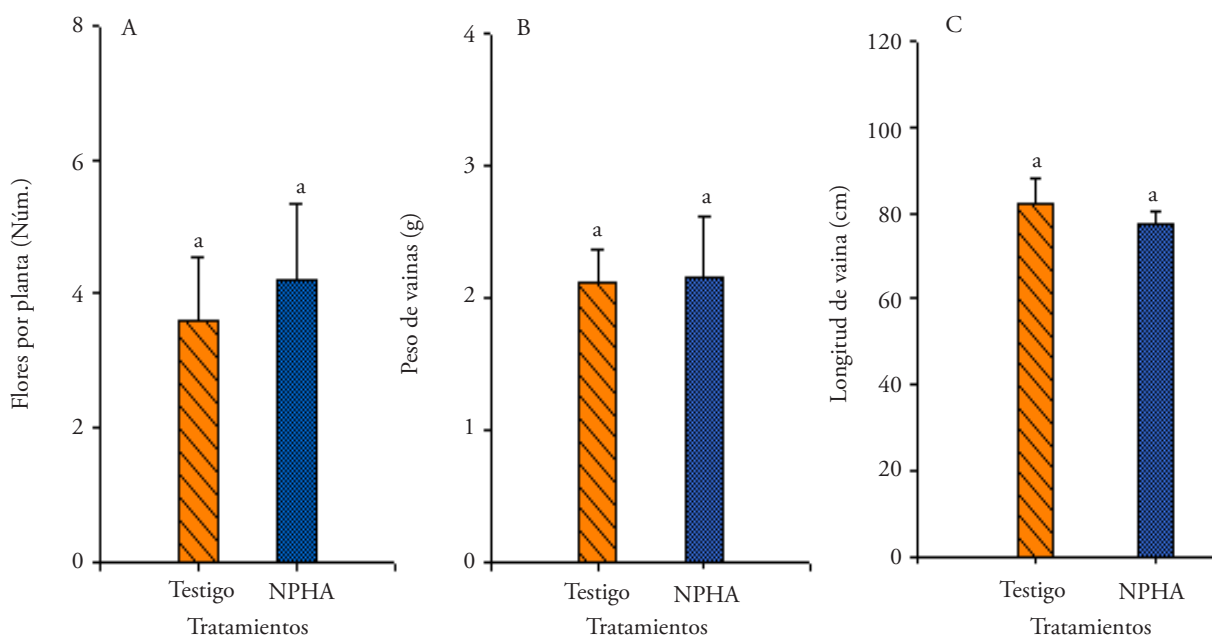


Figura 8. Inflorescencias en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), al inicio de la floración (A), peso (B) y longitud de vaina (C). Testigo (sin NPHA) y con NPHA (20 μ moles de P L⁻¹).

Figure 8. Inflorescences in bean (*Phaseolus vulgaris* L.), at the beginning of flowering (A), weight (B) and pod length (C). Control (without NPHA), and with NPHA (20 μ mol of P L⁻¹).

37% de esos días hubo algún periodo de hasta 5 h con temperaturas superiores a la máxima ($> 34\text{ }^{\circ}\text{C}$) para el crecimiento de frijol, por lo cual se asume que el rendimiento y sus componentes se afectaron (datos no presentados). Por tanto, se consideró que el experimento no fue representativo.

CONCLUSIONES

Las NPHA, obtenidas mediante la adaptación del método de síntesis química vía húmeda, tuvieron forma de hoja y menor diámetro al reportado por otros autores. Estas nanopartículas no fueron tóxicas en la germinación de semillas de frijol. Sin embargo, el crecimiento longitudinal de la raíz de las plántulas se afectó con concentraciones mayores a $750\text{ }\mu\text{moles P L}^{-1}$. El P de las NPHA, aplicado en $20\text{ }\mu\text{moles}$ en medio hidropónico, promovió un mayor crecimiento de las plantas de frijol en comparación con las fertilizadas con KH_2PO_4 .

La síntesis de NPHA puede ser una alternativa para la liberación controlada de P en la nutrición de las plantas y reducir las pérdidas del elemento aportado por fertilizantes tradicionales; sin embargo, se debe continuar con esta línea de investigación.

AGRADECIMIENTOS

La primera autora recibió una beca CONACYT durante sus estudios de Maestría en Ciencias. Se reconoce la crítica constructiva de los revisores anónimos que ayudaron a mejorar el manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Alcántar, G. G., L. I. Trejo T., y F. C. Gómez M. 2016. Nutrición de Cultivos, 2ª edición. Ed. Fundación Colegio de Postgraduados. México. 454 p.
- Bala, N., A. Dey, S. Das, R. Basu, and P. Nandy. 2014. Effect of hydroxyapatite nanorod on chickpea (*Cicer arietinum*) plant growth and its possible use as nano-fertilizer. Iran. J. Plant Physiol. 4: 1061-1069.
- Billard, C. E., C. A. Dalzotto, y V. H. La llana. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. Polibotánica. 38: 69-81.
- Brzezińska-Miecznik, J., K. Haberko, M. Sitarz, M. M. Bućko, and B. Macherzyńska. 2015. Hydroxyapatite from animal bones - Extraction and properties. Ceramics Int. 41: 4841-4846.
- Cameiro-da-Cunha, M., M. A. Cerqueira., B. W. S. Souza, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente. 2011. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean

Therefore, it was considered that the experiment was not representative.

CONCLUSIONS

The NPHA, obtained through the adaptation of the wet chemical synthesis, had a leaf shape and smaller diameter than those reported by other authors. These nanoparticles were not toxic in bean seed germination. However, seedlings' longitudinal root growth was affected with concentrations higher than $750\text{ }\mu\text{mol P L}^{-1}$. The P of NPHA, applied at $20\text{ }\mu\text{mol}$ in a hydroponic medium, promoted a higher growth of bean plants compared to those fertilized with KH_2PO_4 .

NPHA synthesis can be an alternative for the controlled release of P in plant nutrition and reduce losses of the element provided by traditional fertilizers; however, this research topic should be further investigated.

—End of the English version—

-----*-----

- hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered film production. Carbohydrate Polymers. 85: 522-528.
- CONAGUA. 2018. Reporte de Clima en México. Año 8, Núm. 7. <https://smn.cna.gob.mx/tools/DATA/Climatolog%C3%ADa/Diagn%C3%B3stico%20Atmosf%C3%A9rico/Reporte%20del%20Clima%20en%20M%C3%A9xico/RC-Julio18.pdf> (Consulta: octubre 2018).
- Corredor, E., P. S. Testillano, M. J. Coronado, P. González-Melendi, R. Fernández-Pacheco, C. Marquina, M. R. Ibarra, et al. 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin Plants: In situ subcellular identification. BMC Plant Biol. 9. doi:10.1186/1471-2229-9-45.
- Degen, A., and M. Kosec. 2000. Effect of pH and impurities on the surface of zinc oxide in aqueous solution. J. Eu. Ceram. Soc. 20: 667-673.
- Eichert, D., C. Drouet, H. Sfhia, C. Rey, and C. Combes. 2009. Nanocrystalline Apatite-Based Biomaterials. Nova Science Publisher, Inc. New York, USA. pp: 3 – 8.
- Engin, N. Ö., and A. C. Tas. 2000. Preparation of porous $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bioceramics. J. Am. Ceram. Soc. 83: 1581-84.
- Ferguson, J. M. 1993. AOSA perspective of seed vigor testing. J. Seed Technol. 17: 101-104
- Ferraz M. P., F. J. Monteiro, and C. M. Manuel. 2004. Hydroxyapatite nanoparticles. J. Appl. Biomater. 2: 74-80.

- García, C., C. Páucar, and J. Gaviria. 2006. Study of some parameters that determine the synthesis of hydroxyapatite by the precipitation route. *Dyna Rev. Fac. Nal. Minas* 73: 9-15.
- Giroto, A. S., Gelton G. F. Guimarães, M. F. and C. Ribeiro. 2017. Role of slow-release nanocomposite fertilizers on nitrogen and phosphate availability in soil. *Scientific Reports* 7 (April). Nature Publishing Group. doi:10.1038/srep46032.
- Hajabbasi, M. A., and T. E. Schumacher. 1994. Phosphorus effects on root growth and development in two maize genotypes. *Plant and Soil* 158: 39-46.
- Jenkins, Von R., and R. L. Snyder, 1996. *X-ray Powder Diffraction: An Introduction*. John Wiley & Sons, New York. 391 p.
- Kale, P. A., and N. Gawade, S., 2016. Studies on nanoparticle induced nutrient use efficiency of fertilizer and crop productivity. *Green Chem. Technol. Letters* 2, 88. doi:10.18510/gctl.2016.226
- Koornneef, M., L. Bentsink, and H. Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36.
- Kumar, R., K. H. Prakash, P. Cheang, and K. A. Khor. 2004. Temperature driven morphological changes of chemically precipitated hydroxyapatite nanoparticles. *Langmuir* 20: 5196-5200.
- Lardizabal, R., S. Arias, y R. Segura. 2013. Manual de Producción de Frijol. USAID. file:///C:/Users/User/Downloads/Manual-Frijol-ACCESO%20(2).pdf (Consulta: noviembre 2018).
- Ledesma-Carrión, D. E. 2016. Optimization of Synthesis Process of Nano-Hydroxyapatite. Springer Science Business Media Singapore. Yang G. C., I. Ao S., X. Huang, and O. Castillo (eds). *Trans. Engin. Tech.* pp: 143-153.
- Liu R., and R. Lal. 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Scientific Reports* 4:5686.
- Liu, C., Y. Huang, W. Shen W., and J. Cui. 2001. Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11. *Biomaterials* 22: 301-306.
- Liu, W., S. Wang, H. Sun, O. Zuo, Y. Lai, and J. Hou. 2015. Impact of nanometer hydroxyapatite on seed germination and root border cell characteristics. *RSC Advances*. 5: 82726-82731.
- Lu, C. M., C. Y. Zhang, J. Q. Wen, G. R. Wu, and M. X. Tao. 2002. Research on the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Sci* 21:68-172.
- Malvern Panalytical. 2018. Zeta Potential Theory. In: Malvern Instruments Zetasizer nano Series User Manual. Malvern, Worcestershire, UK.
- Millner, P. D., and D. G. Kitt. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Microbial Systems Laboratory, United States Department of Agricultura. Mycorrhiza* 2: 9-15.
- Murphy, J., and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Anal. Chem. Acta* 27: 31-36
- Ortiz, C. G., R. Carrillo-González, C. A. González-Chávez M., and L. J. López. 2017. Hydroxyapatite nanoparticles synthesis and their toxicity on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agroproductividad* 10: 98-105.
- Pleixats, R., and A. Shafir. 2017. Nanopartículas metálicas solubles para catálisis. *Anal. Quím.* 113: 92-99.
- Preto, M., A. L. Costa, E. Landi, A. Tampieri, and C. Galassi C. 2003. Dispersing behavior of hydroxyapatite powders produced by wet-chemical synthesis. *J. Am. Ceram. Soc.* 86: 1534-1539.
- Rico, C. M., S. Majumdar, and M. Duarte-Gardea. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.* 59: 3485-3498.
- Rivera, J. A., G. Fetter, y P. Bosch. 2010. Efecto del pH en la síntesis de hidroxiapatita en presencia de microondas. *Rev. Materia.* 15: 506-515.
- Sadat-Shojai, M., M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi. 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures. *Acta Biometer.* 9: 7591-7621.
- Sequeda, L. G., J. M. Díaz, S. J. Gutiérrez, S. J. Perdomo, y O. L. Gómez. 2012. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Rev. Colomb. Cienc. Quím.Farm.* 41: 50-66.
- Serway, R. A., and J. W. Jewett. 2004. *Physics for Scientists and Engineers*. Thomson-Brooks/Cole. USA. 1296 p.
- Shaw, A. K., and Z. Hossain. 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* 93: 906-915.
- Solanki, P., A. Bhargava, H. Chipa, N. Jain, and J. Panwar. 2015. Nano-fertilizers and their smart delivery system. In: Rai, M., C. Ribeiro, and L. Mattoso, N. Duran (eds). *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. Springer, Cham. pp: 81-101.
- Stampoulis, D., K. Sinha K., and J. C. White. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 43: 9473-9479.
- Stefanic, M., K. Ward, H. Tawfik, R. Seemann, V. Baulin, Y. Guo, and C. Drouet. 2017. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation. *Biomaterials* 140: 138-149.
- Suvorova E. I., and P. A. Buffat. 1999. Electron diffraction from micro-and nanoparticles of hydroxyapatite. *J. Microscopy.* 196: 46-58.
- Uota, M., H. Arakawa, N. Kitamura, T. Yoshimura, J. Tanaka, and T. Kijima. 2005. Synthesis of high surface area hydroxyapatite nanoparticles by mixed surfactant-mediated approach. *Langmuir* 21: 4724-4728.
- Wang, X., C. Sun, S. Gao, L. Wang, and H. Shuokui. 2001. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosph.* 44: 1711-1721.
- Wang, Z., X. Xie, J. Zhao, X. Liu, W. Feng, J. C. White, and B. Xing. 2012. Xylem-and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environ. Sci. Technol.* 46: 4434-4441.
- Ward, J. T., B. Lahner, E. Yakubova, D. E. Salt, and K. G. Raghothama. 2008. The effect of iron on the primary root elongation of Arabidopsis during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 147: 1181-1191.

- Williamson, L. C., S. P. C. P. Ribrioux, A. H. Fitter, and H. M. Ottoline Leyser. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 875–882.
- Yang, F., C. Liu, F. Gao, M. Su, X. Wu, L. Zheng, F. Hong, and P. Yang. 2007. The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO_2 treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biol. Trace Elem. Res.* 119: 77–88.
- Zhao, L., J. R. Peralta-Videa, C. M. Rico, J. A. Hernández-Viecas, Y. Sun, G. Niu, M. Duarte-Gardea, and J. L. Gardea-Torresdey. 2014. CeO_2 and ZnO nanoparticles change the nutritional qualities of cucumber (*Cucumis sativus*) J. *Agric. Food Chem.* 62: 2752–2759.
- Zhou, H., and J. Lee. 2011. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 7: 2769–2781.
- Zou, Z., K. Lin, L. Chen, and J. Chang. 2012. Ultrafast synthesis and characterization of carbonated hydroxyapatite nanopowders via sonochemistry-assisted microwave process. *Ultrasonics Sonochem.* 19: 1174–1179.

ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON NITRÓGENO A BASE DE UREA PARA USO AGRÍCOLA

PREPARATION OF UREA-BASED NITROGEN NANOPARTICLES FOR AGRICULTURAL USE

Miguel A. Cruz-Hernández¹, Elba Ronquillo-de Jesús², Abel Nolasco-Quevedo¹, María de J. Perea-Flores³, Erwin San Juan-Martínez⁴, Libia I. Trejo-Téllez¹, Miguel A. Aguilar-Méndez^{4*}

¹Edafología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230. Montecillo, Estado de México. ²Dirección de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Tepatepec, Hidalgo. 42660, México. ³Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, Instituto Politécnico Nacional, Avenida Luis Enrique Erro S/N, Ciudad de México. 07738, México. ⁴CICATA Unidad Legaria, Instituto Politécnico Nacional, Calzada Legaria No. 694, Ciudad de México, 11500, México. (maguilarme@ipn.mx)

RESUMEN

La aplicación de la nanotecnología para el diseño de materiales de utilidad en la agricultura ha tomado importancia en años recientes. El objetivo de esta investigación fue elaborar, por medio de secado por aspersión, un nanofertilizante con base en alginato de sodio y urea. Los compuestos de prueba se caracterizaron con microscopía electrónica de barrido (MEB), energía dispersiva de rayos X (EDS), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y potencial Zeta. Las nanopartículas obtenidas tuvieron forma esférica, superficie lisa, tamaño promedio de 600 nm. y carga superficial de -39 ± 3 mV. Los resultados de FTIR, DSC y EDS corroboraron la presencia y distribución homogénea de la urea en la matriz polimérica. Las características presentadas por las partículas son adecuadas para continuar su evaluación en un sistema de liberación lenta porque se puede controlar la descarga del fertilizante.

Palabras clave: nanopartícula, alginato, nitrógeno, urea, secado por aspersión

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es esencial en los cultivos porque es parte de los aminoácidos, proteínas, clorofila, y componentes en las membranas celulares. El nitrógeno estimula el crecimiento de la planta, en especial en la etapa vegetativa inicial, incrementa el

ABSTRACT

The use of nanotechnology for the design of useful materials in agriculture has become important in recent years. The objective of this research was aimed at preparing a nano-fertilizer based on sodium alginate and urea, by means of spray drying. The test compounds were characterized with scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray (EDS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and Zeta potential. The obtained nanoparticles had a spherical shape, a smooth surface, an average size of 600 nm and a surface charge of -39 ± 3 mV. The results of FTIR, DSC and EDS corroborated the presence and homogeneous distribution of urea in the polymer matrix. The characteristics presented by the particles are suitable for further evaluation in a slow-release system since the discharge of the fertilizer can be controlled.

Key words: Nanoparticle, alginate, nitrogen, urea, spray drying.

INTRODUCTION

Nitrogen is essential in crops because it is part of the amino acids, proteins, chlorophyll, and components in the cell membranes. Nitrogen stimulates plant growth, especially in the initial vegetative stage, increases leaf area index and prolongs leaf life. In addition, it increases the number of sprouts during flowering, and the number of flowers and yield (Xiaoyu *et al.*, 2013; Leghari *et al.*, 2016). Urea is one of the most important commercial nitrogenous fertilizers. However, its application on the soil involves significant nitrogen losses due to the volatilization of NH_3 into the atmosphere and

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 1031-1041. 2020.

índice de área foliar y prolonga la vida foliar. Además, aumenta el número de brotes durante la floración, el número de flores y el rendimiento (Xiaoyu *et al.*, 2013; Leghari *et al.*, 2016). La urea es uno de los fertilizantes nitrogenados comerciales más importantes. Sin embargo, su aplicación en el suelo involucra pérdidas significativas de nitrógeno por la volatilización de NH_3 a la atmósfera y la emisión de gases de efecto invernadero (Yamamoto *et al.*, 2016). Las plantas no aprovechan 40 a 70% del nitrógeno aplicado en fertilizantes convencionales debido a que se pierde en el ambiente (Solanki *et al.*, 2015).

La demanda creciente de fertilizantes y la necesidad urgente de un uso más eficiente de estos materiales llevaron al desarrollo de nanofertilizantes con características de liberación lenta o controlada. Los nanofertilizantes son productos nanométricos que proveen nutrimentos a un cultivo y tienen el potencial de superar en gran medida a los fertilizantes convencionales, porque podrían proporcionar mecanismos para sincronizar la liberación de los nutrimentos de acuerdo con la absorción de los cultivos; esto debido a la no interacción de los compuestos con el suelo, el agua y los microorganismos (DeRosa *et al.*, 2010). Los fertilizantes basados en la nanotecnología tendrían la capacidad de mejorar el crecimiento y rendimiento de los cultivos, mejorar la eficiencia en el uso de fertilizantes, reducir la pérdida de nutrimentos y minimizar los impactos ambientales adversos (Liu and Lal, 2015).

La definición de “nano” depende de cada disciplina ya que en el área de alimentos y agricultura se emplean sistemas “multicomponentes” de tamaños mayores a 100 nm que presentan propiedades únicas y diferentes a las de los mismos materiales, pero en una escala mayor. De acuerdo con Mastronardi *et al.* (2015), para el caso específico de fertilizantes y suplementos, el término “nano” aplica para los materiales con una, dos o tres dimensiones menores a 1000 nm, que exhiben propiedades únicas no vistas en los materiales en bulto. En dicho sentido, el término “nanopartícula” es acorde con las características de los materiales reportados. Es pertinente comentar que, a manera de soporte de lo ya expuesto, nuestro grupo ha efectuado estudios relacionados con la elaboración y aplicación de nanofertilizantes con características similares a las del material consignado aquí (Miranda-Villagómez *et al.*, 2019a; 2019b; San Juan-Martínez *et al.*, 2020).

the emission of greenhouse gases (Yamamoto *et al.*, 2016). Plants do not take advantage of 40 to 70% of the nitrogen applied in conventional fertilizers because it is lost in the environment (Solanki *et al.*, 2015).

The growing demand for fertilizers and the urgent need for more efficient use of these materials led to the development of nano-fertilizers with slow or controlled release characteristics. Nanofertilizers are nanometric products that provide nutrients to a crop and have the potential to greatly surpass conventional fertilizers because they could provide mechanisms to synchronize the release of nutrients according to the absorption of the crops; this is due to the non-interaction of the compounds with the soil, water, and microorganisms (DeRosa *et al.*, 2010). Nanotechnology-based fertilizers would have the capacity to improve crop growth and yield, improve fertilizer use efficiency, reduce nutrient loss, and minimize adverse environmental impacts (Liu and Lal, 2015).

The definition of “nano” depends on each discipline, since in the area of food and agriculture, “multi-component” systems of sizes greater than 100 nm are used that possess unique and different properties to those of the same materials, but on a larger scale. According to Mastronardi *et al.* (2015), for the specific case of fertilizers and supplements, the term “nano” applies to materials with one, two or three dimensions smaller than 1000 nm, which display unique properties not seen in bulk materials. In this sense, the term “nanoparticle” is in accordance with the characteristics of the reported materials. It is pertinent to note that, as a background of what has already been exposed, our group has carried out studies related to the preparation and application of nanofertilizers with similar characteristics to those of the material consigned here (Miranda-Villagómez *et al.*, 2019a; 2019b; San Juan-Martínez *et al.*, 2020).

Biopolymers offer a variety of properties which are suitable for the slow release of encapsulated materials. These compounds receive great attention due to their applications in diverse fields, especially in areas of health and agriculture (Kumar *et al.*, 2014). Alginate, extracted from brown algae, is a linear, unbranched polysaccharide, consisting of units of β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid linked by 1-4 glycosidic bonds (Ramos *et al.*, 2015). Due to its biocompatibility and lack of

Los biopolímeros ofrecen una variedad de propiedades las cuales son apropiadas para la liberación lenta de materiales encapsulados. Estos compuestos reciben gran atención debido a sus aplicaciones en campos diversos, en especial en áreas de salud y agricultura (Kumar *et al.*, 2014). El alginato, extraído de algas pardas, es un polisacárido lineal no ramificado conformado por unidades de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulorónico unidas por enlaces glucosídicos 1-4 (Ramos *et al.*, 2015). Debido a su biocompatibilidad y nula toxicidad, el alginato de sodio se utiliza como agente acarreador para la liberación lenta de fármacos (Bagre *et al.*, 2013; Tahtat *et al.*, 2013), inoculantes microbianos (Schoebitz *et al.*, 2013) y pesticidas (Kumar *et al.*, 2014). Sin embargo, existe muy poca evidencia de su uso en sistemas de liberación lenta de fertilizantes agrícolas.

De Matos *et al.* (2018) diseñaron matrices de alginato de sodio con incorporaciones de partículas de sílice biogénica para el atrapamiento y liberación de nitrato de amonio. La mayoría de las partículas obtenidas presentaron tamaños dentro del intervalo de 2.0-4.8 μm , y mostraron propiedades de liberación lenta de su carga. La patente US3338700 trata sobre un fertilizante tipo-tableta adaptado para descomponerse con lentitud bajo la influencia de las bacterias del suelo. De acuerdo con el inventor, al emplear de 1 a 5% de alginato de sodio en la composición de la tableta, le ofrece a ésta buenas características de desintegración y dispersión. Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue elaborar nanopartículas de alginato de sodio cargadas con urea y determinar sus características fisicoquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias químicas

Para la elaboración del nanofertilizante se empleó alginato de sodio (Sigma-Aldrich, EUA), urea (Productos Químicos de Monterrey S.A. de C.V., México) y glutaraldehído (Merck, Alemania). Agua desionizada (18MW cm^{-1}) se utilizó en todos los experimentos y análisis.

Elaboración del nanofertilizante

Para la elaboración del nanofertilizante se diluyeron por separado 0.2 g de urea en 20 mL de agua y 0.4 g de alginato de sodio en 80 mL de agua a 120 °C. Las soluciones se filtraron (0.45 μm , Millipore) y mezclaron. La solución resultante se agitó

toxicity, sodium alginate is used as a carrier agent for slow release of drugs (Bagre *et al.*, 2013; Tahtat *et al.*, 2013), microbial inoculants (Schoebitz *et al.*, 2013), and pesticides (Kumar *et al.*, 2014). However, there is very little evidence of their use in slow-release agricultural fertilizer systems.

De Matos *et al.* (2018) designed sodium alginate matrices incorporating biogenic silica particles for the trapping and release of ammonium nitrate. Most of the particles obtained had sizes within the range of 2.0 - 4.8 μm and showed slow-release properties of their load. Patent US3338700 is a tablet type fertilizer adapted to decompose slowly under the influence of soil bacteria. According to the inventor, by employing 1 to 5% sodium alginate in the tablet's composition, it offers good disintegration and dispersal characteristics. Due to the above, the objective of this study was to prepare sodium alginate nanoparticles loaded with urea and to determine its physicochemical characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Chemical substances

Sodium alginate (Sigma-Aldrich, USA), urea (Productos Químicos de Monterrey S.A. de C.V., Mexico) and glutaraldehyde (Merck, Germany) were used to prepare the nanofertilizer. Deionized water (18MW cm^{-1}) was used in all experiments and analyses.

Nanofertilizer preparation

For the preparation of the nanofertilizer, 0.2 g of urea were diluted separately in 20 mL of water and 0.4 g of sodium alginate in 80 mL of water at 120 °C. The solutions were filtered (0.45 μm , Millipore) and mixed. The resulting solution was stirred at 120 °C for 60 min; at the end, the solution was sonicated in an ultrasonic bath (TI-H-5, Elma, Germany) for 60 min. After that process, 4 mg of glutaraldehyde were added, and the solution was stirred again at room temperature for 20 h. A Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, Switzerland), with a 0.4 μm membrane, was used for the formation of the nanoparticles. The drying temperature of the equipment was 100 °C at a pressure of 3500 Pa.

Scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray

First, the samples were coated with gold by sputtering (Desk IV, Denton Vacuum unit). The morphology, size, and elemental analysis of the nanoparticles were determined with a JSM-

a 120 °C 60 min; al término, la solución se sometió a sonicación en un baño ultrasónico (TI-H-5, Elma, Germany) durante 60 min. Después de ese proceso, se agregaron 4 mg de glutaraldehído y la solución se agitó de nuevo a temperatura ambiente durante 20 h. Para la formación de las nanopartículas se empleó un Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, Suiza), con una membrana de 0.4 µm. La temperatura de secado del equipo fue 100 °C a una presión de 3500 Pa.

Microscopia electrónica de barrido y energía dispersiva de rayos X

Primero, las muestras se recubrieron con oro mediante pulverización catódica (sputtering en inglés; con el equipo Desk IV, Denton Vacuum). En las nanopartículas se determinó su morfología, tamaño y análisis elemental con un microscopio electrónico de barrido JSM-6390LV (JEOL, Japón), equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X (EDS). Las micrografías se obtuvieron en una magnificación de 7000X con el uso de un voltaje acelerador de 20 kV.

Potencial Zeta

La carga superficial de las partículas en solución o potencial Zeta se determinó con un Zetasizer nano (ZS ZEN3600, Malvern Instruments, UK). Para realizar el análisis se diluyeron 2.5 mg de muestra en 10 mL de amortiguador de fosfato a pH 7.4, y se agitaron 10 min. Alícuotas de 1 mL se tomaron para realizar la lectura en el equipo, a temperatura ambiente. Los cálculos de movilidad electroforética se convirtieron en valores de potencial Zeta, con base en el modelo de Smoluchowski (Smoluchowski, 1921). La carga eléctrica promedio se obtuvo a partir del registro de 10 lecturas.

Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas de las nanopartículas y sus precursores se analizaron con un calorímetro diferencial de barrido, DSC Pyris 1 (Perkin Elmer, EUA). Muestras de 2 mg en cápsulas de aluminio (No. 0219-0062) se pesaron y sellaron. La velocidad de calentamiento del equipo fue 10 °C min⁻¹, en un intervalo de temperatura de 30 - 200 °C. La calibración de la temperatura y del flujo de calor se realizó con un material de referencia (Indium, No. 0319-0033). En todas las mediciones una cápsula vacía se utilizó como referencia.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Para evaluar las posibles interacciones entre la urea y alginate dentro de la nanopartícula, se realizaron determinaciones de

6390LV scanning electron microscope (JEOL, Japan), equipped with an energy dispersive X-ray detector (EDS). The micrographs were obtained at a magnification of 7000X with the use of a 20 kV accelerating voltage.

Zeta potential

The surface charge of the particles in solution or Zeta potential was determined with a nano Zetasizer (ZS ZEN3600, Malvern Instruments, UK). To carry out the analysis, 2.5 mg of sample were diluted in 10 mL of phosphate buffer at pH 7.4 and stirred for 10 min. 1 mL aliquots were taken to carry out readings in the equipment at room temperature. Calculations of electrophoretic mobility were converted into Zeta potential values, based on Smoluchowski's model (Smoluchowski, 1921). The average electric charge was obtained from the recording of 10 readings.

Differential scanning calorimetry

The thermal properties of the nanoparticles and their precursors were analyzed with a differential scanning calorimeter, DSC Pyris 1 (Perkin Elmer, USA). 2 mg samples in aluminum capsules (No. 0219-0062) were weighed and sealed. The heating rate of the equipment was 10 °C min⁻¹, in a temperature range of 30 - 200 °C. Temperature and heat flow calibration was performed with a reference material (Indium, No. 0319-0033). An empty capsule was used as a reference for all measurements.

Fourier transform infrared spectrometry (FTIR)

To evaluate possible interactions between urea and alginate within the nanoparticle, FTIR determinations were performed in the Cary 630 unit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). The analyses were carried out with an attenuated total reflectance (ATR) cell, in a range of 4000 - 600 cm⁻¹, with a resolution of 4 cm⁻¹ in 32 steps (scans).

RESULTS AND DISCUSSION

Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray (EDS)

Figure 1 shows a SEM image of the processed nanoparticles and their size distribution histogram. It is possible to observe that the particles presented uniform spherical morphology and smooth surface (Figure 1A), with dimensions from 100 to 1300 nm, but an average size of 600 nm (Figure 1B).

FTIR, en el equipo Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU). Los análisis se realizaron con una celda de reflectancia total atenuada (ATR), en un intervalo de 4000 - 600 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} en 32 pasos (*scans*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microscopía electrónica de barrido (MEB) y energía dispersiva de rayos X (EDS)

La Figura 1 muestra una imagen de MEB de las nanopartículas elaboradas y su histograma de distribución de tamaños. Es posible observar que las partículas presentaron morfología esférica uniforme y superficie lisa (Figura 1A), con dimensiones de 100 a 1300 nm, pero un tamaño promedio de 600 nm (Figura 1B). La distribución de tamaños de las partículas siguió una distribución normal ($R^2 = 0.87$). Al realizar un microanálisis mediante EDS (Figura 2) a una zona aleatoria de muestra (Figura 2A), se pudo determinar la composición elemental de las partículas (Figura 2B) y se corroboró la presencia de nitrógeno en 16%, lo que corresponde con la cantidad teórica de nitrógeno agregada durante la preparación de las muestras. Además, por medio de un mapeo del nitrógeno por EDS, se observó que dicho elemento tuvo una distribución uniforme por toda la matriz polimérica (Figura 2C).

Potencial Zeta

La determinación del potencial Zeta o carga superficial permite hacer predicciones acerca de la

The size distribution of the particles followed a normal distribution ($R^2 = 0.87$). By performing microanalysis by EDS (Figure 2) on a random sample zone (Figure 2A), the elemental composition of the particles could be determined (Figure 2B), and the presence of nitrogen was confirmed at 16%, which corresponds to the theoretical amount of nitrogen added during sample preparation. In addition, it was observed that this element was uniformly distributed throughout the polymer matrix (Figure 2C) through EDS mapping of the nitrogen.

Zeta potential

The determination of the Zeta potential or surface charge allows predictions about the stability of dispersed nanoparticles in an aqueous medium. The higher the absolute value of the Zeta potential, the lower the aggregation of particles tends to be. According to Cagua *et al.* (2019), Zeta potential values $\geq |30|$ mV indicate that nanoparticles in a nanofluid remain dispersed due to electrostatic repulsions between them. The average Zeta potential value for alginate nanoparticles was -36 ± 4 mV, while the value for urea-loaded particles was -39 ± 3 mV. These values allow inferring that the nanoparticles of the nanofertilizer will present good stability if they are incorporated to nutrient solutions or when they are part of the soil solutions, because due to their high Zeta potential value, they will remain dispersed without aggregation among them.

The negative charge of the nanoparticles was very similar even with the incorporation of urea, which

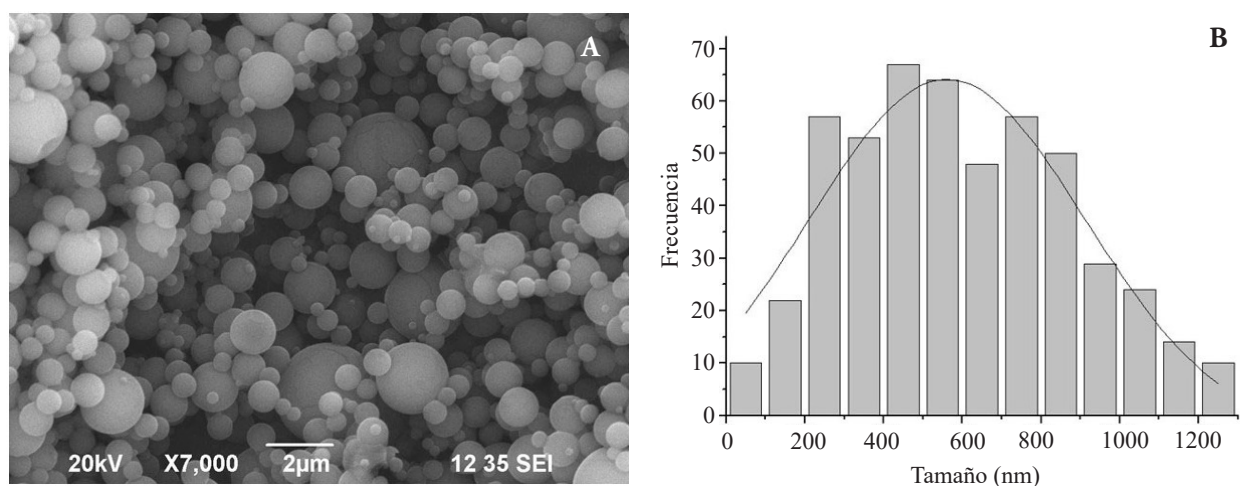


Figura 1. Micrografía de MEB que muestra la forma y tamaño de las partículas (A), e histograma de distribución de tamaños (B).
Figure 1. SEM micrograph showing the shape and size of the particles (A), and size distribution histogram (B).

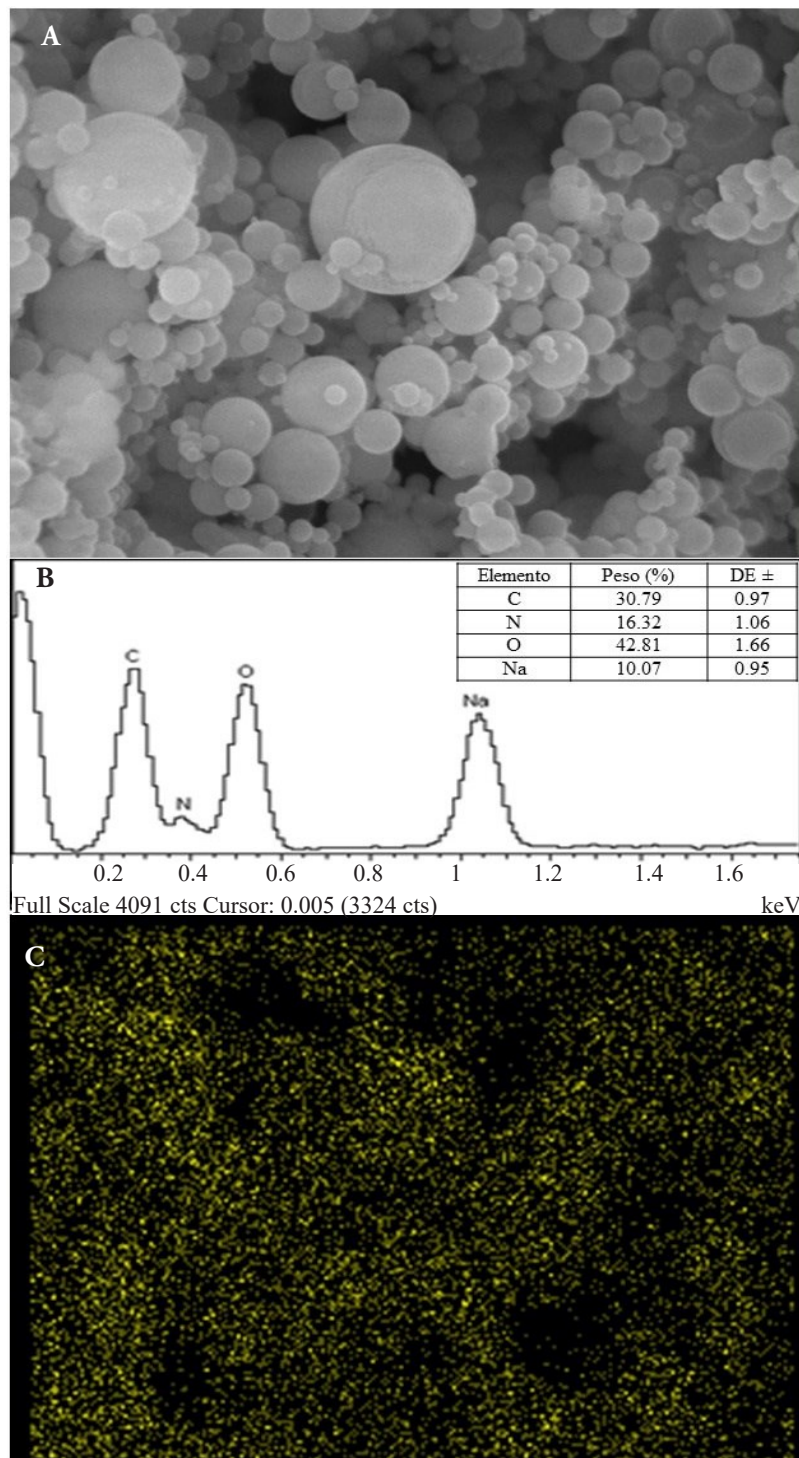


Figura 2. Análisis elemental del nanofertilizante: A) imagen de MEB que muestra la zona de análisis; B) espectro de EDS que indica la composición elemental; C) mapeo de EDS que muestra la distribución uniforme de nitrógeno en la zona de análisis.

Figure 2. Elemental analysis of the nanofertilizer: A) SEM image showing the analysis area; B) EDS spectrum indicating the elemental composition; C) EDS mapping showing the uniform distribution of nitrogen in the analysis area

estabilidad de nanopartículas dispersas en un medio acuoso. Entre mayor sea el valor absoluto de potencial Zeta, la agregación de las partículas tenderá a ser menor. De acuerdo con Cacia *et al.* (2019), valores de potencial Zeta $\geq |30|$ mV indican que las nanopartículas de un nanofluido se mantienen dispersas debido a repulsiones electrostáticas entre ellas. El valor de potencial Zeta promedio de las nanopartículas de alginato fue -36 ± 4 mV, mientras que el valor para las partículas cargadas con urea fue -39 ± 3 mV. Estos valores permiten inferir que las partículas del nanofertilizante presentarán buena estabilidad si se incorporan a soluciones nutritivas o al formar parte de las soluciones del suelo, porque debido a su valor alto de potencial Zeta se mantendrán dispersas sin agregación entre ellas.

La carga negativa de las nanopartículas fue muy similar incluso con la incorporación de urea, lo cual se explicaría por un valor alto en la relación superficie/volumen de las partículas. La naturaleza química de los polímeros es un factor con influencia determinante en la carga superficial de partículas en suspensión; por tanto, el comportamiento aniónico de las suspensiones examinadas en este estudio se puede atribuir a la carga negativa de los grupos carboxilo del alginato (Rescignano *et al.*, 2015). Katuwavila *et al.* (2016) reportaron valores similares de potencial Zeta para nanopartículas de alginato y nanopartículas de alginato cargadas con hierro.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Los espectros FTIR de los precursores empleados (alginato y urea) y de las nanopartículas con y sin carga se muestran en la Figura 3. El espectro del alginato reveló bandas de absorción características a 3256 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace O-H), 2925 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace O-H en el grupo carboxílico), 1591 cm^{-1} (vibración de tensión asimétrica del anión carboxilato), 1401 cm^{-1} (vibración de tensión simétrica del anión carboxilato) y 1021 cm^{-1} (vibración de tensión asimétrica del enlace C-O-C) (Katuwavila *et al.*, 2016; Anwar *et al.*, 2017). La urea presentó bandas características a 3424 cm^{-1} (vibración de tensión asimétrica del enlace N-H), $3323, 3253\text{ cm}^{-1}$ (vibraciones de tensión simétrica del enlace N-H), 1676 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace C=O), 1587 cm^{-1} (vibración de flexión

would be explained by a high value in the surface/volume ratio of the particles. The chemical nature of the polymers is a factor with a determining influence on the surface charge of suspended particles; therefore, the anionic behavior of the suspensions examined in this study can be attributed to the negative charge of the carboxyl groups of the alginate (Rescignano *et al.*, 2015). Katuwavila *et al.* (2016) reported similar Zeta potential values for alginate nanoparticles and iron-loaded alginate nanoparticles.

Fourier transform infrared spectrometry

The FTIR spectra of the precursors (alginate and urea) and of the loaded and unloaded nanoparticles are shown in Figure 3. The spectrum of the alginate revealed characteristic absorption bands at 3256 cm^{-1} (stretching of the O-H bond), 2925 cm^{-1} (stretching of the O-H bond in the carboxylic group), 1591 cm^{-1} (asymmetric stretching of the carboxylic anion), 1401 cm^{-1} (symmetric stretching of the carboxylic anion) and 1021 cm^{-1} (asymmetric stretching of the C-O-C bond) (Katuwavila *et al.*, 2016; Anwar *et al.*, 2017). Urea presented characteristic bands at 3424 cm^{-1} (asymmetric stretching of the N-H bond), $3323, 3253\text{ cm}^{-1}$ (symmetric stretching of the N-H bond), 1676 cm^{-1} (stretching of the C=O bond), 1587 cm^{-1} (bending of the N-H bond) and 1457 cm^{-1} (stretching of the C-N bond) (Zhou *et al.*, 2018). When analyzing the spectra of the loaded and unloaded nanoparticles, modifications were observed in some characteristic bands. The band corresponding to the stretching of the C-N bond (1457 cm^{-1}) of urea is shown in the spectrum of loaded nanoparticles with a decrease in its intensity. The bands at $3424, 3323$ and 3253 cm^{-1} moved to wave numbers of $3431, 3331$ and 3200 cm^{-1} respectively, and the decrease in the intensity of the signals is also evident. These modifications in the wave number and intensity of the bands can be attributed to the participation of the amino groups of urea in the formation of chemical bonds by the effect of glutaraldehyde (Pratt *et al.*, 2013). The band related to the asymmetric stretching of the C-O-C bond (1021 cm^{-1}) in alginate, appears with greater intensity in the FTIR spectra of both types of nanoparticles, suggesting an increase in the C-O-C groups. This suggests that glutaraldehyde not only favored urea-alginate interactions, but also promoted the formation of chemical bonds between

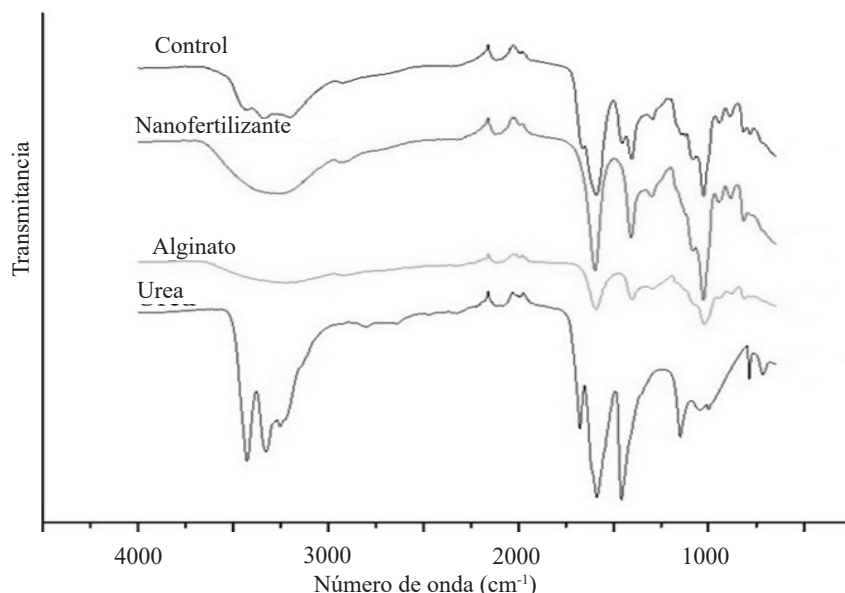


Figura 3. Espectros de FTIR de los precursores (alginato y urea) y de las nanopartículas elaboradas con y sin carga.
Figure 3. FTIR spectra of the precursors (alginate and urea) and of the nanoparticles prepared with and without load.

del enlace N-H) y 1457 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace C-N) (Zhou *et al.*, 2018). Al analizar los espectros de las nanopartículas con y sin carga se observaron modificaciones en algunas bandas características. La banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace C-N (1457 cm^{-1}) de la urea, se muestra en el espectro de las nanopartículas cargadas con una disminución en su intensidad. Las bandas a 3424 , 3323 y 3253 cm^{-1} se desplazaron a números de onda de 3431 , 3331 y 3200 cm^{-1} respectivamente, y es evidente también la disminución en la intensidad de las señales. Estas modificaciones en el número de onda e intensidad de las bandas pueden atribuirse a la participación de los grupos amino de la urea en la formación de enlaces químicos por efecto del glutaraldehído (Pratt *et al.*, 2013). La banda relacionada con la vibración de tensión asimétrica del enlace C-O-C (1021 cm^{-1}) en el alginato, aparece con mayor intensidad en los espectros FTIR de ambos tipos de nanopartículas, lo cual sugiere un aumento en los grupos C-O-C. Lo anterior hace suponer que el glutaraldehído no solo favoreció las interacciones urea-alginato, sino también promovió la formación de enlaces químicos entre polímeros del mismo polisacárido (Huang *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2015).

polymers of the same polysaccharide (Huang, *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2015).

Differential scanning calorimetry (DSC)

The urea thermogram showed endothermic peaks at 139.1 °C and 238.3 °C ; these are related to the melting point and thermal decomposition of urea (Figure 4) (Schaber *et al.*, 2004). The alginate nanoparticles exhibited an endothermic peak at 120.8 °C and an exothermic peak at 237.8 °C . According to Bagre *et al.* (2013), endothermal peaks are correlated with water loss associated with alginate hydrophilic groups, while exothermal peaks result from degradation due to dehydration and depolymerization reactions. In the thermogram, the urea-loaded nanoparticles showed a different thermal behavior than their individual components, as a consequence of the interactions among the components.

A new endothermic peak was exhibited at 188.3 °C , while the exothermic peak characteristic of polymer degradation was displaced to a higher temperature (249 °C). The above indicates that this material presented higher thermal stability

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El termograma de la urea mostró picos endotérmicos a 139.1 °C y 238.3 °C; estos están relacionados con el punto de fusión y la descomposición térmica de la urea (Figura 4) (Schaber *et al.*, 2004). Las nanopartículas de alginato exhibieron un pico endotérmico a 120.8 °C y un pico exotérmico a 237.8 °C. De acuerdo con Bagre *et al.* (2013), los picos endotérmicos están correlacionados con la pérdida de agua asociada a los grupos hidrofílicos del alginato, mientras que los picos exotérmicos resultan de la degradación debido a la deshidratación y reacciones de despolimerización. En el termograma, las nanopartículas cargadas con urea mostraron un comportamiento térmico distinto al de sus componentes individuales, como consecuencia de las interacciones entre los componentes.

Un nuevo pico endotérmico se exhibió a 188.3 °C, mientras que el pico exotérmico característico de la degradación del polímero se desplazó a una temperatura mayor (249 °C). Lo anterior es un indicativo de que este material presentó estabilidad térmica mayor en comparación con sus componentes individuales, lo cual puede atribuirse al establecimiento de enlaces

comparado a sus componentes individuales, que pueden ser atribuidos al establecimiento de enlaces químicos entre alginato-alginato y alginato-urea durante el proceso de formación de nanopartículas (Anwar *et al.*, 2017). Distantina *et al.* (2013) reportó que el uso de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento mejora la estabilidad térmica de los films de carragenano debido a la formación de enlaces acetales.

CONCLUSIONES

Urea-cargadas nanopartículas de alginato, como una fuente de nitrógeno, fueron preparadas por secado por spray. La mayoría de las partículas obtenidas tenían una morfología esférica, superficie lisa, y tamaño promedio de 600 nm. La incorporación de la carga en la matriz polimérica fue favorecida por el uso de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento porque permitió el establecimiento de enlaces químicos entre el alginato y la urea.

Las interacciones (polímero-polímero) fueron principalmente responsables de la estabilidad térmica presentada por los nanomateriales. El valor de carga superficial de -39 ± 3 mV predice que las partículas permanecerán en dispersión al formar parte de sistemas o soluciones coloidales. Las características de las partículas observadas

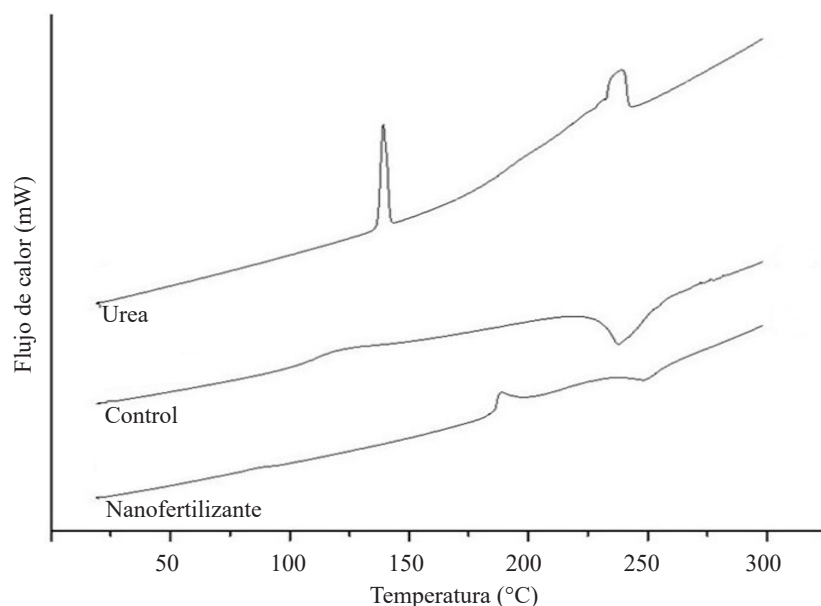


Figura 4. Termogramas de DSC que muestran las transiciones de fase ocurridas durante el proceso de calentamiento de la urea y las nanopartículas con y sin carga.

Figure 4. DSC thermograms showing the phase transitions that occurred during the heating process of load and unloaded urea and nanoparticles

químicos entre alginato-alginato y alginato-urea durante el proceso de formación de las nanopartículas (Anwar *et al.*, 2017). Distantina *et al.* (2013) reportaron que el empleo de glutaraldehído como agente reticulante, mejora la estabilidad térmica de películas de carragenina debido a la formación de enlaces acetales.

CONCLUSIONES

Nanopartículas de alginato cargadas con urea, como fuente de nitrógeno, se elaboraron mediante secado por aspersión. La mayoría de las partículas obtenidas presentaron una morfología esférica, superficie lisa y tamaños promedio de 600 nm. La incorporación de la carga en la matriz polimérica se favoreció por el uso de glutaraldehído como agente reticulante, porque permitió establecer enlaces químicos entre el alginato y la urea.

Las interacciones (polímero-polímero) fueron responsables en gran medida de la estabilidad térmica presentada por los nanomateriales. El valor de carga superficial de -39 ± 3 mV, predice que las partículas se mantendrán en dispersión al formar parte de sistemas o soluciones coloidales. Las características de las partículas observadas son prometedoras y crean una posibilidad real de que el material elaborado pueda utilizarse como fuente de fertilizante agrícola de liberación lenta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional, al Colegio de Postgraduados y al CONACYT, por los apoyos brindados para el desarrollo de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Anwar, H., M. Ahmad, M. U. Minhas, and S. Rehmani. 2017. Alginate-polyvinyl alcohol based interpenetrating polymer network for prolonged drug therapy, optimization and *in vitro* characterization. *Carbohydr. Polym.* 166: 183 - 194.
- Bagre, A. P., K. Jain, and N. K. Jain. 2013. Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: *In vitro* and *in vivo* assessment. *Int. J. Pharmaceut.* 456: 31 - 40.
- Cacua, K., F. Ordoñez, C. Zapata, B. Herrera, E. Pabón, and R. Buitrago-Sierra. 2019. Surfactant concentration and pH effects on the zeta potential values of alumina nanofluids to inspect stability. *Colloids Surf. A* 583: 123960.
- De Matos, M., B. D. Mattos, B. L. Tardy, O. J. Rojas, and W. L. E. Magalhães. 2018. Use of biogenic silica in porous alginate

matrices for sustainable fertilization with tailored nutrient delivery. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6: 2716 - 2723.

DeRosa, M. C., C. Monreal, M. Schnitzer, R. Walsh, and Y. Sultan. 2010. Nanotechnology in fertilizers. *Nat. Nanotech.* 5: 91.

Distantina, S., Rochmadi, M. Fahrurrozi, and Wiratni. 2013. Preparation and characterization of glutaraldehyde-crosslinked kappa carrageenan hydrogel. *Eng. J.* 17: 57 - 66.

Huang, S., Z. Xiao, S. Zhai, B. Zhai, F. Zhang, and Q. An. 2014. Fabrication of highly-stable Ag/CA@GTA hydrogel beads and their catalytic application. *RSC Adv.* 4: 60460 - 60466.

Katuwawila, N. P., A. D. Perera, D. Dahanayake, V. Karunaratne, G. A. Amarantunga, and D. N. Karunaratne. 2016. Alginate nanoparticles protect ferrous from oxidation: Potential iron delivery system. *Int. J. Pharmaceut.* 513: 404 - 409.

Kumar, S., G. Bhanjana, A. Sharma, M. C. Sidhu, and N. Dilbaghi. 2014. Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 101: 1061 - 1067.

Laghari, S. J., N. A. Wahocho, G. M. Laghari, A. H. Laghari, G. M. Bhabhan, K. H. Talpur, T. A. Bhutto, S. A. Wahocho, and A. A. Lashari. 2016. Role of nitrogen for plant growth and development: a review. *Adv. Environ. Biol.* 10: 209 - 218.

Liu, R., and R. Lal. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Sci. Total Environ.* 514: 131 - 139.

Mastronardi, E., P. Tsae, X. Zhang, C. Monreal, and M. C. DeRosa. 2015. Strategic role of nanotechnology in fertilizers: Potential and limitations. *In: Rai, M., C. Ribeiro, L. Matto, and N. Duran (eds). Nanotechnologies in Food and Agriculture. Switzerland: Springer, Cham. pp: 25-67.*

Miranda-Villagómez, E., M. A. Aguilar-Méndez, F. C. Gómez-Merino, E. Ronquillo-de Jesús, M. Sandoval-Villa, P. Sánchez-García, y L. I. Trejo-Téllez. 2019a. Synthesis of biopolymeric particles loaded with phosphorus and potassium: characterisation and release tests. *IET Nanobiotechnol.* 13: 493-497. doi: 10.1049/ietnbt.2018.5035

Miranda-Villagómez, E., L. I. Trejo-Téllez, F. C. Gómez-Merino, M. Sandoval-Villa, P. Sánchez-García, and M. A. Aguilar-Méndez. 2019b. Nanophosphorus fertilizer stimulates growth and photosynthetic activity and improves P status in rice. *J. Nanomaterials* 2019: 1-11.

Pratt, D. Y., L. D. Wilson, and J. A. Kozinski. 2013. Preparation and sorption studies of glutaraldehyde cross-linked chitosan copolymers. *J. Colloid Interface Sci.* 395: 205 - 211.

Ramos, E. V., J. L. de Oliveira, L. Fernandes, and B. Singh. 2015. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. *Agron. Sustain. Dev.* 35: 47 - 66.

—End of the English version—



- Reddy, N., R. Reddy, and Q. Jiang. 2015. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 33: 362 - 369.
- Rescignano, R., E. Fortunati, I. Armentano, R. Hernandez, C. Mijangos, R. Pasquino, and J. M. Kenny. 2015. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 445: 31 - 39.
- Schaber, P. M., J. Colson, S. Higgins, D. Thielen, B. Anspach, and J. Brauer. 2004. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. *Thermochim. Acta* 424: 131 - 142.
- Schoebitz, M., M. D. López, and A Roldán. 2013. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33: 751 - 765.
- Smoluchowski, v. M. 1921. Elektrische endosmose und strömungsströme. *In: Graetz, L. (ed). Handbuch der Elektrizität un des Magnetismus.* Verlag von Johann Ambrosius Barth, Leipzig. pp: 366 - 428.
- Solanki, P, A. Bhargava, H. Chhipa, N. Jain, and J. Panwar. 2015. Nano-fertilizers and their smart delivery system. *In: Rai, M., C. Ribeiro, L. Mattoso, and N. Duran (eds). Nanotechnologies in Food and Agriculture.* Springer International Publishing, Switzerland. pp: 81 - 101.
- Tahtat, D., M. Mahlous, S. Benamer, A. N. Khodja, H. Oussedik-Oumehdi, and F. Laraba-Djebari. 2013. Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. *Int. J. Biol. Macromol.* 58: 160 - 168.
- Xiaoyu N., W. Yuejin, W. Zhengyan, W. Lin, Q. Guannan, and Y. Lixiang. 2013. A novel slow-release urea fertiliser: Physical and chemical analysis of its structure and study of its release mechanism. *Biosyst. Eng.* 115: 274 - 282.
- Yamamoto, C. F., E. I. Pereira, L. H. C. Mattoso, T. Matsunaka, and C. Ribeiro. 2016. Slow release fertilizers based on urea/urea-formaldehyde polymer nanocomposites. *Chem. Eng. J.* 287: 390 - 397.
- Zhou T., Y. Wang, S. Huang, and Y. Zhao. 2018. Synthesis composite hydrogels from inorganic-organic hybrids based on leftover rice for environment-friendly controlled-release urea fertilizers. *Sci. Total Environ.* 615: 422 - 430.

CONOCIMIENTO Y PRÁCTICA DE LA HERBOLARIA EN EL ESTADO DE MÉXICO, PAUTAS HACIA LA SUSTENTABILIDAD

KNOWLEDGE AND PRACTICE OF HERBALISM IN THE STATE OF MEXICO, GUIDELINES TOWARDS SUSTAINABILITY

Georgina **Gutiérrez-García**^{1,2}, Enrique **Espinosa-Ayala**³, Pedro Abel **Hernández-García**³,
Thelma Beatriz **Pavón-Silva**², Ofelia **Márquez-Molina**^{3*}

¹Doctorante en Sustentabilidad para el Desarrollo. Centro de Estudios e Investigación en Desarrollo Sustentable de la Universidad Autónoma del Estado de México. Mariano Matamoros núm. 1007. Colonia Universidad. 50130. Toluca, estado de México. ² Unidad Académica Profesional Acolman, Universidad Autónoma del Estado de México. Camino de Caleros Num. 11. Colonia Ejido de Santa Catarina. 55875. Acolman, estado de México. México. (garcia.georgina@hotmail.com), (th.pavon@gmail.com). ³Centro Universitario UAEM Amecameca. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Amecameca Ayapango Km. 2.5. 56900. México, (enresaya1@hotmail.com), (pedro_abel@yahoo.com), (ofeliamolina@yahoo.com).

RESUMEN

La herbolaria y la medicina tradicional en México son actividades persistentes en la población, las cuales se abordan desde perspectivas diversas, aunque existen pocos reportes que mencionen su sustentabilidad. El objetivo del estudio fue identificar y documentar el conocimiento y prácticas sustentables realizadas por los recolectores, productores y consumidores de plantas medicinales del oriente del estado de México. La hipótesis fue que el conocimiento transmitido intergeneracionalmente ha llevado a una práctica sustentable de la herbolaria. El método etnobotánico se utilizó para determinar la sustentabilidad del sistema. Entrevistas semiestructuradas se realizaron a actores claves que fueron adultos mayores, recolectores y productores de plantas medicinales. En la herbolaria local se identificaron 61 especies de plantas utilizadas, de las cuales 35 se recolectan o cultivan para su venta en el tianguis de Ozumba, estado de México. Los adultos mayores usan las plantas locales y refirieron otras 26 especies diferentes, de las cuales cinco las adquieren en comercios naturistas, de las restantes (21), su utilidad principal no es la medicinal: seis son de ornato, 13 se usan en la cocina y dos se consideran perennes silvestres. La herbolaria sigue presente en el oriente del estado de México, a través de un intercambio proactivo entre el productor recolector y los adultos mayores, quienes adquieren las plantas locales de temporada y favorecen la conservación de prácticas agrícolas amigables con el ambiente. La herbolaria es una práctica

ABSTRACT

Herbalism and traditional medicine in Mexico are persistent activities in the population, both address diverse perspectives, although there are few reports mentioning the sustainability of such activities. The objective of the study was to identify and document the knowledge and sustainable practices carried out by the collectors, producers and consumers of medicinal plants in the east of the state of Mexico. The hypothesis was that the knowledge transmitted intergenerationally has led to a sustainable practice of herbalism. The ethnobotanical method was used to determine the sustainability of the system. Semi-structured interviews were conducted with key actors who were older adults, collectors, and producers of medicinal plants. Plants of 61 species used were identified at the local herbalist market, 35 species are collected or grown for sale in the street market (*tianguis*) of Ozumba, state of Mexico. The older adults use the local plants and referred other 26 different species, of which five are acquired in naturalist stores, of the remaining (21), their main use is not medicinal: six are ornamental, 13 are used in cooking and two are considered wild perennials. Herbalism is still present in the east of the state of Mexico, through a proactive exchange between the harvesting producer and the elders, who acquire the local plants in season favoring the conservation of environmentally friendly agricultural practices. Herbalism is a sustainable practice thanks to the harvesting and production processes. Although it may be at risk due to the loss of intergenerational knowledge; as transmissibility decreases, the future of the activity is at risk. Other risks detected are of economic nature caused by the low prices of medicinal plants.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTICULO en *Agrociencia* 54: 1043-1058. 2020.

sustentable gracias a los procesos de recolección y producción. Aunque puede estar en riesgo debido a la pérdida del conocimiento intergeneracional; ya que al disminuir la transmisibilidad se arriesga el futuro de la actividad. Otros riesgos detectados son económicos por los precios bajos de las plantas medicinales.

Palabras claves: conocimiento cultural, etnobotánica, sustentabilidad, herbolaria, uso tradicional.

INTRODUCCIÓN

En culturas y países diversos la medicina tradicional es la fuente principal de atención sanitaria y en ocasiones la única. Su demanda se debe a que es próxima a los hogares, asequible y aceptada culturalmente (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a la medicina tradicional como “el conjunto de conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de culturas diferentes, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales” (OMS, 2013).

La medicina tradicional considera a la herbolaria dentro de sus prácticas, la cual se basa en el empleo de plantas con fines medicinales y recreativos. En el caso de México se cuenta con la fusión de culturas diversas como las prehispánicas, la influencia de la colonización europea cuando se introdujeron especies nuevas que incluyeron algunas procedentes de Oriente medio e incluso Asia y Oceanía. Dicha fusión se ha perpetuado a través del tiempo y ha generado una tradición (Villarreal-Ibarra *et al.*, 2014).

La herbolaria desde la etnobotánica (Martín, 2004) se estudia en el mundo (Parthiban *et al.*, 2016; Cussy-Poma *et al.*, 2017; Fernandes y Boff, 2017) y permite la identificación de especies locales. La Iniciativa Global para Sistemas Tradicionales de Salud mencionó que en 1997, cerca de 35 000 especies de plantas se usaron en el mundo para propósitos médicos, pero solo 40 de estas especies se incorporaron a la medicina moderna (alópata). Tal situación no indica que las plantas no tengan potencial debido a que la mayor parte de dichos vegetales cuentan con metabolitos secundarios de interés farmacológico (OMS, 2019).

En México y especialmente la zona centro se cuenta con gran diversidad de plantas con uso

Key words: cultural knowledge, ethnobotany, sustainability, herbalism, traditional use.

INTRODUCTION

In diverse cultures and countries traditional medicine is the main source of health care and sometimes it is the only one. Demand is due to its proximity to homes, affordability, and of cultural acceptance (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). The World Health Organization (WHO) defined traditional medicine as “the body of knowledge, skills and practices based on the theories, beliefs and experiences of different cultures, whether explainable or not, used to maintain health and to prevent, diagnose, improve or treat physical and mental illness” (WHO, 2013).

Traditional medicine considers herbalism within its practices, which is based on the use of plants for medicinal and recreational purposes. In the case of Mexico, we can count on the fusion of diverse cultures such as the pre-Hispanic ones, the influence of European colonization when new species were introduced, which included some from the Middle East and even Asia and Oceania. This fusion has persisted through time and it has generated a tradition (Villarreal-Ibarra *et al.*, 2014).

Herbalism from an ethnobotanical point of view (Martín, 2004) is studied worldwide (Parthiban *et al.*, 2016; Cussy-Poma *et al.*, 2017; Fernandes and Boff, 2017) and allows the identification of local species. The Global Initiative for Traditional Health Systems mentioned that in 1997, about 35 000 plant species were used worldwide for medical purposes, but only 40 of those species were incorporated into modern (allopathic) medicine. Such situation does not disregard that plants have potential because most of these plants have secondary metabolites of pharmacological interest (WHO, 2019).

In Mexico, especially in the central zone, there is a great diversity of plants with medicinal use, this is due to the agro-climatic conditions where the high zones near the great elevations, like the eastern zone of the state, stand out. The conservation of phytogeographic diversity in the eastern part of the state of Mexico is carried out by harvesting producers, who, based on empiricism and agro-ecological practices, favor the conservation of sociohistorical elements as generators

medicinal, esto debido a las condiciones agroclimáticas donde destacan las zonas altas cercanas a las grandes elevaciones como la zona oriente del estado. La conservación de la diversidad fitogeográfica de la zona oriente del estado de México la realizan los productores recolectores, quienes a partir del empirismo y las prácticas agroecológicas favorecen la conservación de elementos sociohistóricos como generadores de cambio en un contexto de desarrollo (Astier *et al.*, 2017).

La sustentabilidad como paradigma en constante cambio es aplicable en un campo extenso de acción y se dirige a alcanzar un estado dinámico entre la demanda de equidad, prosperidad y una calidad de vida mejor. No deja fuera a la ecología como eje rector, en el cual se relacionan la sociedad y la economía, en territorio y tiempo acotados el cual se puede aplicar en diferentes escalas, ya sea una familia, un proyecto o la industria (López, 2008).

El estudio de la sustentabilidad puede abordarse desde la triada: agroecológica, socio-territorial, económica (Toledo y Ortiz-Espejel, 2014), sin olvidar el tiempo (Leff, 2004). Una estructura alrededor de eventos significativos, sociales y económicos, con la medida de eventos externos (fenómenos geofísicos, ciclos ecológicos, procesos de degradación y regeneración de la naturaleza), y que se entreteje a través de la historia en las formas culturales de importancia en su modo de vida.

La agroecología se fundamenta en la conservación de elementos sociohistóricos, aunque externos a factores estrictamente ecológicos, pero que generan un cambio en el contexto en el cual se desarrollen (Astier *et al.*, 2017). El objetivo de la agroecología es buscar sistemas agrícolas sostenibles (Gudynas, 2004) que nutran identidad y cultura, y refuercen la viabilidad económica de las zonas rurales (FAO, 2019). Al ser la herbolaria parte de un sistema agrícola que se mantiene basado en cultura y tradición, es viable su estudio desde la visión de la agroecología.

Con los antecedentes expuestos, el objetivo de este estudio fue identificar y documentar el conocimiento y prácticas agroecológicas realizadas por los recolectores, productores y consumidores de plantas medicinales al este del estado de México, bajo un enfoque sustentable. La hipótesis fue que el conocimiento transmitido intergeneracionalmente por los habitantes del oriente del estado de México ha llevado a una práctica sustentable de la herbolaria.

of change in a development context (Astier *et al.*, 2017).

Sustainability as a constantly changing paradigm is applicable in a wide field of action and is aimed at achieving a dynamic state between the demand for equity, prosperity, and a better quality of life. It does not leave ecology out as a guiding axis, in which society and economy are related in limited territory and time, which can be applied at different scales, whether it is a family, a project or industry (López, 2008).

The study of sustainability can be addressed from the triad: agro-ecological, socio-territorial, economics (Toledo and Ortiz-Espejel, 2014), without forgetting time (Leff, 2004). A structure around significant events, social and economic, with the measure of external events (geophysical phenomena, ecological cycles, processes of degradation and regeneration of nature), and that is interwoven through history in the cultural forms of importance in their way of life.

Agroecology is based on the conservation of sociohistorical elements, although external to strictly ecological factors, but which generate a change in the context in which they are developed (Astier *et al.*, 2017). The objective of agroecology is to seek sustainable agricultural systems (Gudynas, 2004) that nurture identity and culture, and strengthen the economic viability of rural areas (FAO, 2019). Since herbalism is part of an agricultural system that is based on culture and tradition, it can be studied from the perspective of agroecology.

With all the above as background, the objective of this study was to identify and document the knowledge and agro-ecological practices carried out by collectors, producers, and consumers of medicinal plants in the east of the state of Mexico, under a sustainable approach. The hypothesis was that the knowledge transmitted intergenerationally by the inhabitants of the east of the state of Mexico has led to the sustainable practice of herbalism.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The research was carried out in the eastern zone of the state of Mexico, in the municipalities of Amecameca de Juárez, Ozumba de Alzate and Ecatingo de Hidalgo because the dynamics of production, collection and commercialization of medicinal

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio

La investigación se realizó en la zona oriente del estado de México en los municipios de Amecameca de Juárez, Ozumba de Alzate y Ecatingo de Hidalgo debido a que en estos tres sitios se da la dinámica de producción, recolección y comercialización de plantas medicinales. Los municipios colindan con los volcanes Popocatepetl (5426 m) e Iztaccihuatl (5230 m), dos de los más altos del Valle de México, estas altitudes propician la existencia de bosques de oyamel, pino y encino, así como vegetación secundaria arbustiva y herbácea, también denominada pradera de alta montaña (Gobierno del Estado de México, 2017).

Esta zona de estudio tiene tres áreas protegidas: el Parque Nacional Iztaccihuatl y Popocatepetl, Parque Estatal Santuario del Agua y Forestal Manantial “El Salto de Atlautla-Ecatingo” y el Parque Estatal Santuario del Agua y Forestal sin decreto “Salto de Amecameca”, los cuales se ubican cerca del área volcánica (Gobierno del Estado de México, 2017). El promedio de precipitación anual es 1200 mm y la temperatura media varía de 12 °C a 18 °C, aunque en invierno puede disminuir hasta -3 °C. La región presenta una variedad de tipos de suelo propicios para actividades diferentes como agrícolas, pecuarias y forestales, y padece un cambio intenso de uso de suelo por la expansión de la frontera urbana.

En el municipio de Ozumba de Alzate se ubica un tianguis del cual existen registros desde la época prehispánica, lugar donde se comercializan productos locales y provenientes del estado de Morelos. Este tianguis está dividido por secciones específicas y tiene un espacio para la herbolaria donde se comercializan principalmente especies vegetales cultivadas y recolectadas en la zona (Linares y Bye, 2009).

Método etnobotánico

En el estudio se aplicó el método etnobotánico (Martin, 2004), por medio de la técnica de entrevista semiestructurada y análisis del discurso a productores y recolectores de plantas medicinales (enfoque etnográfico), en las tres dimensiones de la sustentabilidad (Cuadro 1).

La entrevista se aplicó a 10 mujeres y un hombre por muestreo de voluntarios que se dedican a alguna de las actividades de producción, recolección y comercialización de plantas medicinales. Los entrevistados son originarios de los municipios de Amecameca de Juárez y de Ozumba de Alzate, en un lapso desde el 25 de junio de 2018 al 15 de marzo de 2019. Con lo anterior se identificó la interacción entre la agroecología, lo socio-territorial y la economía para determinar la sustentabilidad de la herbolaria.

plants occur in these three sites. The municipalities border the Popocatepetl (5426 m) and Iztaccihuatl (5230 m) volcanoes, two of the highest in the Valley of Mexico, these altitudes favor the existence of fir, pine and oak forests, as well as secondary shrub and herbaceous vegetation, also called high mountain prairie (Government of the State of Mexico, 2017).

This area of study has three protected areas: Iztaccihuatl and Popocatepetl National Park, Water and Forest Sanctuary State Park “El Salto de Atlautla-Ecatingo” and Parque estatal santuario del agua y forestal without decree “Salto de Amecameca”, which are located near the volcanic area (Government of the State of Mexico, 2017). The average annual rainfall is 1200 mm and the average temperature varies from 12 °C to 18 °C, although during winter it can drop to -3 °C. The region has a variety of soil types suitable for different activities such as agriculture, livestock, and forestry, and suffers from an intense change in land use due to the expansion of the urbanistic border.

There is a street market, *el tianguis*, located in the municipality of Ozumba de Alzate, of which there are records from the pre-Hispanic period; a place where local products from the state of Morelos are marketed. This *tianguis* is divided into specific sections and has a place for herbalism where mainly vegetable species grown and collected in the area are sold (Linares and Bye, 2009).

Ethnobotanic method

The ethnobotanic method was applied in this study (Martín, 2004), through the technique of semi-structured interview and discourse analysis of medicinal plant collectors and producers (ethnographic approach), in the three dimensions of sustainability (Table 1).

The interview was applied to 10 women and one man by sampling volunteers who are engaged in some of the activities of production, collection and marketing of medicinal plants. The interviewees are from the municipalities of Amecameca de Juárez and Ozumba de Alzate, and their interviews were conducted from June 25, 2018 to March 15, 2019. The interaction between agroecology, socio-territorial aspect and economy was identified to determine the sustainability of herbalism.

The variables studied to identify use and acceptance of medicinal plants were endemic plants and medicinal properties (agro-ecological dimension). A group of older adults was chosen because it was observed in the first approaches that they were the ones who acquired those plants more frequently.

A semi-structured interview was conducted for focus groups and by proposition sampling. The characteristics of the older adults were: 65 years or older, belonging to a municipal recreational group, indistinct sex, and having accepted to participate and

Cuadro 1. Dimensiones y variables consideradas en la sustentabilidad de las plantas medicinales.
Table 1. Dimensions and variables considered in the sustainability of medicinal plants.

Dimensiones	Variables	Fuente
Agroecológica	Cultivo regulado, cultivos fuera del sitio, cambios en la efectividad de la planta, motivo por el cual cultiva, origen de la producción, uso de fertilizantes, tiempo y resiliencias entre recolectas, tipo de recolección, arranque o corte, crecimiento de nuevas especies, cambio de uso de suelo, plantas endémicas, propiedades medicinales, áreas de recolección y cambios en el crecimiento de las plantas locales	Chen <i>et al.</i> (2016)
	Extensión de tierra productiva destinada a plantas medicinales, policultivo, quema, tipo de riego, agua para el cultivo, rotación de cultivos, control de plagas y uso de maquinaria para el cultivo	Toledo (2002)
Económica	Destino de la producción, tipo de unidad de venta, costo por unidad, unidades/área productiva, valor agregado por inclusión de otros materiales/transporte y cantidad/día de venta de las plantas	Martínez (2005)
Socio-territorial	Actores sociales, principales colaboradores en la producción/recolección, edad, género, escolaridad del recolector y actividades complementarias a la producción	Chen <i>et al.</i> (2016)

Las variables estudiadas para identificar uso y aceptación de las plantas medicinales fueron plantas endémicas y propiedades medicinales (dimensión agroecológica). Un grupo de adultos mayores se escogió porque se observó en los primeros acercamientos que ellos eran quienes las adquirían con mayor frecuencia.

Una entrevista semiestructurada se elaboró para grupos focales y por muestreo propositivo. Las características de los adultos mayores fueron: 65 años o más, pertenecer a un grupo recreativo municipal, sexo indistinto, aceptar participar y ser grabados en audio. Las entrevistas se realizaron de junio a septiembre de 2018. El total de participantes fue de 46, pertenecientes a los municipios de Amecameca de Juárez (17 personas), Tlalmanalco de Velázquez (12 personas) y Chalco de Díaz Covarrubias (17 personas).

Consideraciones éticas

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Universitario de la Universidad Autónoma del Estado de México en Amecameca. El consentimiento informado se obtuvo de forma verbal de todos los participantes después de explicar el objetivo de la investigación y la confidencialidad de los datos proporcionados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productores recolectores preservan de forma empírica y racionalista el vulnerable equilibrio ambiental en la zona oriente del estado de México debido a los fenómenos naturales, como la constante actividad volcánica del Popocatepetl. Además, se enfrentan al cambio de uso de suelo que deja de

being recorded on audio. The interviews were conducted from June to September 2018. The total number of participants was 46, belonging to the municipalities of Amecameca de Juárez (17 individuals), Tlalmanalco de Velázquez (12 individuals) and Chalco de Díaz Covarrubias (17 individuals).

Ethical considerations

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Centro Universitario under the Universidad Autónoma del Estado de Mexico in Amecameca. Informed consent was obtained verbally from all participants after explaining the purpose of the research and the confidentiality of the data provided.

RESULTS AND DISCUSSION

The harvesting producers preserve, in an empirical and reasonable way, the vulnerable environmental balance in the eastern zone of the state of Mexico due to natural phenomena, such as the constant volcanic activity of the Popocatepetl volcano. In addition, they face the change in the use of soil that ceases to be agricultural or forestry and gets directed to residential use, which directly damages the production of medicinal plants endemic to the region.

The practice of herbalism is complementary and consequent to the cultivation of lands in the area, and is carried out by both men and women, who intervene at different moments of the process. For example, both men and women collect or cultivate

ser agrícola o bosque y se dirige a uso habitacional lo cual perjudica de forma directa la producción de plantas medicinales endémicas de la región.

La práctica de la herbolaria es complementaria y consecuente a los cultivos del área, la realizan tanto hombres como mujeres, quienes intervienen en diferentes momentos del proceso. Por ejemplo, ambos recolectan o cultivan las plantas y, de manera principal, la mujer comercializa y sugiere al consumidor formas de aplicación de la herbolaria en el tianguis.

Agroecológica

Los productores recolectores entrevistados preservan las áreas protegidas y realizan recolección *in situ* de plantas endémicas. Las áreas se ubican en los montes o cerros (zonas boscosas aledañas a los volcanes) y permiten la resiliencia entre cortes, como señala la entrevistada: “...le corto por un lado y ya vuelve a retoñar no tarda mucho y depende de que luna lo corto, porque si lo corto en más o menos que está buena rápido retoña, la luna buena es cuando tiene unos ocho días de nacida, rápido retoña no es de mucho que tiene que estar así...” [P/R 1], “...si da fruta corto los ramilletes de los nísperos, y si no, pues le corto las hojas...” [P/R 2], “...le corto, así queda la colita y de ahí vuelve a retoñar...” [P/R 4].

Para los cultivos *ex situ* toman las semillas de la planta medicinal del lugar de origen y las trasladan a las áreas de cultivo regulado (traspacio), espacio mantenido como policultivo con rotación “...la pasiflorina, me traje las semillas y aquí las sembré...” [P/R 1].

El agua destinada para la producción se obtiene de temporal “... en temporada de lluvia es cuando siembro más... (a veces siembra fuera de temporada) si, echándole tantitita agua nacen así sin temporal...” [P/R 3]. Para los cultivos fuera de temporada utilizan agua potable de la red de distribución local “... de la llave... allá llega como ahorita llegó el agua...” [P/R 2], aunque esta actividad es limitada por la poca distribución de agua de la localidad “... raciono de la que almaceno en dos tinacos, y de ahí tomo dos botes para regar los rábanos pero solo poquita...” [P/R 3], “...hasta hoy cayó el agua de la red de distribución local...” [P/R 10].

El tipo de fertilizante que utilizan los productores/recolectores es el orgánico y lo que relatan es “...la basura (cáscaras de frutas y verduras) de la casa se riega en las plantas y cuando volteamos la tierra para sembrar

the plants, but mainly women market them at the *tianguis* and suggest the consumer ways of applying herbalism.

Agro-ecological

The harvesting producers interviewed preserve the protected areas and carry out *in situ* collection of endemic plants. The areas are located in the mountains or hills (forested areas near volcanoes) and allow resilience between cuts, as the interviewee points out: “...I cut it on one side and it sprouts again, it does not take long and the cut depends on which moon is set, because if I cut it around a “good moon” it sprouts quickly, the good moon is when moon is about eight days old, it sprouts quickly, it is not long that plant has to remain like that...” P/R 1], “...if it gives fruit, I cut the branches of the medlar trees, and if not, I cut the leaves...” [P/R 2], “... so the tail (petiole) remains and from there, plant sprouts again...” P/R 4].

For *ex situ* cultivation, they take the seeds of the medicinal plant from the place of origin and move them to the areas of managed cultivation (backyard), a space maintained as polyculture with rotation “... the passionflower, I brought the seeds and I sowed them here...” [P/R 1].

The water for production is obtained by rainfed “... the rainy season is when I sow more ... (sometimes out of season) yes, with a little water they are born out of rainy season ...” P/R 3]. For off-season crops, they use drinking water from the local distribution network “... we use tap water... there the water comes as now...” [P/R 2], although this activity is limited by the poor distribution of water in the area “... I ration the water that I store in two water tanks, from which I take two buckets to water the radishes, but only a little...” P/R 3], “...the water from the local distribution network came until today...” P/R 10].

The type of fertilizer used by the producers/collectors is organic type and they report the following: “...the garbage (fruit and vegetable peels) from the house is spread on the plants and when we turn the soil over to plant we cover the garbage...” P/R 6], “...the manure from the horses, bulls, sheep, pigs (they fertilize once or twice a year) is used when it rains, and the “fat” (lixiviates) drains off, which maintains the plants along the dry season, they no longer need a lot maintenance...” and “... the yard is shared with my son’s fattening bulls, he has little bull breeds, and he collects the manure and throws it on the plants...” P/R

ahí tapamos la basura...” [P/R 6], “...de los caballos, toros, borregos, cerdo (abona una o dos veces al año) se aprovecha cuando llueve, le escurre la grasita del abono, y en tiempo de secas de ahí tienen mantenimiento, ya no necesitan mucho ni que les esté echando tanto...” [P/R 1] y “...es patio compartido con la engorda de toros que tiene mi hijo, él tiene sus toritos, y él junta el abono y les echa a las plantas...” [P/R 2]. Por la dedicación que le tienen a sus cultivos no usan plaguicidas ni fertilizantes inorgánicos, “...no uso plaguicidas, deshierbo frecuentemente...” [P/R 1].

Cuando realizan el corte y recolección de las plantas, fuera de sitio, dejan partes de la planta que no son comerciales y evitan la quema “...nosotros no quemamos, al contrario lo tepachamos (corte y abandono de restos no útiles de la planta) para el abono, este temecate (tallos, raíces y zacate) mejor vengo y lo arranco y se lo doy a mis borreguitos lo comen o lo molemos cuando molemos zacate...” [P/R 1], esta estrategia evita la desertificación de la tierra “... la hojita que cae ahí queda para abonito...” [P/R 4], y la erosión hídrica de la zona “... la lluvia que cae fortalece a la tierra más...” [P/R 4].

La agroecología está basada en un conjunto de conocimientos y técnicas que se desarrollan a partir de los agricultores y sus procesos de experimentación. Por esta razón se enfatiza en la capacidad de las comunidades locales para experimentar, evaluar y ampliar su aptitud de innovación mediante la investigación de agricultor a agricultor utilizando herramientas del extensionismo horizontal (Altieri y Toledo, 2010).

Las prácticas agroecológicas son parte de la resistencia a la Revolución Verde que desde 1960 desplazó la valoración histórica, la co-evolutiva y la memoria cultural de los sistemas agrícolas locales, indígenas y tradicionales en México. La tendencia las llevó hacia la introducción de insumos y tecnologías para aumentar los rendimientos que respondieran a la demanda del mercado, y se redujo la dimensión socioeconómica a solo la económica (Hernández-Xolocotzi, 1985).

De acuerdo con los individuos entrevistados, la siembra y recolección de plantas medicinales son parte de la tradición y el conocimiento transmitido intergeneracionalmente y su realización de traspatio permite que exista un enfoque ecológico mejor con una eficiencia económica baja, debido a que el consumo es local y no existe una demanda continua.

2]. Because of their dedication to their crops, they do not use pesticides or inorganic fertilizers, “...I do not use pesticides, as I made weeding by hand...” [P/R 1].

When they cut and collect the plants, off-site, they leave parts of the plant that are not commercial and avoid burning “...we don't burn, on the contrary we cut it and abandon the remains of the plant (“tepachamos”) the remains for compost, this temecate (this is, the stem, roots and grass) is pulled out and I give it as food to my little lambs or grind it when we grind grass... [P/R 1], this strategy “... the little leaf that falls there is left for natural decay...”. [P/R 4] prevents the desertification of the land, and the water erosion “... the falling rain strengthens the land more...” [P/R 4] of the area.

Agroecology is based on a set of knowledge and techniques that are developed from farmers and their experimental processes. For this reason, emphasis is made on the capacity of local communities to experiment, evaluate, and expand their ability for innovation through farmer-to-farmer research using horizontal extension tools (Altieri and Toledo, 2010).

Agro-ecological practices are part of the resistance to the Green Revolution, that since 1960, displaced the historical valuation, the co-evolutionary and cultural memory of local, indigenous and traditional agricultural systems in Mexico. The trend led them to introduce inputs and technologies to increase yields in response to market demand, and the socioeconomic dimension was reduced to an economic one (Hernández-Xolocotzi, 1985).

According to the individuals interviewed, the planting and harvesting of medicinal plants is part of the tradition and knowledge transmitted intergenerationally and its implementation at backyards allows for a better ecological approach with low economic efficiency, because consumption is local and there is no continuous demand.

Collectors and producers mentioned 35 species of plants (endemic and adapted) that are used as medicinal plants (Table 2). Of these, 17 are collected on the slopes of volcanoes, nine are grown in backyards due to their properties and for the remaining nine, both activities are carried out, depending on the season.

Socio-territorial

In the case of the only male producer-collector interviewed, he carries out the process of collecting,

Los productores recolectores mencionaron 35 especies de plantas (endémicas y adaptadas) que se usan como plantas medicinales (Cuadro 2). De éstas, 17 se recolectan en las laderas de los volcanes, nueve se cultivan en sus propiedades en traspatio y para las nueve restantes se realizan ambas actividades, lo cual depende de la temporada.

Socio-territorial

En el caso del único hombre productor recolector entrevistado, él realiza el proceso de recolección, venta y recomendaciones de uso de las plantas medicinales sin ayuda. Por el contrario, las mujeres tienen colaboración de los integrantes de la familia nuclear que pueden ser hijos o esposo o ambos. Los entrevistados se encuentran en un intervalo de edad de 50 a 78 años, con un nivel de escolaridad de secundaria.

La comercialización de plantas medicinales es una práctica complementaria a los ingresos económicos familiares porque la agricultura es la base de la economía familiar “...también sembramos maíz y frijol en otros terrenos que tenemos...” [P/R 2], la producción agrícola es para autoconsumo y el excedente se comercializa “...sembramos frijol y maíz para comer en el año...” [P/R 1].

Las productoras recolectoras mencionan que por la edad son dependientes económicos de sus hijos y ellos les permiten sembrar sus plantas en el traspatio y comercializarlas “...para tener un dinerito extra para mí...” [P/R 11], “...como vivo con mi hijo y mi nuera, ellos me dejan vivir con ellos, y me dan permiso de sembrar mis plantitas...” [P/R 10], “...para que me mantenga, yo estoy solita, nada más tengo un hijo pero ya se casó...” [P/R 8].

El tianguis de Ozumba surge de plantas medicinales al mercado Sonora de la Ciudad de México, lo cual ha generado nuevas necesidades en el productor recolector para satisfacer las exigencias del intermediario. Según Linares y Bye (2009) pueden agruparse en tres: el cultivo de plantas que no son endémicas, el cultivo de plantas que solo se recolectaban para uso local o familiar y la ampliación de relaciones sociales basadas en compadrazgo.

Los productores recolectores son originarios del municipio donde actualmente habitan, lo que ha generado una conciencia de arraigo a su localidad pues se perciben dentro del contexto histórico-ambiental “...me crecieron y crecieron mis hijos...” [P/R 9], “...mi esposo y yo somos de aquí y pues aquí nos quedamos, en

selling, and recommending the use of the medicinal plants without assistance. In contrast, women are assisted by members of the nuclear family who may be children or husbands or both. The interviewees are in an age range of 50 to 78 years old, with a high school education level.

The commercialization of medicinal plants is a complementary practice to family income because agriculture is the basis of the family economy “...we also plant corn and beans on other land that we have...”. [P/R 2], agricultural production is for self-consumption and the surplus is marketed “...we plant beans and corn to eat during the year...”. P/R 1].

The female harvesters mention that because of their age they are economically dependent on their children and they allow them to plant their plants in the backyard and market them “...to have a little extra money for me...”. P/R 11], “...as I live with my son and daughter-in-law, they let me live with them, and they let me sow my plants...” [P/R 10], “...to support me, I am alone, I only have a child, but he is already married...” P/R 8].

Ozumba's street market (*tianguis*) supplies medicinal plants to the Sonora market in Mexico City, which has generated new needs in the harvesting producer to satisfy the demands of the intermediary. According to Linares and Bye (2009) they can be grouped into three: the cultivation of non-endemic plants, the cultivation of plants that were only collected for local or family use, and the expansion of social relations based on relatives.

The harvesting producers are originally from the municipality where they currently live, which has generated an awareness of their roots in their locality, since they are perceived within the historical-environmental context “...I grew up here and so did my children...”. *My husband and I were born here and we stayed here in the village with our family.* P/R 5]. This rooting has led them to try to maintain a balance between society and the environment.

Economic

The presentation of their plants comes in bunches for their marketing. These are calculated by the amount contained inside a hand, for wholesale: “...I don't like to make my bunches that way, I like them to be fair sized (pointing out the circular space between the thumbs and indexes of both hands), of holy leaf, at least about 25 leaves, then I take them to Ozumba or

Cuadro 2. Características de las plantas medicinales que se usan en la zona de los volcanes.
Table 2. Characteristics of medicinal plants that are used in the volcanoes area.

Nombre científico	Nombre común	Uso	Acceso a la planta
<i>Artemisia absinthium</i>	Ajenjo [‡]	1, 2, 3	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Allium sativum</i>	Ajo [†]	4, 5, 6, 7, 8, 9	Cocina
<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca [†]	1	Ornato
<i>Erodium cicutarium</i>	Alfilerillo [‡]	10	Recolecta/tianguis
<i>Phalaris canariensis</i>	Alpiste [†]	8	Comercio naturista
<i>Heterotheca inuloides</i>	Arnica [‡]	8, 11, 12, 13, 14, 15	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Borago officinalis</i>	Borraja [‡]	16	Recolecta/tianguis
<i>Cinnamomum verum</i>	Canela [†]	5, 16, 17, 18	Cocina
<i>Prunus salicifolia</i>	Capulín [†]	2	Cocina
<i>Silybum marianum</i>	Cardo mariano [‡]	9	Recolecta/tianguis
<i>Aloysia citrodora</i>	Cedrón [†]	1, 19	Ornato
<i>Amphipterygium adstringens</i>	Cuachalalate [†]	19, 20	Comercio naturista
<i>Equisetum arvense</i>	Cola de caballo [‡]	2, 21	Cultivo/tianguis
<i>Taraxacum officinale</i>	Diente de león [‡]	12	Recolecta/tianguis
<i>Zea mays</i>	Elote [†]	12	Cocina
<i>Chenopodium glaucum</i>	Epazote de zorrillo [‡]	1, 4, 22	Recolecta/casa
<i>Artemisia ludoviciana</i>	Estafiate [‡]	1, 5	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto [‡]	17	Recolecta/tianguis
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	Flor de manita [‡]	8, 23	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Verbascum thapsus</i>	Gordolobo [‡]	5, 17	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Psidium guajava</i>	Guayaba [†]	19	Cocina
<i>Vicia faba</i>	Haba [†]	24	Cocina
<i>Eupatorium petiolare</i>	Hierba del ángel [‡]	13, 25	Recolecta/tianguis
<i>Eryngium carlinae</i>	Hierba del sapo [‡]	2, 12	Recolecta/tianguis
<i>Mentha spicata</i>	Hierbabuena [†]	1, 2	Cocina
<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla [‡]	16	Recolecta/tianguis
<i>Foeniculum vulgare</i>	Hinojo [‡]	1, 3, 19	Cultivo/tianguis
<i>Larrea tridentata</i>	Jarilla [‡]	13, 16	Recolecta/tianguis
<i>Agave lechuguilla</i>	Lechuguilla [‡]	11, 21, 26	Recolecta/tianguis
<i>Rumex crispus</i>	Lengua de vaca [†]	16, 21	Perenne
<i>Lepidium virginicum</i>	Lentejilla [‡]	2	Cultivo/tianguis
<i>Citrus limon</i>	Limón [†]	27	Cocina
<i>Pelargonium hortorum</i>	Malvón [†]	16, 24	Ornato
<i>Chamaemelum nobile</i>	Manzanilla [‡]	1, 11, 14, 19, 15	Cultivo/tianguis
<i>Marrubium vulgare</i>	Marrubio [‡]	18, 20	Recolecta/tianguis
<i>Lepidium sativum</i>	Mastuerzo [‡]	28, 29	Recolecta/tianguis
<i>Myrtus communis</i>	Mirto [‡]	30	Recolecta/tianguis
<i>Moringa oleifera</i>	Moringa [†]	8, 31, 32	Comercio naturista
<i>Justicia spicigera</i>	Muicle [‡]	33	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Citrus X sinensis</i>	Naranja [†]	30, 32	Cocina
<i>Eriobotrya japonica</i>	Nispero [‡]	1, 8, 12, 19	Cultivo/tianguis/alimento
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Nopal [†]	2	Cocina
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano [†]	5, 34	Cocina
<i>Cyclolepis genistoides</i>	Palo azul [†]	12	Comercio naturista
<i>Solanum tuberosum</i>	Papa [†]	24	Cocina
<i>Arctostaphylos pungens</i>	Pinguicua [†]	12	Comercio naturista
<i>Brickellia cavanillesii</i>	Prodigiosa [‡]	1, 2, 3, 19	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero [‡]	13	Cultivo/tianguis/alimento
<i>Rosa gallica</i>	Rosa de castilla [†]	14, 19, 24, 35	Ornato
<i>Ruta graveolens</i>	Ruda [‡]	1, 3, 4, 13, 24	Cultivo/tianguis/ornato
<i>Aloe vera</i>	Sábila [†]	31, 36, 37	Ornato
<i>Salvia officinalis</i>	Salvia o salve real [†]	1, 5, 21	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Leonotis nepetaefolia</i>	San Francisco [‡]	21	Recolecta/tianguis
<i>Tanacetum balsamita</i>	Santa María [†]	13	Perenne
<i>Sempervivum tectorum</i>	Siempre viva [†]	38	Ornato
<i>Waltheria indica</i>	Tapacola [‡]	19	Recolecta/tianguis
<i>Satureja macrostema</i>	Té de monte [‡]	1, 39	Recolecta/tianguis/perenne
<i>Cymbopogon citratus</i>	Té limón [‡]	40	Cultivo/tianguis/alimento
<i>Melissa officinalis</i>	Toronjil [‡]	30, 32	Recolecta/cultivo/tianguis
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Yaca [†]	31, 32	Cocina
<i>Pouteria sapota</i>	Zapote [‡]	8	Cultivo/tianguis

Uso: 1= dolor estomacal; 2= hipoglucemiante; 3= "enojos" o "corajes"; 4= antihelmíntico; 5= antitusivo; 6= colecistitis; 7= disentería; 8= presión arterial; 9= anticancerígeno; 10= herpes bucal; 11= antiséptico; 12= enfermedades renales; 13= baños para parturientas; 14= lavado oftálmico; 15= antiinflamatorio ocular; 16= antipirético; 17= enfermedades respiratorias; 18= hepatitis; 19= antidiarrea; 20= gastritis; 21= antiinflamatorio; 22= amibiasis; 23= enfermedades cardiovasculares; 24= cefaleas; 25= "empacho"; 26= dolor de riñones; 27= resfriado común; 28= orzuelos; 29= dermatitis solar hipocromizante; 30= insomnio; 31= colitis; 32= ansiolítico; 33= anemia; 34= dolores menstruales; 35= purgante; 36= acné; 37= amigdalitis; 38= carnosidades oftálmicas; 39= "limpias"; 40= té recreativo; †: mencionada por el adulto mayor; ‡=mencionada por el productor/recolector y el adulto mayor. ♦ Use: 1= stomach pain; 2= hypoglycemic; 3= "upsetting" or "anger"; 4= anthelmintic; 5= antitussive; 6= cholecystitis; 7= dysentery; 8= blood pressure; 9= anticarcinogenic; 10= oral herpes; 11= antiseptic; 12= renal diseases; 13= post birthing baths; 14= ophthalmic washing; 15= ocular anti-inflammatory; 16= antipyretic; 17= respiratory diseases; 18= hepatitis; 19= antidiarrheal; 20= gastritis; 21=anti-inflammatory; 22= amebiasis; 23= cardiovascular diseases; 24= headaches; 25= indigestion ("empacho"); 26= kidney pain; 27= common cold; 28= sties; 29= hypochromial solar dermatitis; 30= insomnia; 31= colitis; 32= anxietytic; 33= anemia; 34= menstrual cramps; 35= purgative; 36= acne; 37= tonsillitis; 38= ophthalmic pimples; 39= distress-relieving baths ("limpias"); 40= recreational tea; †= mentioned by the older adult; ‡= mentioned by the producer, collector and another older adult.

el pueblo con nuestra familia...” [P/R 5]. Este arraigo los ha llevado a tratar de mantener un balance entre la sociedad y el ambiente.

Económica

La presentación en que comercializan sus plantas es en manojos. Estos los calculan por la cantidad contenida dentro de las manos, para la venta al mayoreo “...no me gusta hacer mis manojitos así, me gusta que estén más o menos regularcitos (señala el espacio circular comprendido entre los pulgares e índices de ambas manos) *de hoja santa mínimo unas 25 hojas, ya ve que luego las llevo a Ozumba o para mi sobrina, pero no me gusta que mis manojos estén chiquitos, sino más o menos regulares cuando lo vendo...*” [P/R 8]. Para la venta al menudeo cambia la medida “...le calculo que tanto el manajo (señala con las manos y hace un círculo entre pulgar e índice)” [P/R 9].

El productor recolector menciona que el consumidor prefiere las plantas frescas, por eso la recolección se realiza un día antes de la comercialización, algunas plantas se introducen en recipientes con agua para mantener y conservar la frescura.

El precio puede variar, ya que si es mayoreo regularmente es establecido por el intermediario, pero no está alejado del precio en que se oferta en el tianguis “...nosotras pedimos más o menos y lo que nos ofrezcan... así lo vendemos...” [P/R 3], “...ella (intermediario) me los paga un poquito más, (¿el intermediario es quien determina la paga?) no, porque más o menos sé el precio al que están en Ozumba y mínimo a ese precio que me pague, que ella ya lo vaya a vender al (Mercado de) Sonora...” [P/R 1].

En la venta al menudeo el precio es establecido por el vendedor “...por ejemplo a 10 o 12 (pesos) cuando se puede, si hay, si no (en temporada de secas) ahí como se pueda, como venga (el cliente) ...lo más que les pido es a 15 (pesos), lo que ofrezca...” [P/R 4].

Los productores recolectores no consideran los gastos extras que les generan los insumos necesarios para transportar y comercializar sus plantas, pues la inversión inicial es mínima comparada con la ganancia que les genera “...si compro lazo (para vender en Ozumba), pues me voy en el pesero o como ahora que estuve llevando chayote como que me conviene otro poquito más porque ya llevo más cositas... y tomo un coche...” [P/R 9].

La demanda del consumidor puede ser cubierta por plantas medicinales en fresco o en seco, lo cual

to my niece, I don't like my bunches to be small when I sell them...” [P/R 8]. For retail sale, the measurement changes “...I calculate the size of the bunch (pointing with the hands and making a circle between thumb and index)” [P/R 9].

The collector and producer mentions that the consumer prefers fresh plants, that is why the harvesting is made one day before commercialization, some plants are introduced in containers with water to maintain and preserve the freshness.

The price may vary, since it is a regular wholesale, so the price is established by the intermediary, but it is not far from the price offered in the tianguis “...we do not ask for much more than what they offer us...is how we sell...” She (the intermediary) pays me a little more, (does the intermediary determine the payment?) no, because I know more or less the price at which they are sold in Ozumba and at least that price she should pay, let her sell at the price she wants in the Sonora market... (at Mexico City)” [P/R 1].

In retail sales, the price is set by the seller “...for example 10 or 12 (MXN pesos; 0.49 USD) when possible, if there is product, if not (in dry season), either way, whatever comes (the customer) ...the most I ask is 15 (MXN pesos; 0.73 USD), whatever the client offers...” [P/R 4].

The collectors and producers do not consider the extra expenses generated by the inputs needed to transport and market their plants, since the initial investment is minimal compared to the profit generated “...if I buy a rope (sold in Ozumba), I take the bus or a cab because I can carry more things, like when I was carrying chayote (*Sechium* spp.), cab is more convenient...” [P/R 9].

Consumer demand can be met by fresh or dry medicinal plants, which allows year-round availability, and producers collectors to maintain a delicate balance between the socio-territorial and the environmental, by allowing the plant to have periods for resilience.

The sale of medicinal plants by producers and collectors involves the knowledge of the uses that have been transmitted to them, not only the activity of buying and selling, some examples are: “...for cancer, the Santa María flower...sells for 25 (MXN pesos; 1.10 USD) the little bunch...; for strengthening of the blood, the muicle; for the fever, the borraja... 15 (MXN pesos; 0.73 USD), so take them with you...” [P/R 11]; “... if you can't sleep, the myrtle is the solution, you take a bath with it and if you don't want to take

permite disponibilidad todo el año, y que los productores recolectores mantengan un equilibrio delicado entre lo socioterritorial y lo ambiental, al permitir que la planta tenga periodos para resiliencia.

La venta de las plantas medicinales por los productores recolectores involucra el conocimiento de los usos que les han sido transmitidos, no únicamente la actividad de compra venta, algunos ejemplos son “...para el cáncer, el cardo mariano...de a 25 (pesos) el manojito...; fortalecimiento de la sangre, el muicle, la temperatura, la borraja...estos de a 15 (pesos) para que se los lleve...” [P/R 11]; “...el mirto es si no puede usted dormir, se baña usted con él y si no se quiere bañar se pone debajo de la almohada si es que no puede dormir...el manojito de a 20 (pesos) por que están frescos...” [P/R 5]; “...jarilla, es para cuando los niños tienen temperatura... (cuánto cuesta) de a 15 (pesos) el manojito, ya ve que esta gordito, trae bastantito...” [P/R 3]; “...es prodigiosa, para cuando hace corajes... de a 10 (pesos) el manojito” [P/R 6]; “...esta es salve real para el dolor de estómago...sí que lo puede llevar y ponerlo a secar y seco le sirve...” [P/R 7]

El conocimiento no es homogéneo, y es posible encontrar diferencias en las recomendaciones, “...*Árnica* que para las heridas, el *marrubio* que para la hepatitis... (el precio depende de la temporada) ahorita se la doy a 15 (pesos)...” [P/R 10]; “...el *marrubio*, para la gastritis...estafiate y el hinojo son buenos para el dolor de estómago... (¿cuánto cuestan?) 15 pesos cualquiera...” [P/R 8]. Todos los usos mencionados por los productores recolectores (Cuadro 2) forman parte de sus discursos de venta.

La pobreza rural conduce con frecuencia a estrategias desesperadas para la sobrevivencia en el intento de satisfacer las necesidades básicas a corto plazo, mientras que la sustentabilidad es a largo plazo. Por lo que debería de existir una revaloración de la agricultura dentro de la economía nacional y favorecer estrategias como la reforma del comercio internacional, la integración regional económica y la urbanización que conducirían a la reubicación de la agricultura y a una reestructuración de la producción agrícola (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Uso y consumo de plantas endémicas y propiedades medicinales

Los adultos mayores (consumidores) mencionaron el uso de 61 especies de plantas medicinales, de

a bath you put it under your pillow...the bunch is 20 (MXN pesos; 1 USD) because they are fresh... [P/R 5]; *jarilla is for kids with fever* (how much does it cost?), 15 (MXN pesos; 0.73 USD) *a bunch, you can see that this bunch looks fat here, it has quite a lot...*. *This is miraculous (prodigiosa), for you to keep calm when it comes to anger... 10 (MXN pesos; 0.49 USD) a bunch* [P/R 6]; “...*this is the real salvation for the stomach ache...you can take it and put it to dry and it is good for you...* [P/R 7].

The knowledge is not homogeneous, and it is possible to find differences in the recommendations, “...*They say Arnica for wounds, marrubio for hepatitis...* (the price depends on the season), 15 (MXN pesos; 0.73 USD) *considering the season...* ... *marrubio for gastritis...estafiate and fennel are good for stomach ache...* (how much are they?) 15 MXN pesos (0.73 USD), *any of them...* [P/R 8]. All of the uses mentioned by the harvesters (Table 2) are part of their sales pitches.

Rural poverty often leads to desperate survival strategies in the attempt to meet basic needs in the short term, while sustainability is long term. Therefore, there should be a reevaluation of agriculture within the national economy, favoring strategies such as international trade reform, regional economic integration and urbanization that would lead to the relocation of agriculture and a restructuring of agricultural production (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Use and consumption of endemic plants and medicinal properties

Older adults (consumers) mentioned the use of 61 species of medicinal plants. Of these, 35 are purchased in the Ozumba *tianguis* with the collectors and producers, five are purchased in naturist stores, six are ornamental plants, two are catalogued as wild perennials and 13 are used as ingredients in regional cuisine and are attributed some medicinal property, which is why they are appreciated twice as much (Table 2).

The World Health Organization (2019) mentioned that 20 to 39% of the population in Mexico practices and uses herbalism and that foods which have functional properties can be included in this category.

Older adults also perform the harvesting activity because some medicinal plants are found at the edge of the sidewalks and in neglected gardens (wild

estas, 35 se compran en el tianguis de Ozumba con los recolectores productores, cinco adquiridas en comercios naturistas, seis son plantas de ornato, dos se catalogan como perennes silvestres y 13 se utilizan como ingredientes de la cocina regional y se les atribuye alguna característica medicinal, por lo cual son apreciadas al doble (Cuadro 2).

La Organización Mundial de la Salud (2019) mencionó que del 20 al 39% de la población en México practica y usa la herbolaria y que los alimentos que tienen propiedades funcionales pueden incluirse en esta categoría.

Los adultos mayores también realizan la actividad de recolección debido a que algunas plantas medicinales las encuentran a orillas de las banquetas y en jardines descuidados (perennes silvestres), tales como Lengua de vaca (*Rumex crispus*), Santa María (*Tanacetum balsamita*) y Té de monte (*Satureja macrostema*).

Las plantas medicinales mencionadas y utilizadas con mayor frecuencia por los adultos mayores fueron: ajo (*Allium sativum*) como antitussivo y anticancerígeno, manzanilla (*Chamaemelum nobile*) como antiinflamatorio ocular, prodigiosa (*Brickellia cavanillesii*) para los “corajes”, árnica (*Heterotheca inuloides*) como hipotensor, antiinflamatorio ocular y enfermedades renales, epazote de zorrillo (*Chenopodium graveolens*) como antiparasitario y antihelmíntico, ajeno (*Artemisia absinthium*) como hipoglucemiante y para los “enjos”, hierbabuena (*Mentha spicata*) como hipoglucemiante y, por último, ruda (*Ruta graveolens*) en compresas para la cefalea, antiparasitario y para los “corajes”.

En su mayoría, las plantas medicinales mencionadas por los adultos mayores son endémicas de la zona oriente del estado de México, como la prodigiosa (*Brickellia cavanillesii*) “...para los corajes hasta cuando lo toma una persona que hizo coraje con la prodigiosa...” [AM 3], “...con la prodigiosa hacen copita...” [AM 4] y “...yo lo he tomado pero así sin alcohol...” [AM 5], el epazote de zorrillo (*Chenopodium graveolens*) “...el epazote para las amibas...” [AM 10], “...para los parásitos...” [AM 17], “...el epazote logra sacar las solitarias...” [AM 19], “...el té de epazote con hierbabuena...” [AM 26], y el ajeno (*Artemisia absinthium*) “...el ajeno es bueno porque es amargo y corta lo del azúcar...” [AM 16], “...el ajeno es muy bueno es amargoso en ayunas también...” [AM 24], “...pero el ajeno, es más amargo...” [AM 32], teniendo referencias ancestrales por los beneficios ali-

perennials), such as “Cow’s tongue” (*Rumex crispus*), Santa María (*Tanacetum balsamita*) and Mountain tea (*Satureja macrostema*).

The above mentioned medicinal plants and the most frequently used by the elders were garlic (*Allium sativum*) as antitussive and anticarcinogenic, chamomile (*Chamaemelum nobile*) as ocular anti-inflammatory; Miraculous (prodigiosa) (*Brickellia cavanillesii*) for “anger distress”; Arnica (*Heterotheca inuloides*) as hypotensive, ocular anti-inflammatory and for renal diseases; skunk Epazote (*Chenopodium graveolens*) as antiparasitic and anthelmintic; Absinthe (*Artemisia absinthium*) as hypoglycemic and for “anger distress”; Mint (*Mentha spicata*) as hypoglycemic; and finally Rue (*Ruta graveolens*) in pads for headache, antiparasitic and for “anger distress”.

Most of the medicinal plants mentioned by the older adults are endemic to the eastern part of the State of Mexico, such as the prodigiosa Miraculous (*Brickellia cavanillesii*) “...it’s good for people with anger distress...”. [AM 3], “...they use it to prepare drinks...” [AM 4] and “...I have taken it but without alcohol...” [AM 5], the skunk epazote (*Chenopodium graveolens*) “...the epazote for the amoebas...” [AM 10], “...for parasites...” [AM 17], “...the epazote manages to get *Taenia solium* out...” [AM 19], “...epazote tea with mint...” [AM 26], and absinthe (*Artemisia absinthium*) “...absinthe is good because it is bitter and cuts sugar blood content...” [AM 16], “...absinthe is very good, it is bitter, and it is also good for fasting...” [AM 24], “...but it is more bitter...” [AM 32]. They have ancestral references for the food and medicinal benefits that the plant provides to the improvement of various symptoms of some diseases.

The older adults mentioned that the use and consumption of medicinal plants (Table 2) goes back to their grandparents who regularly performed such herbalism practices “...my grandmother was a revolutionary and they would take care of themselves on the road with what they found in the open field, she was a nurse and they used that a lot...”. I remember when a child had a fever, my mother would put a “cow’s tongue” leave with butter on the soles of feet and belly. [AM 10], “...my dad lived 99 years and always took absinthe...” [AM 11].

Some other examples of how they passed on the knowledge are mentioned in their speeches: “... I have learned what people have told me, and my

mentarios y medicinales que aporta la planta en el mejoramiento de diversas sintomatologías propias de algunas enfermedades.

Los adultos mayores mencionaron que el uso y consumo de las plantas medicinales (Cuadro 2) se remonta desde sus abuelos quienes realizaban de forma habitual dichas prácticas de herbolaria “...mi abuela fue revolucionaria y ellas en el camino se atendían con lo que encontraban en el campo abierto y agarraban así y era enfermera y utilizaban mucho eso...” [AM 2], “...yo me acuerdo que mi mamá cuando tenía calentura algún niño le ponían la lengua de vaca con manteca en las plantas de los pies y en la panza...” [AM 10], “...mi papá dilató (vivió) 99 años y siempre tomo ajeno...” [AM 11].

Algunos otros ejemplos de cómo les transmitieron el conocimiento, lo mencionan en sus discursos “...yo he aprendido porque la gente me ha dicho y mi suegra era de Michoacán y más o menos yo veía los remedios...” [AM 17], “...es lo que nuestros padres nos inculcaron según ellos sus remedios caseros y todo...” [AM 21], “...a mí me daba mucha tos, hace rato me acordaba que mi hermana me cocía gordolobo con eucalipto y unos dientes de ajo...” [AM 9], “...mi suegra les hacía un té de manzanilla, hinojo, este cedrón y le digo que hay una hierba que parece la verdolaga que se da en la calle, no me acuerdo como se llama...” [AM 13].

Los adultos mayores mencionan que ellos intentan transmitir el conocimiento, pero encuentran resistencia de las nuevas generaciones a usar las plantas medicinales: “...le voy a llegar a decir a mi hija hazme un atole de masa y me va a decir prepáralo tú...” [AM 30], “...más que nada es otra generación por ejemplo nosotros le decimos a la nuera hazle tecito de este, si no más dicen que sí, pero no se lo hacen...” [AM 2], aunque se presentan excepciones “...tengo mi nuera, que toma mucho té de abango, yo ese ni lo conocía. Para que no les dé gripa, como preventivo o ya que la tienen, luego oigo mi niño que dice mi mamá me dio té de abango...” [AM 24].

El uso de la herbolaria está presente en la idiosincrasia de los mexicanos como demuestran estudios realizados en estados de México como Guerrero (Urióstegui-Flores, 2015), Nuevo León (González-Yáñez *et al.*, 2019), Veracruz (Lara-Reimers *et al.*, 2019), Tabasco (Villarreal-Ibarra *et al.*, 2014; Álvarez-Quiroz *et al.*, 2017), Jalisco (García de Alba *et al.*, 2012), y Ciudad de México (Mata *et al.*, 2019).

mother-in-law was from Michoacán and I knew more or less the remedies she knew.... [AM 17], “...it’s what our parents instilled in us; their home remedies and everything...” [AM 21], “...I used to have coughs all the time, I remember my sister cooking me mullein with eucalyptus and some garlic cloves...” [AM 9], “...my mother-in-law made them chamomile, fennel, and cedar tea, and as I told you, there is an herb that looks like purslane and grows in the street, but can’t remember its name...” [AM 13].

Older adults mention that they try to pass on the knowledge but encounter resistance from the new generations to use the medicinal plants: “...I’m going to tell my daughter to make me a maize atole and she’s going to tell me: prepare it yourself...” [AM 30], “...it’s another generation, for example, we tell my daughter-in-law to make that tea, and she say yes, but she does not do it...” There are also some exceptions, “...I have my daughter-in-law, who drinks a lot of abango tea, which I didn’t even know, and it serves to avoid flu, as a preventive, or it’s good to drink once they have it, and then I hear my grand-child say: my mother gave me abango tea...” [AM 24].

The use of herbalism is always present in the idiosyncrasy of Mexicans, as shown by studies conducted in Mexican states such as Guerrero (Urióstegui-Flores, 2015), Nuevo León (González-Yáñez *et al.*, 2019), Veracruz (Lara-Reimers *et al.*, 2019), Tabasco (Villarreal-Ibarra *et al.*, 2014; Álvarez-Quiroz *et al.*, 2017), Jalisco (García de Alba *et al.*, 2012), and Mexico City (Mata *et al.*, 2019).

The infusion of leaves, flowers, fruits, roots or stems of medicinal plants, commonly called “tea”, is the usual method of preparation, “...you pour a little bunch to boil and then drink it...” [AM 1], “...the flower and its calabash are boiled...” [AM 5], “...the boiled chamomile soaks in well so that it no longer has little petals...” [AM 16]. This form of preparation is not exclusive for ingesting, it is also useful as anti-inflammatory, to wash eyes, and wounds in some part of the body through the elaboration of poultices “...boil as tea, strain it and put some drops in a clean rag in case of infection (wounds)...” [AM 37], “...to wash out varicose veins...” (anti-inflammatory) [AM 15].

Herbal baths are common to relax and take advantage of the medicinal properties of plants, because some are given the characteristic of “hot effect” which is related to the anti-inflammatory

La infusión de hojas, flores, frutos, raíces o tallos de plantas medicinales, en lo común llamado “té”, es el método habitual de preparación, “...echa usted un manojito a hervir y ya luego se toma...” [AM 1], “...se pone a hervir la flor y su calabazo...” [AM 5], “...la manzanilla hervida nada más como tecito se cuela bien que no tenga ya petalitos...” [AM 16]. Esta forma de preparación no es exclusiva para ingerir también es útil como antiinflamatorio, para lavar ojos y heridas en alguna parte del cuerpo mediante la elaboración de cataplasmas “...hervida como tecito, colarla y en un trapo limpio echarle unas gotas y esa para cuando le da una infección (heridas)...” [AM 37], “...para lavar las venas varicosas...” (antiinflamatorio) [AM 15].

Los baños de hierbas son habituales para relajar y aprovechar las propiedades medicinales de las plantas, debido a que a algunas se les otorga la característica de “calientes” lo que se relaciona con la capacidad desinflamatoria debido a los componentes bioactivos contenidos en la planta “...cuando se baña uno con agua de hierbas hierba del ángel, este, jarilla, la ruda, el romero, albahaca, Santa María...” [AM 33], “...se pone a hervir si tienes un bracerito lo pones y cuando empiece la vaporización con una sábana o una toalla...” [AM 26], “...si hasta ahorita se sigue usando darles baños (a personas con fiebre) con esa, tibio para que reaccione...” [AM 8].

Los parches o rodajas muy pequeñas elaboradas de diversas plantas que se adhieren a las sienas se les conoce como “chiqueadores” “...de papa, de haba, se ponen para el dolor de cabeza...” [AM 4], “...yo en mis tiempos usaba, las habitas se ponían en las sienas...” [AM 4], en la actualidad la medicina alópata tiene mejor aceptación por la rapidez de efecto en el padecimiento.

La diversidad de plantas medicinales y los usos que reportan los adultos mayores responde a tres puntos: el primero es la ubicación geográfica de los municipios, el segundo es la perpetuación del conocimiento por medio de la comunicación oral, y el tercero es la forma de aplicación de la herbolaria para el tratamiento de algunas enfermedades. La sustentabilidad para los adultos mayores se construye como parte de una forma de conciencia ecológica y social aplicada en la cultura del cuidado de la vida (Toledo y Ortiz-Espejel, 2014).

capacity due to the bioactive components contained in the plant “...when one bathes with water from angel’s grass, this one; and jarilla, rue, rosemary, basil, Santa Maria...” [AM 33], “...you put the herbs to boil in a firewood stove (brasero) and when the vaporization begins, you put a sheet or a towel cover your head and breathe...” [AM 26], “...up to now they still give baths with that one (to people with fever), it has to be warm for them to react...” [AM 8].

The very small patches or slices made from various plants that adhere to the temples are known as “chiqueadores” “...made of potato, from bean, they are used for headaches...” [AM 4], “...back in my time I used them, the beans were put in the temples...” [AM 4]. Currently, allopathic medicine is better accepted because of the rapid effect on the condition.

The diversity of medicinal plants and the uses reported by the elders respond to three points: the first is the geographical location of the municipalities, the second is the perpetuation of knowledge through oral communication, and the third is the application form of herbal medicine for the treatment of some diseases. Sustainability for elders is built as part of a form of ecological and social awareness applied to life caring culture (Toledo and Ortiz-Espejel, 2014).

CONCLUSIONS

Herbalism in the eastern part of the State of Mexico presents diverse agro-ecological, socio-territorial and economic interactions, and for these reasons it is a sustainable practice. The process of collection and production is linked to the agro-ecosystem; producers have knowledge acquired by generations and empiricism. This knowledge may be at risk because some is being lost, the intergenerational transmissibility decreases and consequently the future of the activity decreases. Other risks are of economic nature due to low prices; despite this, the actors identify themselves as guardians of knowledge with the obligation to disseminate this practice.

In relation to the consumer, the transmission of knowledge is limited to a suggestion, because it is not always carried out by the receiver. The continuity of use in cases and the intensity in which it occurs in the three municipalities studied leads us to still

CONCLUSIONES

La herbolaria en la zona oriente del estado de México presenta interacciones agroecológicas, socio-territoriales y económicas diversas, y por tales motivos es una práctica sustentable. El proceso de recolección y producción está ligado al agroecosistema, los productores tienen conocimientos adquiridos por generaciones y empirismo. Estos saberes pueden estar en riesgo porque algunos se están perdiendo, la transmisibilidad intergeneracional disminuye y en consecuencia el futuro de la actividad también. Otros riesgos son económicos debido a los bajos precios; a pesar de esto, los actores se identifican como guardianes del conocimiento con la obligación de difundir esta práctica.

En relación con el consumidor, la transmisión del conocimiento se limita a una sugerencia, porque no siempre se lleva a la práctica por parte del receptor. La continuidad de los casos de uso y la intensidad en la que ocurre en los tres municipios estudiados lleva a considerar a la herbolaria todavía como una práctica sustentable. Los actores involucrados en la cadena de producción de plantas medicinales no son del todo conscientes de que su diálogo de saberes permanente, la inclusión de valores, cosmovisiones e identidades de su cultura local, y la transmisión intergeneracional de las prácticas agroecológicas, socio-territoriales y económicas que realizan, ha permitido conservar el equilibrio frágil de la producción de plantas medicinales de la zona.

LITERATURA CITADA

- Altieri M., y V. M. Toledo. 2010. La revolución agroecológica de América Latina: rescatar la naturaleza, asegurar la soberanía alimentaria y empoderar al campesino. *El Otro Derecho* 42: 163-202.
- Álvarez-Quiroz V., L. Caso-Barrera, M. Aliphath-Fernández, y Á. Galmiche-Tejeda. 2017. Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque de Ayapa, Tabasco, México. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Medic. Aromát.* 16: 428-454.
- Andrade-Cetto A., and M. Heinrich. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99: 325-348.
- Astier M. Argueta J., Q. Orozco-Ramírez, M. González, V. Morales, J. Gerritsen P., and R. Sánchez-Sánchez. 2017. Back to the roots: understanding current agroecological movement, science, and practice in Mexico. *Agroecol. Sustain. Food Syst.* 41: 329-348.
- Chen S., L., H. Yu, M. Luo H., Q. Wu, F. Li C., and A. Steinmetz. 2016. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese Med.* 11: 1-10.
- Cussy-Poma V., E. Fernández, J. Rondevaldova, H. Foffová, and D. Russo. 2017. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in the Qampaya District, Bolivia. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Medic. Aromát.* 16: 68-77.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2019. Los 10 elementos de la agroecología. *Food and Agric. Org. Series pp:* 1-15.
- Fernandes P., and P. Boff. 2017. Medicinal plants in the family farms of rural areas in southern Brazil: ecological and ethnobotanical aspects. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Medic. Aromáticas.* 16: 493-505.
- García de Alba, García J., E. Ramírez Hernández B. C., G. Robles Arellano, J. Zañudo Hernández, L. Salcedo Rocha A., y E. García de Alba Verduzco J. 2012. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos.* 39: 29-44.
- Gobierno del Estado de México. 2017. Plan de Desarrollo. Región I Amecameca Programa Regional 2011-2017. pp: 55-57.
- González-Yáñez, M. G., C. Rivas-Morales, M. A. Oranday-Cárdenas, M. J. Verde-Star, M. A. Núñez-González, E. Sánchez, and C. Leos-Rivas. 2019. Safety of aqueous extract of *Calea ternifolia* used in Mexican traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2019: 1-7.
- Gudynas, E. 2004. *Ecología, Economía y Ética del Desarrollo Sostenible*, 5ta. edición revisada, Editorial Coscoroba, Montevideo, Uruguay. 257 p.
- Gutiérrez C., J., G. Aguilera Gómez L. I., y E. González Esquivel C. 2008. Agroecología y sustentabilidad. *Convergencia.* 46: 51-87.
- Hernández-Xolocotzi, E. 1985. *Xolocotzia: Obras de Efraim Hernández Xolocotzi*. Tomo 1. *Revista de Geografía Agrícola*. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, México. 527 p.

—End of the English version—

-----*-----

- Lara-Reimers, E. A., D. J. Lara Reimers, P. Chaloupkova, J. M. Zepeda del Valle, L. Milella, and D. Russo. 2019. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Papantla, Veracruz, Mexico. *Plants*. 8: 1-20.
- Leff E. 2004. Racionalidad Ambiental: la Reapropiación Social de la Naturaleza. México. Siglo XXI. 509 p.
- Linares E., y R. Bye. 2009. La dinámica de un mercado periférico de plantas medicinales en México: el tianguis de Ozumba, Estado de México, como centro acopiador para el mercado de Sonora (mercado central). *Históricas Digital. Serie Historia General. Caminos y mercados de México*. UNAM-INAH. 23: 631-664.
- López L., V., M. 2008. Sustentabilidad y Desarrollo Sustentable. México: Trillas. 202 p.
- Martin G., J. 2004. *Ethnobotany: a methods manual* (Vol. 1) Springer. US. pp: 8-25.
- Martínez G., J. 2005. Recolección y comercialización de plantas medicinales en el departamento Santa María, provincia de Córdoba, Argentina. *Acta Farmac. Bonaer.* 24: 575-584.
- Mata, R., M. Figueroa, A. Navarrete, and I. Rivero-Cruz. 2019. Chemistry and biology of selected mexican medicinal **plants**. *In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 108. Kinghorn A., H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi, Y. Asakawa, and J. K. Liu (eds). Springer, Cham. pp: 1-142
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2013. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2014-2023. Ginebra, Suiza. 75 p.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2019. WHO Global Report on Traditional and complementary Medicine 2019. World Health Organization. 226 p.
- Parthiban R., S. Vijayakumar, S. Prabhu, and E. M. Yabesh J. G. 2016. Quantitative traditional knowledge of medicinal plants used to treat livestock diseases from Kudavasal taluk of Thiruvavur district, Tamil Nadu, India. *Ver. Bras. Farmacog.* 26: 109-121.
- Toledo V., y B. Ortiz-Espejel. 2014. México, Regiones que caminan hacia la Sustentabilidad: Una Geopolítica de las Resistencias Bioculturales. Universidad Iberoamericana Puebla. 146 p.
- Toledo V., M., 2002. Agroecología, sustentabilidad y reforma agraria: la superioridad de la pequeña producción familiar. *Agroecología e Desarrollo Rural Sustentável.* 3: 27-36.
- Urióstegui-Flores A. 2015. Hierbas medicinales utilizadas en la atención de enfermedades del sistema digestivo en la ciudad de Taxco, Guerrero, México. *Rev. Salud Pública.* 17: 85-96.
- Villarreal-Ibarra E., C. García-López E. López P., A. Palma-López D., J. Lagunes-Espinoza L., D., C. Ortiz-García C., y F. Oranday-Cárdenas A. 2014. Plantas útiles en la medicina tradicional de Malpasito-Huimanguillo, Tabasco, México. *Polibotánica.* 37: 109-134.

OPTIMIZATION TECHNIQUE FOR GENOMIC DNA ISOLATION FROM BOVINE SPERM

OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE ESPERMATOZOIDES DE TORO

Martha **Vázquez-Aguirre**¹, Javier de Jesús **Valencia-Méndez**¹, Manuel **Barrientos-Morales**², Noé Orlando **Juárez-López**¹, Alejandro **Córdova-Izquierdo**³, Juan Manuel **Pinos-Rodríguez**², María de Lourdes **Juárez-Mosqueda**^{1*}

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad #3000, Colonia, C.U., Coyoacán, CP 04510, CDMX, México. (ma_vag@yahoo.com.mx), (jjvm@servidor.unam.mx), (noeorlando@comunidad.unam.mx), (luerfco@unam.mx). ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Miguel Ángel de Quevedo S/N, Colonia Unidad Veracruzana, 91710, Veracruz, México. (mbarrientos@uv.mx), (jpinos@uv.mx). ³Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Coyoacán, CDMX, México. (acordova@correo.xoc.uam.mx)

ABSTRACT

The bull sperm cells exhibit specific structures that protect their DNA, and therefore, the standard techniques used for somatic DNA isolation are not efficient. Thus, our objective was to design an inexpensive, quick and efficient bull sperm DNA isolation, under the hypothesis that the appropriate combination of chemical agents and a set of alternatives would allow us to design an improved method to extract DNA from bull sperm to be used in PCR assays. A series of replicates obtained from five ejaculates were used to evaluate six methods to extract bull sperm DNA: 1) the conventional method using proteinase K and phenol-chloroform; 2) papain, DTT, DMSO, CTAB, and SDS method (to solubilize the perinuclear theca and to replace phenol-chloroform); 3) the nonionic detergent Brij 36-T method, to remove the plasma membrane; 4) DTT and heparin method, for nuclear chromatin de-condensation; 5) SDS method and; 6) CTAB method, to remove the plasma membrane. DNA samples were analyzed spectrophotometrically to determine the DNA concentration and purity, then used at 200, 100, 50, 25, and 12.5 ng for PCR assays. To evaluate repeatability of the method, replicates of the most efficient procedure were performed. Results showed that the best method for bull sperm DNA extraction was the use of CTAB as a membrane removal agent; papain, DTT and DMSO as lysis buffer and DTT, heparin, and SDS as decondensing solution, achieving concentration ranging from

RESUMEN

Los espermatozoides de toro exhiben estructuras específicas que protegen su ADN y, por lo tanto, las técnicas estándar utilizadas para el aislamiento del ADN somático no son eficientes. Así pues, nuestro objetivo fue diseñar un aislamiento del ADN de espermatozoides de toro que fuera económico, rápido y eficiente, con la hipótesis de que la combinación adecuada de agentes químicos y un conjunto de alternativas nos permitirían diseñar un método mejorado para extraer el ADN de los espermatozoides de toro para su utilización en los ensayos de PCR. Una serie de réplicas obtenidas de cinco eyaculados se utilizó para evaluar seis métodos de extracción de ADN de espermatozoides de toro: 1) el método convencional que utiliza la proteína K y el fenol-cloroformo; 2) el método de papaína, DTT, DMSO, CTAB y SDS (para solubilizar la teca perinuclear y reemplazar el fenol-cloroformo); 3) el método del detergente no iónico Brij 36-T para eliminar la membrana plasmática; 4) el método del DTT y la heparina para la descondensación de la cromatina nuclear; 5) el método SDS y; 6) el método CTAB para eliminar la membrana plasmática. Las muestras de ADN se analizaron espectrofotométricamente para determinar la concentración y la pureza del ADN, y luego se utilizaron en cinco cantidades (200, 100, 50, 25 y 12.5 ng) para los análisis de PCR. Para evaluar la repetibilidad del método, se realizaron réplicas del procedimiento más eficiente. Los resultados mostraron que el mejor método para la extracción de ADN de espermatozoides de toro fue el sexto, basado en el uso del CTAB como agente de remoción de membranas; papaína, DTT y DMSO como tampón de lisis y DTT, heparina y SDS como solución de descondensación, y se logró una concentración

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: March, 2020. Approved: July, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 1059-1077. 2020.

63 to 154 ng μL^{-1} and optimal quality ($A_{260}/A_{280} = 1.75$ and 1.73) in fresh and frozen semen extracting, respectively. In conclusion, considering the structural characteristics of the sperm cell, we designed a method simple and efficient for extracting bull sperm DNA without limitations in PCR. Also, the whole procedure can be done in a short period of time without the need to employ phenol-chloroform and proteinase K treatment.

Key words: PCR, DNA isolation, *Bos taurus*, spermatozoa.

INTRODUCTION

The DNA analysis using the different varieties of PCR can contribute to the understanding of biochemical processes (Xavier *et al.*, 2018), sex-linked genetic diseases (Sarova *et al.*, 2018), and problems of fertility (Lingzhao *et al.*, 2019) in sperm. It is also used as a validation technique for sexing sperms (Chandler *et al.*, 2007). To carry out these studies, it is essential to obtain nucleic acids in good condition and free of contaminants; that is, the quality, quantity and purity DNA should be suitable (Demeke and Jenkins, 2010). Quality refers to the possibility of storing DNA indefinitely, maintaining its structure and properties and, therefore, it is the factor responsible for reproducibility in subsequent experiments or for the success of the others applications, which can be sequencing, Southern Blot, and preparation of genomic libraries. To guarantee the quality of the DNA, the preparations must be free of DNA nucleases. Quantity is a relative concept that depends on the number and state of the own cells to study; high quantities of pure DNA are required for the creation of DNA-banks. Additionally, a DNA free of proteins and the chemicals used in the initial purification processes guarantees a high degree of purity (Cotton and Fisher, 2015; Mariyam and Preetha, 2020).

Great progress was made in the simplification of DNA isolation, but there is no a universal automated method to use with any type of sample; DNA isolation methods used for mammalian somatic cells are ineffective for mammalian sperm (Griffin, 2013; Mariyam and Preetha, 2020). There are reports about procedures for the DNA sperm isolation and those most popular use a combination of detergents or chaotropic salts or both to facilitate cell lysis, and proteinase K (ProK) to digest nuclear proteins. Also, about reducing agents to break disulfide bonds

que oscilaba entre 63 y 154 ng μL^{-1} y una calidad óptima ($A_{260}/A_{280} = 1.75$ y 1.73) en la extracción de semen fresco y congelado, respectivamente. En conclusión, considerando las características estructurales del espermatozoide, diseñamos un método simple y eficiente para extraer el ADN de los espermatozoides de toro sin limitaciones en la PCR. Además, todo el procedimiento puede realizarse en un período corto de tiempo, sin necesidad de emplear el tratamiento con fenol-cloroformo y proteinasa K.

Palabras clave: PCR, aislamiento de ADN, *Bos taurus*, espermatozoides.

INTRODUCCIÓN

El análisis del ADN utilizando las diferentes variedades de PCR puede contribuir a la comprensión de los procesos bioquímicos (Xavier *et al.*, 2018), las enfermedades genéticas vinculadas al sexo (Sarova *et al.*, 2018) y los problemas de fertilidad (Lingzhao *et al.*, 2019) en el esperma. También se utiliza como técnica de validación para sexar los espermatozoides (Chandler *et al.*, 2007). Para realizar estos estudios es fundamental obtener ácidos nucleicos en buen estado y libres de contaminantes; es decir, la calidad, cantidad y pureza del ADN debe ser adecuada (Demeke y Jenkins, 2010). La calidad se refiere a la posibilidad de almacenar el ADN indefinidamente, manteniendo su estructura y propiedades y, por lo tanto, es el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores o del éxito de las demás aplicaciones, que pueden ser la secuenciación, el Southern Blot y la preparación de bibliotecas genómicas; para garantizar la calidad del ADN, las preparaciones deben estar libres de nucleasas de ADN. La cantidad es un concepto relativo que depende del número y del estado de las propias células a estudiar; se requieren grandes cantidades de ADN puro para la creación de los bancos de ADN. Además, un ADN libre de proteínas y de los productos químicos utilizados en los procesos iniciales de purificación garantiza un alto grado de pureza (Cotton y Fisher, 2015; Mariyam y Preetha, 2020).

Grandes progresos se han efectuado en la simplificación del aislamiento de ADN, pero no existe un método automatizado universal que pueda utilizarse con cualquier tipo de muestra; los métodos de aislamiento del ADN usados para las células somáticas de mamíferos son ineficaces para el esperma de mamíferos (Griffin, 2013; Mariyam y Preetha, 2020). Hay

between protamines; most protocols recover DNA from sperm lysate through the organic solvent phenol-chloroform or silica-based spin columns (Wu *et al.*, 2015). However, they have drawbacks and are impractical mainly due to the incubation periods that extend the extraction process from one to two days (Griffin, 2013).

Researchers use kits to extract sperm DNA and employ modified protocols; for instance, thawed goat semen. A wide use of the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) produces low DNA concentration, and its purity changes from below and above ideal values; similarly, the isolation with Chelex-100 yields high DNA concentration values, but its purity is below the ideal (Silva *et al.*, 2014). The use of Flinders Technology Associates (FTA[®]) classic cards was suitable for human sperm DNA isolation. However, although DNA was of sufficient quality for amplification, there was a possible protein contamination and the yield was not always sufficient for PCR use (Serra *et al.*, 2018). A method for human or mice sperm DNA isolation, with a commercially-available guanidium thiocyanate lysis buffer and incorporating three different commercial silica-based spin columns, yielded > 90% high-quality DNA (Wu *et al.*, 2015). Some commercial kits offer quick, easy, and efficient methods for DNA isolation, but they can be expensive and designed for DNA isolation from somatic cells; therefore, they are ineffective for mammalian sperm (Griffin, 2013; Mariyam and Preetha, 2020).

An aspect of great relevance to consider for DNA isolation is that sperm cells differ from the somatic cells in components and architecture. Unlike somatic cells, two characteristics make sperm DNA isolation difficult: the first one is the presence of the perinuclear theca, which in bull sperm is relatively more resistance to solubilization (Sutovsky *et al.*, 1997), and the second one is that the DNA proteins are compacted by strong bonds, forming highly condensed chromatin, which is found in high concentrations in bulls (Johnson *et al.*, 2015; Ukogu *et al.*, 2020). For this reason, most methods do not adequately extract DNA from bull sperm cells (Pacheco *et al.*, 2011).

The objective of this study was to propose a simpler and rapid protocol to isolate high-quality bull sperm DNA both economical and reliable at a large scale, under the hypothesis that the appropriate

informes sobre procedimientos para el aislamiento del ADN de los espermatozoides y los más populares utilizan una combinación de detergentes o sales caótropas o ambos para facilitar la lisis celular, la proteínasa K (ProK) para digerir las proteínas nucleares. También, sobre agentes reductores para romper los enlaces de disulfuro entre las protaminas; la mayoría de los protocolos recuperan el ADN del lisado del espermatozoides a través del disolvente orgánico fenol-cloroformo o columnas de espín a base de sílice (Wu *et al.*, 2015). Sin embargo, tienen inconvenientes y son poco prácticos, principalmente debido a los períodos de incubación que prolongan el proceso de extracción de uno a dos días (Griffin, 2013).

Los investigadores utilizan kits para extraer el ADN de los espermatozoides y emplean protocolos modificados; por ejemplo, en semen descongelado de cabra. Un uso amplio del Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) produce una baja concentración de ADN, y su pureza cambia por debajo y por encima de los valores ideales; de manera similar, el aislamiento con Chelex-100 produce valores altos de concentración de ADN, pero su pureza está por debajo del ideal (Silva *et al.*, 2014). El uso de las tarjetas clásicas de Flinders Technology Associates (FTA[®]) fue adecuado para el aislamiento del ADN del espermatozoides humano. Sin embargo, aunque el ADN era de calidad suficiente para la amplificación, había una posible contaminación proteínica y el rendimiento no siempre era suficiente para uso de la PCR (Serra *et al.*, 2018). Un método para el aislamiento de ADN del espermatozoides humano o de ratón, disponible en el mercado con un tampón de lisis de tiocianato de guanidinio y que incorporaba tres diferentes columnas de centrifugación a base de sílice, producía ADN de alta calidad > 90% (Wu *et al.*, 2015). Algunos equipos comerciales ofrecen métodos rápidos, fáciles y eficaces para el aislamiento del ADN, pero pueden ser caros y diseñados para el aislamiento del ADN de las células somáticas; por lo tanto, son ineficaces para el espermatozoides de mamíferos (Griffin, 2013; Mariyam and Preetha, 2020).

Un aspecto de gran relevancia a considerar para el aislamiento del ADN es que las células espermáticas difieren de las células somáticas en sus componentes y arquitectura. A diferencia de las células somáticas, hay dos características que dificultan el aislamiento del ADN de los espermatozoides: la primera es la presencia de la teca perinuclear, que en el espermatozoides

combination of chemical agents and a set of alternatives would allow us to design an improved method to extract DNA from bull sperm to be used in PCR assays.

MATERIALS AND METHODS

Chemical agents

Chemical agents were acquired from Sigma-Aldrich distributors, catalogues: Papain (P3375-25G), PureGenome® Proteinase K (72635), DL-Dithiothreitol (D-0632), DMSO (D5879-100ML), NaCl (S3014), Trizma® base (T1503-500G), Heparin sodium salt (H5515), CTAB (52365), Acetone (179973), Ethanol (459836), Ethidium bromide (E8751), Sodium acetate (S2889); Chem Industry, catalogue: Brij 36-T (9006-65-9); Clontech, catalogue: Kit Taq polimerasa Titanium (75831), 10X Titanium Taq PCR Buffer (S1793), Advantage® Utrapure PCR Deoxynucleotides Mix (639125); USB Corporation catalogue: phenol equilibrated (75829), phenol-chloroform (75831); Bio-Rad, catalogue: SDS (161-0302), 50X TAE (151-0773) and; Invitrogen, catalogue: 1 Kb Plus DNA Ladder (10787-026).

Samples

The semen samples were collected from two mature health bulls (Brown Swiss dairy breed) housed at the Practical Teaching, Production, Research and Animal Health Center, Mexico (119° N, 99° W), which belongs to the Veterinary Medicine and Zootechnics Faculty of the National University Autonomous of Mexico (FMVZ-UNAM). The bulls, aged of 48 months, 650 kg live body weight, were kept in a 22 m² free stall barn under natural light conditions and temperatures ranging between 15 and 25 °C. The daily feed for each bull was: 18% protein concentrate, 2.5 kg; oats, 1 kg; barley, 0.5 kg; hay or silage, 8 kg; and mineral mix, 100 g; they had *ad libitum* access to water. Semen was collected, on alternating days, using an artificial vagina.

Ejaculates were identified with numbers 1 through 5, when collected. For transportation to the laboratory ejaculates were diluted 3:1 (v/v) with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4); a monitored polyurethane thermal box was used to transport the collected semen at 25 °C. The samples were washed by centrifugation at 2800 x *g* for 5 min and re-suspended in PBS to a concentration of 30 x 10⁶ cells mL⁻¹, which were aliquoted into microcentrifuge tubes, and used immediately in the DNA extraction tests or were snap frozen and stored at -20 °C until use.

de toro es relativamente más resistente a la solubilización (Sutovsky *et al.*, 1997), y la segunda es el hecho de que las proteínas del ADN se compactan mediante fuertes enlaces y forman cromatina altamente condensada, que se encuentra en altas concentraciones en los toros (Johnson *et al.*, 2015; Ukogu *et al.*, 2020). Por esta razón, la mayoría de los métodos no extraen adecuadamente el ADN de los espermatozoides de los toros (Pacheco *et al.*, 2011).

El objetivo de este estudio fue proponer un protocolo más sencillo y rápido para aislar el ADN de espermatozoides de toro de alta calidad de manera económica y probado a gran escala, con la hipótesis de que la combinación adecuada de agentes químicos y un conjunto de alternativas nos permitiría diseñar un método mejorado para extraer el ADN de los espermatozoides de toro y ser utilizado en los ensayos de PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Agentes químicos

Los agentes químicos se adquirieron de los distribuidores de Sigma-Aldrich, catálogos: Papaína (P3375-25G), PureGenome® Proteinase K (72635), DL-Ditiotreitrol (D-0632), DMSO (D5879-100ML), NaCl (S3014), Trizma® base (T1503-500G), heparina sal sódica (H5515), CTAB (52365), acetona (179973), etanol (459836), bromuro de etidio (E8751), acetato de sodio (S2889); Chem Industry, catálogo: Brij 36-T (9006-65-9); Clontech, catálogo: Kit Taq polimerasa Titanium (75831), 10X Titanium Taq PCR Buffer (S1793), Advantage® Utrapure PCR Deoxynucleotides Mix (639125); USB Corporation, catálogo: fenol equilibrado (75829), fenol-cloroformo (75831); Bio-Rad, catálogo: SDS (161-0302), 50X TAE (151-0773) y; Invitrogen, catálogo: 1 Kb Plus DNA Ladder (10787-026).

Muestras

Las muestras de semen se recolectaron de dos toros maduros saludables (raza lechera Pardo Suizo) alojados en el Centro de Enseñanza Práctica, Producción, Investigación y Salud Animal, México (119° N, 99° O), que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). Los toros, de 48 meses de edad y 650 kg de peso corporal vivo, se mantuvieron en un establo de 22 m² de superficie, con luz natural y temperaturas que oscilaban entre 15 y 25 °C. La alimentación diaria de cada toro fue: 18% de concentrado de proteína, 2.5 kg; avena, 1 kg; cebada, 0.5 kg;

Sample pre-treatment

The sperm cells concentration used in each test was 2.5×10^6 cells mL^{-1} . The first pre-treatment step was common to all the six methods, that is, 500 μL semen aliquots at a concentration of 2.5×10^6 cells mL^{-1} were washed three times at $2\ 800 \times g$ for 3 min each one with PBS. The spermatocytic cell pellet was then treated with the different buffers according to each method.

DNA isolation methods

The study consisted of optimizing a technique of DNA isolation with five modifications to a generalized technique for somatic cells, which was adapted for application with bull sperm cells. All the methods are listed in Table 1.

Method 1

Total DNA was extracted with phenol-chloroform. Each pellet was resuspended in 500 μL^{-1} of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and centrifuged again. To each pellet, 500 μL^{-1} lysis solution (TE buffer supplemented with 1% proteinase K) (Di Prieto *et al.*, 2011) was added and the mixture was incubated at 55 °C for 24 h, then centrifuged at $8\ 800 \times g$ for 5 min and washed twice with 500 μL^{-1} of 50 mM Tris HCl, pH 8.9. The pellet was resuspended with 500 μL^{-1} phenol equilibrated with Tris-HCl, pH 7.8, then passed through vortex and centrifugation at $10\ 400 \times g$ for 10 min, the bottom phase was discarded by aspiration and this step was repeated twice.

heno o ensilado, 8 kg; y mezcla de minerales, 100 g; tenían acceso *ad libitum* al agua. El semen fue recolectado, en días alternos, usando una vagina artificial.

Los eyaculados se identificaron con números del 1 al 5. Para su transporte al laboratorio los eyaculados se diluyeron 3:1 (v/v) con amortiguador de fosfato salino (PBS, pH 7.4); se utilizó una caja térmica de poliuretano monitoreada para transportar el semen recolectado a 25 °C. Las muestras se lavaron por centrifugación a $2800 \times g$ durante 5 min y se suspendieron de nuevo en PBS a una concentración de 30×10^6 células mL^{-1} , las cuales se alicuotaron en tubos de microcentrífuga y se utilizaron de inmediato en las pruebas de extracción de ADN o congeladas rápidamente y almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

Tratamiento previo de muestra

La concentración de espermatozoides utilizada en cada prueba fue 2.5×10^6 células mL^{-1} . El primer paso de tratamiento previo era común en los seis métodos, es decir, alícuotas de 500 μL de semen a una concentración de 2.5×10^6 células mL^{-1} se lavaron tres veces en PBS a $2\ 800 \times g$ durante 3 min cada una. Luego, el pellet de células espermáticas se trató con los diferentes amortiguadores de acuerdo a cada método.

Métodos de aislamiento de ADN

El estudio consistió en la optimización de una técnica de aislamiento de ADN con cinco modificaciones a una técnica generalizada para células somáticas, que se adaptó para su aplicación con espermatozoides de toro. Todos los métodos se enumeran en el Cuadro 1.

Table 1. Characterization of the method variants used to isolate bull sperm DNA.

Cuadro 1. Caracterización de las variantes del método usado para aislar ADN de los espermatozoides de toro.

Method	Membrane removal Treatment	Lysis Solution	De-condensating solution	DNA purification and precipitation
1	Original	Proteinase K	-	Phenol-chloroform Sodium acetate ethanol
2	-	Papain, DTT [§] , DMSO [¶] , CTAB, SDS	-	Cold acetone ethanol
3	Brij 36-T	Papain, DTT, DMSO, CTAB, SDS	-	Cold acetone ethanol
4	Brij 36-T	Papain, DTT, DMSO, CTAB	SDS, DTT, heparin	Cold acetone ethanol
5	SDS [†]	Papain, DTT, DMSO	SDS, DTT, heparin	Cold acetone ethanol
6	CTAB [‡]	Papain, DTT, DMSO	SDS, DTT, heparin	Cold acetone ethanol

[†]Sodium dodecyl sulfate; [‡]Cetyltrimethyl ammonium bromide; [§]Dithiothreitol; [¶]Dimethyl sulfoxide. ♦ [†]Dodecyl sulfato de sodio; [‡]Bromuro de cetiltrimetil amonio; [§]Ditiotreitolo; [¶]Dimetil sulfóxido.

The supernatant was transferred to another tube, 500 μL^{-1} phenol-chloroform was added, passed through vortex for 30 min and centrifugation at 10 400 x g for 10 min; the bottom phase was discarded by aspiration and this step was repeated twice. The supernatant was transferred to a new tube, and then 500 μL^{-1} 50 mM Tris-HCl pH 8.9 was added. The mixture was vortexed and centrifuged again, and the supernatant was transferred to another tube.

Two volumes of cold 70% ethanol were added, the tube was shaken gently, then 50 μL^{-1} 3 M sodium acetate pH 5 was added, and incubated at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. Each sample was centrifuged at 8 000 x g for 10 min at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the supernatant was removed and pellet was added with two volumes (1 mL^{-1}) of cold 70% ethanol, the tube was shaking gently, and the alcohol was eliminated by aspiration. Each DNA pellet was dried, resuspended with 50 μL^{-1} distilled water, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Method 2

As the spermatid structures differ from the somatic cells, in order to increase DNA recovery and purity modifications were introduced to the lysis buffer, and CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) and SDS (Sodium dodecyl sulfate) were used instead of phenol and chloroform (Tan and Yiap, 2009). Those detergents also were selected because they could disrupt the sperm perinuclear theca. The key modifications in the lysis buffer consisted of sample pretreatment with papain to eliminate protein components (Eychner *et al.*, 2015), DDT (Dithiothreitol) for the release of DNA from somatic cells present in semen (Fu *et al.*, 2007), achieving with that a differential extraction, and the DMSO (Dimethyl sulfoxide), was introduced to protect de genomic DNA (Valadez and Günter, 2005).

Washed semen aliquots were resuspended in 50 μL^{-1} of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.9, plus 30% papain, 1% DTT, and 0.025% DMSO) and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, then were centrifuged at 8 800 x g for 5 min and washed twice with 500 μL^{-1} of 50 mM Tris HCl, pH 8.9. The pellet was resuspended with 50 μL^{-1} 5% CTAB, incubated at room temperature for 5 min, centrifuged at 8 800 x g for 5 min, and washed twice with sterile distilled water. The supernatant was removed and the pellet resuspended with 50 μL^{-1} 50 mM Tris HCl, pH 8.9 and 50 μL^{-1} 10% SDS followed for an incubation at room temperature for 30 min.

Afterwards, sample was centrifuged at 8 800 x g for 5 min, the supernatant discarded and the pellet was washed with distilled water twice. Pellet was resuspended with 50 mM Tris-HCl pH 8.9, 300 μL^{-1} cold acetone was added and tube shaken gently. Each sample was centrifuged at 4 000 x g for 5 min, the pellet was added with 300 μL^{-1} of cold absolute ethanol, tube was

Método 1

El ADN total se extrajo con fenol-cloroformo. Cada pellet se resuspendió en 500 μL^{-1} de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM) y se centrifugó de nuevo. A cada pellet se añadió 500 μL^{-1} de solución de lisis (amortiguador TE suplementado con 1% de proteinasa K) (Di Prieto *et al.*, 2011) y la mezcla se incubó a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, luego se centrifugó 5 min a 8 800 x g y se lavó dos veces con 500 μL^{-1} Tris-HCl 50 mM, pH 8.9. El pellet se resuspendió con 500 μL^{-1} de fenol equilibrado con Tris-HCl, pH 7.8, luego se pasó por el vórtex y se centrifugó a 10 400 x g durante 10 min, la fase inferior se desechó por aspiración y este paso se repitió dos veces más.

El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se añadió 500 μL^{-1} de fenol-cloroformo y luego se pasó por el vórtex durante 30 min y se centrifugó 10 min a 10 400 x g , la fase inferior se descartó por aspiración y este paso se repitió dos veces. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, y se añadió 500 μL^{-1} 50 mM Tris-HCl pH 8.9. La mezcla se vortexeó y centrifugó de nuevo, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo.

Al final, se añadieron dos volúmenes de etanol frío al 70%, el tubo se agitó suavemente, luego se añadió 50 μL^{-1} de acetato de sodio 3 M pH 5, y se incubó 20 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada muestra se centrifugó a 8 000 x g durante 10 min a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se retiró el sobrenadante y el pellet se añadió con dos volúmenes (1 mL^{-1}) de etanol al 70% frío, se agitó suavemente el tubo y se eliminó el alcohol por aspiración. Cada pellet de ADN se secó, se resuspendió con 50 μL^{-1} de agua destilada, y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Método 2

Ya que las estructuras espermáticas difieren de las células somáticas, a fin de aumentar la recuperación y la pureza del ADN, se introdujeron modificaciones en el amortiguador de lisis y el uso de CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) y SDS (dodecil sulfato de sodio), en lugar de fenol y cloroformo (Tan and Yiap, 2009). Esos detergentes también se seleccionaron porque podían alterar la teca perinuclear del esperma. Las principales modificaciones del amortiguador de lisis consistieron en el tratamiento previo de la muestra con papaína para eliminar los componentes proteicos (Eychner *et al.*, 2015), el DDT (Ditiotreitolo) para la liberación del ADN de las células somáticas presentes en el semen (Fu *et al.*, 2007), con ello se logró una extracción diferencial, y se introdujo el DMSO (Dimetil sulfóxido), para proteger el ADN genómico (Valadez y Günter, 2005).

Las alícuotas de semen lavadas se resuspendieron en 50 μL^{-1} de amortiguador de lisis (de Tris-HCl 50 mM con pH 8.9 añadido con 30% de papaína, 1% de DTT y 0.025% de DMSO) y

shaken gently and sample was centrifuged at 8 800 x g for 5 min. Samples were dried, and resuspended as in method 1.

Method 3

The only modification to the protocol 2 was the addition the Brij 36-T to solubilize the plasma membrane and to expose the PT (Felipe-Pérez *et al.*, 2012). Thus, before lysis solution, semen samples were incubated with 50 μL^{-1} of 10% Brij 36-T for 10 min at room temperature, then centrifuged at 2 800 x g for 5 min and the pellet was processed as in method 2.

Method 4

To allow chromatin de-compaction, a de-condensing solution employing SDS, DTT and heparin (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011) was introduced to method 3; hence SDS was removed from the lysis solution. The solution was used after lysis solution where the pellet obtained from the cellular lysis was resuspended with 50 μL^{-1} 10% SDS, 50 μL^{-1} 180 mM DTT, 1U mL^{-1} heparin and incubated 30 min at room temperature. Thereafter, sample was centrifuged 5 min at 8 800 x g, the supernatant discarded, and the pellet was washed with 50 mM Tris-HCl pH 8.9 twice; afterwards, this method continues as in method 3.

Method 5

In order to reduce the cost and time of the process, the modifications to the protocol 4 were the replacement of Brij 36-T by SDS (Ward, 2018), and the removal of the CTAB of the lysis solution. Washed semen aliquots were resuspended in 50 μL^{-1} 20% SDS and incubated at room temperature for 10 min; then samples were centrifuged at 2 800 x g for 5 min and the pellet was processed as in Method 4.

Method 6

CTAB serves as an important surfactant in the DNA isolation buffer system to remove membrane lipids and promote cell lysis, and because it maintains the integrity of precipitated DNA during isolation (Prabha *et al.*, 2013). Accordingly, before the treatment with the lysis solution, method 5 was modified in order to use 10% CTAB instead of SDS, to expose the perinuclear theca. All the other steps were performed according to the steps of method 5.

Concentration and purity of DNA

After genomic DNA isolation, the purity and concentration of genomic DNA isolated by the six isolation protocols were

se incubaron a 37 °C durante 30 min, luego se centrifugaron 5 min a 8 800 x g y se lavaron dos veces con 500 μL^{-1} de Tris-HCl 50 mM, pH 8.9. El pellet se resuspendió con 50 μL^{-1} de CTAB al 5%, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, luego se centrifugó 5 min a 8 800 x g y se lavó dos veces con agua destilada estéril. El sobrenadante se removió y el pellet resuspendido con 50 μL^{-1} Tris HCl 50 mM, pH 8.9 y 50 μL^{-1} de SDS al 10% seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 30 min.

Después, la muestra se centrifugó 5 min a 8 800 x g, el sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con agua destilada dos veces. El pellet se resuspendió con Tris-HCl 50 mM, pH 8.9 y se añadió 300 μL^{-1} de acetona fría, el tubo se agitó suavemente. Cada muestra se centrifugó a 4 000 x g durante 5 min, se añadieron 300 μL^{-1} de etanol absoluto frío al pellet, el tubo se agitó suavemente y la muestra se centrifugó 5 min a 8 800 x g. Las muestras se secaron y se resuspendieron como en el método 1.

Método 3

La única modificación al protocolo 2 fue la adición del Brij 36-T para solubilizar la membrana de plasma y exponer la PT (Felipe-Pérez *et al.*, 2012). Así, antes de la solución de lisis, las muestras de semen se incubaron con 50 μL^{-1} de Brij 36-T al 10% durante 10 min a temperatura ambiente, luego se centrifugaron 5 min a 2 800 x g y el pellet se procesó como en el método 2.

Método 4

Para permitir la descompactación de la cromatina, se introdujo en el método 3 una solución de descondensación empleando SDS, DTT y heparina (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011), por lo que se eliminó el SDS de la solución de lisis. La solución se utilizó después de la solución de lisis, donde el pellet obtenido de la lisis celular se resuspendió con 50 μL^{-1} de SDS al 10%, 50 μL^{-1} de DTT 180 mM, 1U mL^{-1} de heparina y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Después, la muestra se centrifugó 5 min a 8 800 x g, el sobrenadante se desechó, y el pellet se lavó dos veces con 50 mM Tris-HCl pH 8.9, y luego este método continúa como en el método 3.

Método 5

Para reducir el costo y el tiempo del proceso, las modificaciones del protocolo 4 fueron la sustitución de Brij 36-T por SDS (Ward, 2018) y la eliminación del CTAB de la solución de lisis. Las alícuotas de semen lavadas se resuspendieron en 50 μL^{-1} de SDS al 20% y se incubaron 10 min a temperatura ambiente; luego las muestras se centrifugaron 5 min a 2 800 x g y el pellet se procesó como en el método 4.

measured using a NanoDrop® ND-1000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™). Protein contamination was measured by the A_{260}/A_{280} nm absorbance ratio, whereas A_{260}/A_{230} nm was used to determine contamination by reagents. Both spectrophotometric measurements constituted criteria for DNA quality assessment with higher values associated with better DNA purity. DNA absorbance was measured at 260 nm to determine de quantity of DNA.

A minimum concentration of 5 ng μL^{-1} DNA in each sample is recommended, since lower than this makes it difficult to standardize PCR or other techniques. Besides, an absorbance ratio at 260 nm and 280 nm of 1.8 is accepted as pure DNA, where proportions lower than this value indicate the presence of proteins, whereas the accepted values of the 260/230 ratio are in the range of 2.0 to 2.2; if the ratio is less, they indicate the presence of contaminants such as carbohydrates or phenol (Demeke and Jenkins, 2010; Viltrop *et al.*, 2010). Therefore, for the evaluations of the six isolation methods, only the DNA samples with the parameters of a minimum concentration of 50 ng μL^{-1} DNA, purity 260/280 minimum of 1.7, and 260/230 minimum of 1.5 were used.

Based on the fact that protocols 2-6 were modified for the isolation of genomic DNA from bull sperm, it was decided to increase the number of replicates for each of these methods to 55, while for method 6, being the one that obtained the best parameters mentioned above, the number of replicates was 100.

DNA visualization on agarose gel

The presence and quality of the DNA samples selected from the six isolation methods were analyzed on 0.8% agarose gel containing 5% ethidium bromide. The gel wells were loaded with 3 μL^{-1} of the DNA solutions plus 3 μL^{-1} of buffer and submitted to electrophoresis on the agarose gel. The gels were then visualized under an UV trans-illuminator (Bio-Rad, UV trans-illuminator 2000), and the images were captured with a Nikon Coolpix B500 camera.

DNA amplification

The DNA isolated from bull sperm by method 5 was used to standardize PCR optimal amplification conditions for β -actin gene (*ACTB* gen). Genomic DNA was amplified by end-point PCR using specific primers for the β -actin gene, designed previously, with the software Oligo® v. 6.8 (Molecular Biology Insight, Inc., Colorado Springs, CO), and whose product is approximately 157 pb. The sequences were the following: forward 5'- CCC ATT GAG CAC GGC ATC GTC 3' and reverse 5'- TCT GGG TCA TCT TCT CAC GGT TGG C 3'.

Método 6

El CTAB sirve como un importante surfactante en el sistema tampón de aislamiento del ADN para eliminar los lípidos de membrana y promover la lisis celular, y porque mantiene la integridad del ADN precipitado durante el aislamiento (Prabha *et al.*, 2013). Por consiguiente, antes del tratamiento con la solución de lisis, el método 5 se modificó para utilizar CTAB al 10% en lugar de SDS para exponer la teca perinuclear. Todos los demás pasos se realizaron según los pasos del método 5.

Concentración y pureza del ADN

Tras el aislamiento del ADN genómico, la pureza y la concentración del ADN genómico aislado por los seis protocolos de aislamiento se midió con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000c (Thermo Fisher Scientific™). La contaminación de las proteínas se midió mediante la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} nm, mientras que la A_{260}/A_{230} nm se utilizó para determinar la contaminación por reactivos. Ambas mediciones espectrofotométricas constituyeron criterios para la evaluación de la calidad del ADN con valores más altos asociados a una mejor pureza del ADN. La absorbancia del ADN se midió a 260 nm para determinar la cantidad de ADN.

Una concentración mínima de 5 ng de ADN μL^{-1} en cada muestra se recomienda, ya que una concentración inferior dificulta la estandarización de la PCR u otras técnicas. Además, se acepta como ADN puro una relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm de 1.8, en la que proporciones inferiores a este valor indican la presencia de proteínas; mientras que los valores aceptados de la relación 260/230 están en el rango de 2.0 a 2.2, y si la relación es menor, indican la presencia de contaminantes como los carbohidratos o el fenol (Demeke y Jenkins, 2010; Viltrop *et al.*, 2010). Por lo tanto, para las siguientes evaluaciones de los seis métodos de aislamiento, sólo se utilizaron las muestras de ADN con los parámetros de una concentración mínima de 50 ng μL^{-1} de ADN, pureza de 260/280 mínimo de 1.7, y 260/230 mínimo de 1.5.

Con base en el hecho de que se modificaron los protocolos 2-6 para el aislamiento del ADN genómico de los espermatozoides de toro, se decidió aumentar el número de réplicas para cada uno de estos métodos a 55, mientras que para el método 6, con el cual se obtuvo los mejores parámetros ya mencionados, el número de réplicas fue 100.

Visualización de ADN en gel de agarosa

La presencia y la calidad de las muestras de ADN seleccionadas de los seis métodos de aislamiento se analizaron en un gel

The primer control included with the Taq DNA polymerase Titanium kit was used as the positive control for all the reactions (forward 5'-CTTGTCTTAATCTTCCTCCTCAG GCA-3' and reverse 5'-TGGCACGGCCATAAGAGGTAGATGTCA-3').

In order to determine the optimal alignment temperature for the β -actin genes, a temperature gradient was performed in which five alignment temperatures of the primers were tested (55, 58, 61, 65, and 68 °C); the optimal proportion of the primers were carried out using different proportions of each primer (forward and reverse). The PCR reaction mix contained 1 U Titanium Taq DNA polymerase, 1x PCR buffer, 0.1 nM dNTP, primers (forward and reverse) at different proportions, five DNA concentrations (200, 100, 50, 25 or 12.3 ng), and sterile ultrapure water to a final volume of 25 μ L⁻¹. Amplification was performed using a thermocycler (Applied Biosystem, 2730 Thermal Cycler) and a PCR program consisting of denaturation at 94 °C for 5 min; 30 cycles of amplification involving denaturation at 94 °C for 30 s; annealing at 55, 58, 61, 65 or 68 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s; and a final extension for 5 min at 72 °C. The success of the PCR with different DNA concentrations from the isolation protocol selected was determined by electrophoresis on 0.8% agarose gel; amplified sperm DNA was visualized under an UV transilluminator after electrophoresis, and the images were captured with a Nikon Coolpix B500 camera.

Once the amplification conditions for the *ACTB* gene were standardized, PCR reactions were performed using each of the samples obtained by the best DNA isolation method. The PCR reaction mixes contained 1x PCR buffer, 0.33 mM dNTP, 0.33 μ M each primer (forward and reverse), 0.33x Titanium Taq DNA polymerase, 3 ng DNA, and sterile ultrapure water to a final volume of 25 μ L⁻¹. Amplification was performed using a PCR program consisting of denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of amplification involving denaturation at 94 °C for 30 s; annealing at 68 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s; and final extension for 5 min at 72 °C. The success of the PCR was determined by electrophoresis on 1.2% agarose gel; amplified sperm DNA was visualized under an UV transilluminator after electrophoresis, and the images were captured with a Nikon Coolpix B500 camera.

Evaluation of DNA isolation efficiency

The method that obtained the highest concentration and the best quality DNA samples was evaluated for efficiency by determining the minimum quantity of sperm required to obtain adequate quantities of DNA (minimum 50 ng μ L⁻¹). One of the frozen sperm control samples was selected at random. The isolation assays were conducted using different concentrations of sperm cells per DNA isolation (0.5, 1, 2.5 and 5 x10⁶ total spermatozoa). The DNA isolated was stored at -20 °C for later quantification and quality evaluation.

de agarosa al 0.8% que contenía 5% de bromuro de etidio. Los pozos del gel se cargaron con 3 μ L⁻¹ de las soluciones de ADN más 3 μ L⁻¹ de amortiguador y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Después, los geles se visualizaron bajo un transiluminador UV (Bio-Rad, UV trans-iluminador 2000), y las imágenes se capturaron con una cámara Nikon Coolpix B500.

Amplificación del ADN

El ADN aislado de espermatozoides de toro por el método 5 se utilizó para estandarizar las condiciones óptimas de amplificación de la PCR para el gen β -actin (gen *ACTB*). El ADN genómico se amplificó por PCR punto final utilizando cebadores específicos para el gen β -actin, diseñado previamente, con el software Oligo® v. 6.8 (Molecular Biology Insight, Inc., Colorado Springs, CO), y cuyo producto es aproximadamente 157 pb. Las secuencias eran las siguientes: Forward 5'- CCC ATT GAG CAC GGC ATC GTC 3' y Reverse 5'- TCT GGG TCA TCT CAC GGT TGG C 3'.

Como testigo positivo de todas las reacciones se usó el primer testigo incluido en el kit de la Titanium Taq ADN polimerasa (Forward 5'-CTTGTCTTAATCTTCCTCCTCAGCA-3' y Reverse 5'-TGGCACGGCCATAAGGTAGATGTCA-3').

Para determinar la temperatura óptima de alineación de los genes β -actin, se realizó un gradiente de temperatura en el que se probaron cinco temperaturas de alineación de los cebadores (55, 58, 61, 65 y 68 °C); la proporción óptima de los cebadores se realizó usando diferentes proporciones de cada cebador (Forward y Reverse). La mezcla de reacción de la PCR contenía 1 U de Titanium Taq ADN polimerasa, 1x amortiguador de PCR, 0.1 nM de dNTP, cebadores (Forward y Reverse) en diferentes proporciones, cinco concentraciones de ADN (200, 100, 50, 25 o 12,3 ng) y agua ultrapura estéril hasta un volumen final de 25 μ L⁻¹. La amplificación se realizó utilizando un termociclador (Applied Biosystem, 2730 Thermal Cycler) y un programa de PCR que consistió en la desnaturalización a 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94 °C durante 30 s; alineamiento a 55, 58, 61, 65 o 68 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 30 s; y una extensión final durante 5 min a 72 °C. El éxito de la PCR con diferentes concentraciones de ADN del protocolo de aislamiento seleccionado se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%; el ADN del esperma amplificado se visualizó bajo un transiluminador UV después de la electroforesis, y las imágenes se capturaron con una cámara Nikon Coolpix B500.

Una vez que se estandarizaron las condiciones de amplificación del gen *ACTB*, se realizaron reacciones de PCR usando cada una de las muestras obtenidas por el mejor método de aislamiento de ADN. Las mezclas de reacción de PCR contenían 1x de amortiguador de PCR, 0.33 mM de dNTP, 0.33 μ M de cada cebador (Forward y Reverse), 0.33x de Titanium Taq ADN

Experimental design

As explained above, six isolation methods were applied to a series of replicates obtained from five ejaculates samples, collected from two different bulls, and used at random in the protocols. Each replicate within a given isolation protocol was considered an experimental unit and at least 25 replicates were prepared for each one of the six tested methods. Thereafter, based on the results of the statistical analysis of DNA concentration and purity, only the best of the protocols was selected in order to assess integrity, presence of PCR inhibitors, and large-scale applicability for long-term storage; replicates were a hundred to assess integrity of the method.

Statistical analysis

A graphical representation of the variables showed that they did not satisfy the normality assumptions and data neither satisfied the conditions to apply an ANOVA. Therefore, a Kruskal-Wallis test was applied to determine if there were differences between the six methods of isolation (Table 1). The response variables were DNA concentration (ng mL^{-1}) and DNA purity (260/280 and 260/230). To correct the p-value, the Dunn test was applied. The results are reported as means \pm SD. The effect of the animal for the analysis was disregarded.

The hypothesis to be tested was: H_0 : All samples come from the same population; H_1 : At least one sample comes from a population with a different distribution. An error probability of $\alpha=0.05$ was used as the level of significance to reject H_0 .

The following model was used to evaluate the six different DNA isolation methods:

$$K = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1)$$

where: R_j^2 : is the total of the j th sample ranching; n_j : is the sample size; k : is the number of samples; N : is the sample size given by: $\sum_{j=1}^k n_j$

The statistic value of the test distributed approximately as a χ^2 with $k-1$ degrees of freedom.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA isolation methods, concentration and purity of DNA

The purpose of DNA isolation techniques is to obtain high concentrations of the nucleic acid with the minimum of degradation and with a degree of

polimerasa, 3 ng de ADN y agua ultrapura estéril hasta un volumen final de $25 \mu\text{L}^{-1}$. La amplificación se realizó mediante un programa de PCR que consistió en la desnaturalización a 94°C durante 5 min; 35 ciclos de amplificación que implicaron la desnaturalización a 94°C durante 30 s; el alineamiento a 68°C durante 30 s, y la extensión a 72°C durante 30 s; y la extensión final durante 5 min a 72°C . El éxito de la PCR se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%; el ADN de los espermatozoides amplificados se visualizó bajo un transiluminador UV después de la electroforesis, y las imágenes se capturaron con una cámara Nikon Coolpix B500.

Evaluación de la eficiencia del aislamiento de ADN

El método que obtuvo las muestras de ADN con la mayor concentración y la mejor calidad se evaluó en eficiencia determinando la cantidad mínima de espermatozoides necesaria para obtener cantidades adecuadas de ADN (mínimo $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Una de las muestras testigo de esperma congelado se seleccionó al azar. Las pruebas de aislamiento se realizaron utilizando diferentes concentraciones de espermatozoides por aislamiento de ADN ($0.5, 1, 2.5$ y 5×10^6 de espermatozoides totales). El ADN aislado se almacenó a -20°C para su posterior cuantificación y evaluación de calidad.

Diseño experimental

Como ya se explicó, se aplicaron seis métodos de aislamiento a una serie de réplicas obtenidas de cinco muestras de eyaculados, recolectadas de dos toros diferentes y utilizadas al azar en los protocolos. Cada réplica dentro de un determinado protocolo de aislamiento se consideró una unidad experimental y se prepararon al menos 25 réplicas para cada uno de los seis métodos ensayados. Después, sobre la base de los resultados del análisis estadístico de la concentración y la pureza del ADN, sólo se seleccionó el mejor de los protocolos para evaluar la integridad, la presencia de inhibidores de la PCR y la aplicabilidad a gran escala para el almacenamiento a largo plazo; se hicieron cien réplicas para evaluar la integridad del método.

Análisis estadístico

Una representación gráfica de las variables mostró que no satisfacían los supuestos de normalidad; los datos tampoco satisfacían las condiciones para aplicar una ANOVA. Por lo tanto, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias entre los seis métodos de aislamiento (Cuadro 1). Las variables de respuesta fueron la concentración de ADN (ng L^{-1}) y la pureza del ADN (260/280 y 260/230). Para corregir el valor

purity that allow to perform molecular biology tests (Silva *et al.*, 2019). When the purity values are in a range of 1.7 to 2.0, the DNA obtained is free of cellular contaminants. Values below 1.7 indicate contamination with proteins, membrane or phenol fractions and values above 2 means that there is dispersed RNA (Demeke and Jenkins, 2010). Many of the methods used for sperm were adapted from standardized protocols for somatic cells or commercial kits; however, special extraction methods are required for sperm (Xavier *et al.*, 2018).

Quantity and purity of the DNA obtained by each of the six isolation methods showed particular trends (Table 2). The spectrometric assay demonstrated that the highest concentrations of DNA were obtained with methods 5, 6, 4, and 3 (in descending order), in which a detergent was used (CTAB in method 6, SDS in method 5 and Brij in method 3 and 4 before the lysis solution).

This variety of detergents are used to remove the membrane of spermatozoa in mammalian sperm; both plasmatic and nuclear membrane and the acrosome, leaving the perinuclear theca (PT) surface exposed (Ferrer *et al.*, 2012). The PT is a detergent resistant capsule that surrounds the mature sperm nucleus as a helmet, which among other functions, offers stability to the nucleus and may be involved in stabilizing the chromatin of sperm (Oko and Sutovsky, 2009; Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011); as a consequence, the treatment with a detergent allowed that the lysis solution (papain proteinase) to act directly on the PT proteins (Katamaya *et al.*, 2005).

p, se aplicó la prueba de Dunn. Los resultados se reportan como media \pm SD. No se tuvo en cuenta el efecto del animal para el análisis.

La hipótesis a probar fue: H_0 : Todas las muestras proceden de la misma población; H_1 : Al menos una muestra procede de una población con una distribución diferente. Una probabilidad de error de $\alpha=0.05$ se utilizó como nivel de significación para rechazar H_0 .

El siguiente modelo se utilizó para evaluar los seis diferentes métodos de aislamiento de ADN:

$$K = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R^2}{n_j} - 3(n+1)$$

donde: R^2 : es el total del ranqueo de la j -ésima muestra; n_j : es el tamaño de la muestra; k : es el número de muestras; N : es el tamaño de la muestra dado por: $\sum_{j=1}^k n_j$

El estadístico de prueba se distribuyó aproximadamente como una χ^2 con $k-1$ grados de libertad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Métodos de aislamiento del ADN, concentración y pureza del ADN

La finalidad de las técnicas de aislamiento del ADN es obtener altas concentraciones de ácido nucleico con un mínimo de degradación y con un grado de pureza que permita realizar pruebas de biología molecular (Silva *et al.*, 2019). Cuando los valores de pureza se encuentran en un rango de 1.7 a 2.0, el ADN obtenido está libre de contaminantes celulares.

Table 2. Comparison of the six genomic methods to isolate bull sperm DNA using concentration, purity (260/280 nm y 260/230 nm) and efficiency (time) by spectrophotometry.

Cuadro 2. Comparación de los seis métodos genómicos para aislar el ADN de espermatozoides de toro mediante concentración, pureza (260/280 nm y 260/230 nm) y eficiencia (tiempo) por espectrofotometría.

Method	Isolations (n)	DNA concentration (ng μ L ⁻¹)	DNA purity (260/280)	DNA purity (260/230)	Time
1	25	62.1 \pm 34.9 a	1.32 \pm 0.2 a	1.71 \pm 0.2 a	2 d
2	55	104.6 \pm 46.6 ab	1.39 \pm 0.3 a	1.32 \pm 0.1 b	95 min
3	55	118.9 \pm 42.6 b	1.45 \pm 0.2 a	1.35 \pm 0.1 b	70 min
4	55	135.6 \pm 72.4 b	1.59 \pm 0.3 b	1.28 \pm 0.4 b	70 min
5	55	305.3 \pm 190.2 c	1.33 \pm 0.3 a	0.68 \pm 0.3 c	80 min
6	100	152.3 \pm 67.6 b	1.75 \pm 0.07 c	1.65 \pm 0.1 ab	80 min

a-c: Means with different letters in a row indicate statistical difference ($p \leq 0.05$). ♦ Las medias con letras diferentes en una hilera indican la diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

Likewise, the use of DTT and heparin allowed recovery of a larger quantity of better-quality DNA. DTT, a S-S links reducing agent, acts on the bisulfate bridges and heparin, a reagent that competes with the DNA at binding to protamines, the reagent adheres to these proteins, which are sequestered and eliminated by washing without contaminating the DNA samples (Felipe-Pérez *et al.*, 2012); and the use of a second detergent (SDS) could allow denaturation of the captured protamines and any other lipid or protein contaminant present in the medium, thus, the DNA (Mariyam and Preetha, 2020). The effectiveness of CTAB was evaluated in other studies; thus, Lander *et al.* (2002) indicated that the detergent bonds strongly to the DNA, displaces the proteins, and prevents its degradation.

In our study, the quantity of DNA isolated from sperm samples was higher for the protocol 5, but the yields for the methods 3, 4, and 6 were greater than for the original (method 1). Nevertheless, method 6 was the only method that provided purity values adequate, near the standard value ($260/280: 1.75 \pm 0.07$) for PCR assays, which indicates that the obtained material is free of contaminants that could interfere with the reactions (Alarcón-Zúñiga *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019). In this regard, DNA is considered to be pure when the A_{260} / A_{230} ratio is around 1.5-2.2. A ratio less than 1.5 could indicate the presence of contaminants in the sample such as salts, carbohydrates or others. However, it must be considered that this measurement may be misleading by a low concentration of DNA in the sample, since the concentration of salts present in the resuspension buffer would be overestimated (Viltrop *et al.*, 2010).

Now it is known that DNA quantification using fluorometers is more accurate; therefore, measurements with fluorescent dyes such as Pico Green, which binds to dsDNA and increases the fluorescent signal, and extrapolation via a standard curve is recommended (Schablitsky *et al.*, 2019). Based on our results, method 6 was tested with sperm samples from fresh ejaculates to verify its effectiveness for the treatment of the spermatid cells. Purity (A_{260} / A_{280} and A_{260} / A_{230}) remained constant, but yield was lower than for extraction from thawed semen (Table 3). This statistically significant difference is attributed to the fact that the frozen spermatozoa undergo damages and alterations in their structure, as shown by Gutiérrez-Pérez *et al.* (2011) and Felipe-Pérez *et al.* (2012).

Los valores inferiores a 1.7 indican contaminación con proteínas, fracciones de membrana o fenol y los valores superiores a 2 significan que hay ARN disperso (Demeke y Jenkins, 2010). Muchos de los métodos utilizados para el esperma se adaptaron a partir de protocolos estandarizados para células somáticas o kits comerciales; sin embargo, se requieren métodos de extracción especiales para el esperma (Xavier *et al.*, 2018).

La cantidad y la pureza del ADN obtenido por cada uno de los seis métodos de aislamiento mostraron tendencias particulares (Cuadro 2). La prueba espectrométrica demostró que las mayores concentraciones de ADN se obtuvieron con los métodos 5, 6, 4 y 3 (en orden descendente), en los que se utilizó un detergente (CTAB en el método 6, SDS en el método 5 y Brij en los métodos 3 y 4 antes de la solución de lisis).

Esta variedad de detergentes se utiliza para eliminar la membrana de los espermatozoides en los espermatozoides de mamíferos; tanto la membrana plasmática como la nuclear y el acrosoma, dejando expuesta la superficie de la teca perinuclear (PT) (Ferrer *et al.*, 2012). La PT es una cápsula resistente a los detergentes que rodea el núcleo del espermatozoide maduro a modo de casco, que entre otras funciones ofrece estabilidad al núcleo y puede estar involucrada en la estabilización de la cromatina del espermatozoide (Oko y Sutovsky, 2009; Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011); en consecuencia, el tratamiento con un detergente permitió que la solución de lisis (proteínasa papaína) actuara directamente sobre las proteínas de la PT (Katamaya *et al.*, 2005).

Asimismo, el uso de DTT y heparina permitió la recuperación de una mayor cantidad de ADN de mejor calidad. El DTT, un agente reductor de enlaces S-S, actúa sobre los puentes de bisulfuro y la heparina, un reactivo que compite con el ADN al unirse a las protaminas, el reactivo se adhiere a estas proteínas, que son secuestradas y eliminadas por lavado sin contaminar las muestras de ADN (Felipe-Pérez *et al.*, 2012); y el uso de un segundo detergente (SDS) podría permitir la desnaturalización de las protaminas capturadas y de cualquier otro contaminante lipídico o proteínico presente en el medio, así el ADN se purifica (Mariyam y Preetha, 2020). La eficacia del CTAB se evaluó en diversos estudios; thus, Lander *et al.*, (2002) indicaron que el detergente se adhiere fuertemente al ADN, desplaza las proteínas e impide su degradación.

Table 3. Concentration and quality of DNA isolated from freshly ejaculated bull sperm compared with that extracted from frozen sperm.
Cuadro 3. Concentración y calidad del ADN aislado de espermatozoides de toro recién eyaculados comparado con el ADN extraído de espermatozoides congelados.

Sample	Isolations	Concentration DNA (ng μ L ⁻¹)	DNA purity (260/280)	DNA purity (260/230)
Thawed Semen	100	152.4 \pm 67.6 a	1.75 \pm 0.07 a	1.65 \pm 0.13 a
Fresh Semen	55	62.3 \pm 35.7 b	1.73 \pm 0.05 a	1.62 \pm 0.17 a

a,b: Means with different letters in a row are statistically different ($p \leq 0.05$). ♦ Las medias con letras diferentes en una hilera indican una diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

Silva *et al.* (2019), in order to increase the DNA yield, changed the final step of the Qiagen QiaAmp manufacturer protocol by increasing the time of elution from 5 min in room temperature to 24 h in freezer (1.38 *vs.* 3.46 ng μ L⁻¹), which possibly made this type of cells more sensitive to the treatment with detergents and solutions for the extraction of the genetic material. However, in our study the yield obtained from fresh sperm was of good quality and it is considered that the technique can be used to extract DNA from this type of samples without making modifications. If higher DNA concentrations were required, the recommendation would be to work with a larger amount of sperm or dilute the extracted genetic material in a smaller amount of buffer.

DNA visualization on agarose gel

DNA was observed in 0.8% agarose gel in all the samples extracted with the protocol 6 (Figure 1). The quality of bands obtained indicates that the DNA is not fragmented, which shows that the method 6 allows to obtain complete DNA, and therefore it is suitable for use in molecular biology tests, such as PCR (Silva *et al.*, 2019).

DNA amplification

Results showed that the best amplification was at 68 °C, and when the primer mixture was composed of a 1:1 ratio of each (forward and reverse). Thus, with these standardized amplification conditions the DNA samples isolated with method 6 were evaluated to determine the presence of inhibiting substances by means of PCR reactions using the *b-actin* gene. The 154-bp fragment of the β -*actin* gene was amplified

En este estudio, la cantidad de ADN aislado de muestras de esperma fue mayor para el protocolo 5, pero los rendimientos de los métodos 3, 4 y 6 fueron mayores que los del original (método 1). No obstante, el método 6 fue el único que proporcionó valores de pureza adecuados, cercanos al valor estándar (260/280: 1,75 \pm 0,07) para las pruebas de PCR, y esto indica que el material obtenido está libre de contaminantes que podrían interferir en las reacciones (Alarcón-Zúñiga *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019). Al respecto, se considera que el ADN es puro cuando la relación A260 / 230 es alrededor de 1.5-2.2. Una relación inferior a 1.5 podría ser indicativa de la presencia de contaminantes en la muestra, como sales, carbohidratos u otros. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta medición puede ser engañosa por una baja concentración de ADN en la muestra, ya que la concentración de sales presentes en el amortiguador de resuspensión estaría sobreestimada (Viltrop *et al.*, 2010).

Ahora se sabe que la cuantificación del ADN mediante fluorómetros es más precisa, por lo que se recomiendan las mediciones con colorantes fluorescentes como el Pico Green, que se une al ADNds y aumenta la señal fluorescente, y se recomienda la extrapolación mediante una curva estándar (Schablitsky *et al.*, 2019). Con base en los resultados, el método 6 se probó con muestras de esperma de eyaculados frescos para verificar su eficacia para el tratamiento de las células espermáticas. La pureza (A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}) permaneció constante, pero el rendimiento fue menor que el de la extracción de semen descongelado (Cuadro 3). Esta diferencia estadísticamente significativa se atribuye a que los espermatozoides congelados sufren daños y alteraciones en su estructura, como lo demuestran Gutiérrez-Pérez *et al.* (2011) y Felipe-Pérez *et al.* (2012).

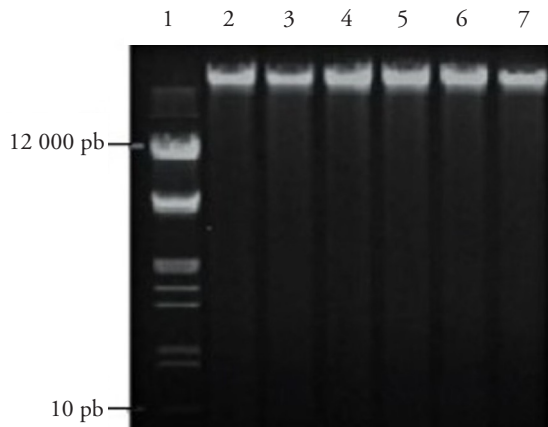


Figure 1. Representative results of 0.8% agarose gel electrophoresis of genomic DNA samples from frozen samples of bull sperm extracted by method 6 ($3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Lane 1 corresponds to the molecular weight marker. Lanes 2 to 7 correspond to randomly selected DNA samples.

Figura 1. Resultados representativos de la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las muestras de ADN genómico de muestras congeladas de espermatozoos de toro extraídas por el método 6 ($3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2 a 7 corresponden a las muestras de ADN seleccionadas al azar.

from the DNA samples isolated with this method (Figure 2), and indicated that this method obtains DNA free of PCR-inhibiting substances. There are reports which show that DNA contamination and its degradation influence the results of PCR assays mainly causing large fluctuations in the analytical measurements and the repeatability of the results.

Con el fin de aumentar el rendimiento de ADN, Silva *et al.* (2019) cambiaron el último paso del protocolo de fabricación de Qiagen QiaAmp al pasar el tiempo de elución de 5 min a temperatura ambiente a 24 h en el congelador ($1.38 \text{ vs } 3.46 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); lo que posiblemente hizo que este tipo de células fueran más sensibles al tratamiento con detergentes y soluciones para la extracción del material genético. Sin embargo, en nuestro estudio el rendimiento obtenido de los espermatozoides frescos fue de buena calidad y se considera que la técnica se puede utilizar para extraer ADN de este tipo de muestras sin necesidad de hacer modificaciones. Si se requiriesen mayores concentraciones de ADN, la recomendación sería trabajar con una mayor cantidad de espermatozoides o diluir el material genético extraído en una menor cantidad de amortiguador.

Visualización de ADN en gel de agarosa

ADN se observó en el gel de agarosa al 0.8% en todas las muestras extraídas con el protocolo 6 (Figura 1). La calidad de las bandas formadas indica que el ADN no está fragmentado, lo cual demuestra que el método 6 permite obtener un ADN completo, y por lo tanto es adecuado para su uso en pruebas de biología molecular, como la PCR (Silva *et al.*, 2019).

Amplificación de ADN

Los resultados mostraron que la mejor amplificación era a los $68 \text{ }^\circ\text{C}$, y cuando la mezcla del cebador



Figure 2. PCR products obtained by 1.2% agarose gel electrophoresis, amplified using of *b-actin* primers, and DNA isolated from frozen semen sample with method 6. Lane 1 corresponds to the molecular weight marker. Lanes 2-13 correspond to the products of amplification of the *β -actin* gene using 13 different DNA samples. Lane 14 corresponds to the amplification of the control gene contained in the amplification kit.

Figura 2. Productos de PCR obtenidos por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, amplificados con cebadores de *b-actin*, y ADN aislado de una muestra de semen congelado con el método 6. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2-13 corresponden a los productos de la amplificación del gen *β -actin* utilizando 13 muestras diferentes de ADN. El carril 14 corresponde a la amplificación del gen testigo contenido en el kit de amplificación.

Therefore, the standardization of the optimal amplification conditions is prevented (Xavier *et al.*, 2018). Demeke and Jenkins (2010) showed that when CTAB is used, low A_{260}/A_{230} ratios are obtained, assuming contamination with cell components, such as polysaccharides that can inhibit PCR reactions. However, in our study, A_{260}/A_{230} quality (1.65 ± 0.01) met the minimum values that allow consideration of the isolated DNA samples as suitable for use in PCR assays (Cotton and Fisher, 2015).

Evaluation of DNA isolation efficiency

The average of each four concentrations of sperm (0.5 , 1 , 2.5 and 5×10^6) were used to evaluate isolation efficiency of method 6, and DNA concentration and quality were verified (Table 4). It is worth mentioning that the features of high yield and high purity of DNA extraction procedures do not necessarily go hand-in-hand. For example, Chelex® extraction is a one tube procedure with a high DNA yield (since no volume is lost or removed), but it might have low purity since any contaminants, not bound by the Chelex resin, are not removed from the DNA in solution.

In contrast, methods such as phenol chloroform extraction or use of silica beads result in higher purity samples, since many contaminants are completely removed. However, lower yields likely result since 100% of the available starting DNA cannot be recovered (Cotton and Fisher, 2015). Based on their recommendation, we used at least 1×10^6 sperm cells for DNA isolation. Because of the variables with statistical differences, we could remark that at least two groups among those compared were statistically different.

estaba compuesta por una proporción de 1:1 de cada uno (Forward y Reverse). Así pues, con estas condiciones de amplificación normalizadas se evaluaron las muestras de ADN aisladas con el método 6 para determinar la presencia de sustancias inhibitoras mediante reacciones de PCR utilizando el gen β -actin. El fragmento de 154 pb del gen β -actin se amplificó a partir de las muestras de ADN aisladas con este método (Figura 2), lo cual indica que este método obtiene ADN libre de sustancias inhibitoras de la PCR. Algunos informes indican que la contaminación del ADN y su degradación influyen en los resultados de las pruebas de PCR, causando principalmente grandes fluctuaciones en las mediciones analíticas y en la repetibilidad de los resultados. Por lo tanto, se impide la normalización de las condiciones óptimas de amplificación (Xavier *et al.*, 2018). Demeke y Jenkins (2010) indicaron que cuando se utiliza el CTAB se obtienen bajas proporciones de A_{260}/A_{230} , y se asume que hay contaminación con componentes celulares, como los polisacáridos que pueden inhibir las reacciones de PCR. Sin embargo, en nuestro estudio, la calidad A_{260}/A_{230} (1.65 ± 0.01) cumplía los valores mínimos que permiten considerar las muestras de ADN aisladas como aptas para su uso en pruebas de PCR (Cotton y Fisher, 2015).

Evaluación de la eficiencia del aislamiento del ADN

El promedio de cada cuatro concentraciones de espermatozoides (0.5 , 1 , 2.5 y 5×10^6) se utilizó para evaluar la eficiencia del aislamiento del método 6, y se verificaron la concentración y la calidad del ADN (Tabla 4). Cabe mencionar que las características de

Table 4. Comparison of the concentration and quality of DNA isolated from bovine spermatozoa at different cell concentrations.

Cuadro 4. Comparación de la concentración y calidad del ADN aislado de espermatozoides de bovinos en diferentes concentraciones celulares.

Total sperms x 10^6	ng μ L ⁻¹	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
0.5	37.0a	1.73 a	1.59 a
1.0	76.5b	1.60 a	1.71 a
2.5	134.6c	1.70 a	1.66 a
5.0	233.8d	1.72 a	1.63 a

a-d: Means with different letters indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

♦ Medias con letra diferente indican la diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

Long-term DNA storage

At the end, based on the overall evaluation discussed above, and considering that an efficient DNA conservation depends on storage temperatures, composition of storage buffer, ionic strength, purity of DNA, length of DNA, presence of metal ions, among other factors (Mariyam and Preetha, 2020), we decided to evaluate the stability of the DNA isolated on samples of DNA stored by 1) 0 days, 2) 1 month, 3) 3 months, and 4) 6 months. With those samples we run electrophoresis in 0.8% agarose gel. Results showed that the integrity of the DNA was conserved for at least 6 months (Figure 3). In this study, the isolated sperm DNA was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in PBS.

Also, we decided to verify if the stored DNA not was contaminated with PCR inhibiting substances; therefore, a PCR reaction was performed with the β -actin gene. Electrophoresis of the amplified products showed that during storage the samples remained stable for at least 6 months, suitable for use in PCR reactions after 6 months of storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figure 4).

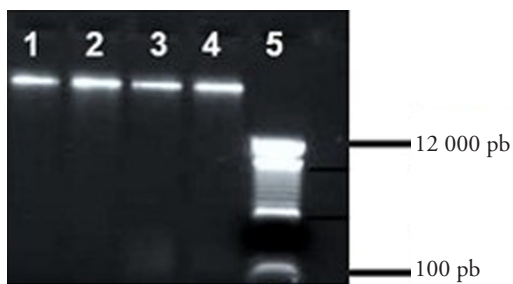


Figure 3. Electrophoresis in 0.8% agarose gel of genomic DNA isolated (3 ng) from bull sperm frozen and stored. Lane 1 corresponds to the not stored sample of DNA; Lane 2 corresponds to a sample stored for 1 month; Lane 3 corresponds to a sample stored for 3 months; Lane 4 corresponds to a sample stored 6 months; and Lane 5 corresponds to the molecular weight markers.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de ADN genómico aislado (3 ng) de esperma de toro congelado y almacenado. El carril 1 corresponde a la muestra de ADN no almacenada; el carril 2 corresponde a una muestra almacenada durante 1 mes; el carril 3 corresponde a una muestra almacenada durante 3 meses; el carril 4 corresponde a una muestra almacenada durante 6 meses; y el carril 5 corresponde a los marcadores de peso molecular.

alto rendimiento y alta pureza de los procedimientos de extracción de ADN no van necesariamente de la mano. Por ejemplo, la extracción de Chelex® es un procedimiento de un tubo que tiene un alto rendimiento de ADN (ya que no se pierde ni se elimina ningún volumen) pero que posiblemente tenga una baja pureza ya que los contaminantes, no ligados por la resina Chelex, no se eliminan del ADN en solución.

En contraste, métodos como la extracción de cloroformo fenol o el uso de perlas de sílice dan como resultado muestras de mayor pureza, ya que muchos contaminantes se eliminan por completo. Sin embargo, es probable que el rendimiento sea menor, ya que no se puede recuperar el 100% del ADN inicial disponible (Cotton y Fisher, 2015). Basándonos en su recomendación, utilizamos al menos 1×10^6 espermatozoides para el aislamiento del ADN. Debido a las variables con diferencia estadística pudimos observar que al menos dos grupos entre los comparados eran estadísticamente diferentes.

Almacenamiento del ADN a largo plazo

Al final, sobre la base de la evaluación general antes mencionada, y al considerar que una conservación eficiente del ADN depende de las temperaturas de almacenamiento, la composición del amortiguador de almacenamiento, la fuerza iónica, la pureza del ADN, la longitud del ADN, la presencia de iones metálicos, entre otros factores (Mariyam y Preetha, 2020), decidimos evaluar la estabilidad del ADN aislado en muestras de ADN almacenadas por 1) 0 días, 2) 1 mes, 3) 3 meses, y 4) 6 meses. Con esas muestras realizamos la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Los resultados mostraron que la integridad del ADN se conservó durante al menos 6 meses (Figura 3). En este estudio, el ADN del esperma aislado se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en PBS.

Además, decidimos verificar si el ADN almacenado no estaba contaminado con sustancias inhibitoras de la PCR; por lo tanto, se realizó una reacción de PCR con el gen β -actin. La electroforesis de los productos amplificados mostró que durante el almacenamiento las muestras se mantuvieron estables durante al menos 6 meses, aptas para ser utilizadas en reacciones de PCR después de 6 meses de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4).

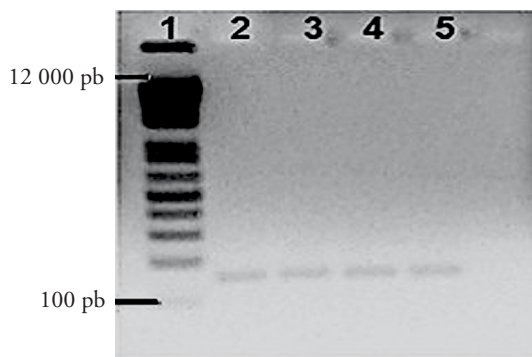


Figure 4. Electrophoresis in 1.2% agarose gel of the amplification products of 4 genomic DNA samples extracted from stored frozen bull sperm. Lane: 1, molecular weight markers; Lane 2, amplification products of the not stored DNA sample; Lane 3, amplification products of a sample stored for 1 month; Lane 4, amplification products of a sample stored for 3 months; Lane 5, amplification products of a sample stored for 6 months.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos de amplificación de 4 muestras genómicas de ADN extraídas de esperma de toro congelado y almacenado. Carril: 1, marcadores de peso molecular; Carril 2, productos de amplificación de la muestra de ADN no almacenada; Carril 3, productos de amplificación de una muestra almacenada durante 1 mes; Carril 4, productos de amplificación de una muestra almacenada durante 3 meses; Carril 5, productos de amplificación de una muestra almacenada durante 6 meses.

Processing time and cost

Processing time for each sample is found in Table 2, and the results showed that protocol six yielded DNA of good quality and quantity in 80 min. The cost of this protocol including only material was \$0.3 USD (\$6.35 MXN) per sample. Therefore, the standardized protocol, in addition to allowing the isolation of bull sperm DNA of optimal quality and concentrations, is also a low-cost method. Usman *et al.* (2014) showed that with the Modified Nucleospin Blood Genomic commercial kit was \$2.76 USD (\$58.43 MXN). per sample, the use of commercial kits increases the cost per extraction almost 10 times. In addition, they are designed for the isolation of somatic cell DNA.

Psifidi *et al.* (2015) used blood samples and eleven methods for genomic DNA isolation and found that in addition to the most common problem when blood or tissue extraction kits are used, the isolation of DNA concentration is less than that required

Tiempo de procesamiento y costo

El tiempo de procesamiento de cada muestra está en el cuadro 2, y los resultados mostraron que el protocolo seis producía ADN de buena calidad y cantidad en 80 min. El costo de este protocolo incluyendo sólo el material fue \$0.3 USD (\$6.35 MXN) por muestra. Por lo tanto, el protocolo estandarizado, además de permitir el aislamiento de ADN de espermatozoides de toro de óptima calidad y concentración, es también un método de bajo costo. Usman *et al.*, (2014) demostraron que con el kit comercial Modified Nucleospin Blood Genomic el costo fue \$2.76 USD (\$58.43 MXN) por muestra; el uso de kits comerciales aumenta el costo por extracción casi 10 veces. Además, están diseñados para el aislamiento del ADN de las células somáticas.

Al utilizar muestras de sangre y once métodos para el aislamiento del ADN genómico, Psifidi *et al.* (2015) mencionaron que además del problema más común cuando se utilizan equipos de extracción de sangre o tejidos, se produce el aislamiento de una concentración de ADN menor que la requerida; y los equipos de extracción son bastante costosos. Además, encontraron una deficiencia en cuanto a la pureza del extracto. Al evitar las columnas de centrifugado prefabricadas, Huynh *et al.* (2019) describieron un protocolo que reduce el costo al utilizar la capacidad de unión de la sílice al ADN en presencia de sales caotrópicas. Sin embargo, no mencionaron el costo por muestra. Además, el costo estimado del procesamiento de una muestra por el método de fenol-cloroformo es alrededor de \$5.00 USD (\$105.84 MXN) por muestra. Las muestras de ADN extraídas son de mayor pureza que otros métodos convencionales, pero de menor pureza que las obtenidas por el método de columnas (Mariyam y Preetha, 2020).

CONCLUSIONES

En este estudio se diseñó, optimizó y probó un método específico, rápido y económico de extracción de ADN de espermatozoides de toro aplicable a muestras más pequeñas a partir de varias combinaciones de detergentes y sustancias descondensantes. Las muestras obtenidas fueron adecuadas para el análisis por PCR.

El protocolo diseñado consideró las características estructurales de los espermatozoides. Así pues, se

and extraction kits are quite expensive; besides, they found a shortcoming regarding the purity of the extract. Huynh *et al.* (2019), avoiding pre-made spin columns, described a protocol that reduces the cost by utilizing the DNA binding capacity of silica in the presence of chaotropic salts; however, they did not record the cost per sample. Besides, the estimated cost for processing a sample by the phenol-chloroform method is around \$5.00 USD (\$105.84 MXN) per sample. Extracted DNA samples are higher in purity than other conventional methods, but lower than those obtained using columns methods (Mariyam and Preetha, 2020).

CONCLUSIONS

In this study, a specific, fast, inexpensive method for extracting DNA from bull sperm applicable for smaller samples was designed, optimized and tested from several combinations of detergents and de-condensing substances. Samples obtained were suitable for PCR analysis.

The designed protocol maintained the structural characteristics of spermatozoa. Thus, our aim was fulfilled in finding a protocol that is inexpensive, quick and efficient to isolate bull sperm DNA. Stored samples up to half a year rendered the same values, pure enough to be used in PCR assays.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos y Proyectos Académicos (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) through the grant PAPIIT IN219717.

LITERATURE CITED

Alarcón-Zúñiga, B., J. L., Zepeda-Batista, A. Ruíz-Flores, L. J. Gómez-Meza, J. G. García-Muñiz, R. Núñez-Domínguez, R. Ramírez-Valverde, and I. Villegas-Velázquez. 2016. Modificación del método de tiocianato de guanidina para extraer ADN de semen para análisis genómico en mamíferos. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 7: 405-413.

Chandler, J. E., T. M. Taylor, A. L. Canal, R. K. Cooper, E. B. Moser, M. E. McCormick, S. T. Willard, H. E. Rycroft, and G. R. Gilbert. 2007. Calving sex ratio as related to the predicted Y-chromosome-bearing spermatozoa ratio in bull ejaculates. *Theriogenesis* 67: 563-71.

Cotton, R. W., and M. B. Fisher. 2015. Review: Properties of sperm and seminal fluid, informed by research on

cumplió nuestro objetivo de encontrar un protocolo económico, rápido y eficaz para aislar el ADN de los espermatozoides del toro. Las muestras almacenadas hasta medio año mostraron los mismos valores, lo suficientemente puros para utilizarse en las pruebas de PCR.

—Fin de la versión en Español—

-----*

reproduction and contraception. *Forensic Sci. Int. Genet.* 18:66-77.

Demeke, T., and G. R. Jenkins. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 1977-1990.

Eychner, A. M., R. J. Lebo, and K. M. Elkins. 2015. Comparison of proteases in DNA extraction via qPCR. *Anal. Biochem.* 478: 128-130.

Felipe-Pérez, Y. E., J. Valencia M., M. L. Juárez-Mosqueda, N. Pescador, A. L. Roa-Espitia, and E. O. Hernández-González. 2012. Cytoskeletal proteins F-actin and β -dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm. *Cryobiology* 64: 103-109.

Ferrer, M., W. Xu, and R. Oko. 2012. The composition, protein genesis and significance of the inner acrosomal membrane of eutherian sperm. *Cell Tissue Res.* 349: 733-74.

Fu, Q., M. Zhang, W. S. Qin, Y. Q. Lu, H. Y. Zheng, B. Meng, S. S. Lu, and K. H. Lu. 2007. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. *Theriogenology* 68: 1211-1218.

Griffin J. 2013. Methods of sperm DNA extraction for genetic and epigenetic studies. *Methods Mol. Biol.* 927: 379-384.

Gutiérrez-Pérez, O., M. L. Juárez-Mosqueda, D. Mota, and M. E. Trujillo. 2011. The disruption in actin-perinuclear theca interactions is related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology* 62: 32-39.

Huynh, O. A., J. Jankowicz-Cieslak, B. Saraye, B. Hofinger, and B. J. Till. 2017. Low-cost methods for DNA extraction and quantification. *In: Jankowicz-Cieslak J. (ed). Biotechnologies for Plant Mutation Breeding.* Chapter 14. International Atomic Energy Agency, Vienna. pp: 227-239.

Johnson, G. D., P. Mackie, M. Jodar, S. Moskovtsev, A. Stephen, and S. A. Krawetz. 2015. Chromatin and extracellular vesicle associated sperm RNAs. *Nucleic Acids Res.* 43: 6847-6859.

Lander, R., J. A. Michael, F. J. Winters, B. C. Meacle, and A. L. Buckland. 2002. Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB. *Biotechnol. Bioeng.* 79: 776-784.

Mariyam, D., M., and J. S. Preetha. 2020. The evolution of DNA extraction methods. *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 8:39-45.

Oko, R., and P. Sutovsky. 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 83: 2-7.

- Pacheco, S. E., E. A. Houseman, B. C. Christensen, C. J. Marsit, K. T. Kelsey, M. Sigman, and K. Boekelheide. 2011. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PloS One* 6: e20280.
- Psifidi, A., C. I. Dovas, G. Bramis, T. Lazou, C. L. Russel, G. Arsenos, and G. Banos. 2015. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PloS One*. 10: e115960.
- Prabha, T. R., K. Revathi, M. S. Vinod, S. P. Shanthumar, and P. Bernard. 2013. A simple method for total genomic DNA extraction from water mould. *Curr. Sci.* 14: 345-347.
- Sarova, N., S. Ahlawat, A. Grewal, R. Sharma, and R. Arora. 2018. Differential promoter methylation of DAZL gene in bulls with varying seminal parameters. *Reprod. Dom. Anim.* 53: 914-920.
- Serra O., R. Frazzi, A. Perotti, L. Barusi, and A. Buschini. 2018. Use of classic cards for epigenetic analysis of sperm DNA. *Biotechniques* 64: 45-51.
- Silva E., C. B., M. A. Pelinca, A. C. Acosta, M. F. Silva D., M. A. Gomes F, and M. P. Guerra M. 2014. Comparative study of DNA extraction methodologies from goat sperm and its effects on polymerase chain reaction analysis. *Genet. Mol. Res.* 13: 6070-6078.
- Silva, P. C., M. C. Malabarba, R. Vari, and L. R. Malabarba. 2019. Comparison and optimization for DNA extraction of archived fish specimens. *MethodsX* 6: 1433-1442.
- Schablitsky, M., K. E. Witt, J. R. Madrigal, M. R. Ellegaard, R. S. Malhi, and H. Schroeder. 2019. Ancient DNA analysis of a nineteenth century tobacco pipe from a Maryland slave quarter. *J. Archaeol. Sci.* 105:11-18.
- Sutovsky, P., R. Oko, L. Hewitson, and G. Schatten. 1997. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev. Bio.* 188: 75-84.
- Ukogu, O. A., A. D. Smith, L. M. Devenica, H. Bediako, R. B. McMillan, Y. Ma, A. Balaji, R. D. Schwab, S. Anwar, M. Dasgupta, and A. R. Carter. 2020. Protamine loops DNA in multiple steps. *Nucleic Acids Res.* 48: 6108-6119.
- Usman, T., Y. Yu, C. Liu, Z. Fan, and Y. Wang. 2014. Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. *Genet Mol Res* 13: 3319-3328.
- Viltrop, T., K. Krjutskov, P. Palta, and A. Metspalu. 2010. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 398: 260-262.
- Ward, W. S. 2018. Organization of sperm DNA by the nuclear matrix. *Am J Clin Exp Urol* 6: 87-92.
- Wu, H., M. K. de Ganes, G. Lucheti, and R. Pilsner. 2015. Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA. *Biotechniques.* 58: 293-300.
- Xavier, M. J., B. Nixon, S. D. Roman, and R. J. Aitken. 2018. Improved methods of DNA extraction from human spermatozoa that mitigate experimentally-induced oxidative DNA damage. *PLoS One* 13: e0195003.

RENDIMIENTO Y CALIDAD INTRÍNSECA DE CRUZAS DE MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA EN AMBIENTES DE VALLES ALTOS DE MÉXICO

YIELD AND INTRINSIC QUALITY OF PROTEIN QUALITY MAIZE CROSSES AT ENVIRONMENTS OF HIGH VALLEYS OF MEXICO

Consuelo López-López¹, Alejandro Espinosa-Calderón², Margarita Tadeo-Robledo³,
Ma. Gricelda Vázquez-Carrillo^{2*}, J. Jesús García-Zavala¹

¹Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo. Estado de México. (lopez.consuelo@colpos.mx; zavala@colpos.mx). ²Campo Experimental Valle de México-INIFAP. Km 13.5 Carretera Los Reyes-Texcoco. 56250, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. (espinoale@yahoo.com.mx), (gricelda_vazquez@yahoo.com). ³Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucán, Km 2.5. 54714. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. (tadeorobledo@yahoo.com).

RESUMEN

El grano de maíz es deficiente en lisina y triptófano, aminoácidos esenciales para la alimentación humana. La generación de genotipos con granos más nutritivos puede incidir de manera favorable en la salud de la población. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de localidad sobre el rendimiento, las propiedades físicas y la calidad de la proteína del grano de 18 cruzas simples de maíz con calidad proteínica (QPM) (*Zea mays* L.). Los genotipos QPM resultaron de la cruce de seis líneas androestériles QPM (LQ1, LQ2, LQ3, LQ4, LQ5 y LQ6) y tres líneas élite QPM (CML173, CML354 y CML352), y se evaluaron en dos localidades: FESC-UNAM y CEVAMEX-INIFAP, en primavera y verano de 2014. Las variables evaluadas fueron el rendimiento, peso hectolítrico, peso de cien granos, índice de flotación, proteína, lisina, triptófano e índice de calidad, en el Laboratorio de Maíz del INIFAP. Para todas las variables se realizó un análisis de varianza combinado e individual y se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey). Las cruzas simples con productividad mayor y mejores características físicas de calidad (en ambas localidades) fueron LQ6 x CML352, LQ3 x CML352 y LQ4 x CML354, presentaron granos de tamaño mediano y de textura intermedia y dura. Solo la cruce LQ5 x CML354 presentó el porcentaje de triptófano y lisina cercanos a lo indicado en la literatura para declarar a un maíz como de calidad proteínica.

Palabras clave: maíz de calidad proteínica, QPM, rendimiento, localidad, propiedades físicas, calidad proteínica.

ABSTRACT

Maize grain is deficient in lysine and tryptophan, essential amino acids for human nutrition. The generation of genotypes with more nutritious grain could favor people's health. The objective of this study was to determine the effect of location on yield, physical properties and protein quality of the grain of 18 single cross quality-protein maize (QPM) (*Zea mays* L.). The QPM genotypes resulted from the cross of six male-sterile QPM lines (LQ1, LQ2, LQ3, LQ4, LQ5 and LQ6) and three elite QPM lines (CML173, CML354 y CML352). These genotypes were evaluated in two locations, FESC-UNAM and CEVAMEX-INIFAP, in spring and summer 2014. The evaluated variables were yield, hectoliter weight, 100 grain weight, floatation index, protein, lysine, tryptophan and quality index in the Laboratorio de Maíz of INIFAP. For all the variables, an analysis of variance, combined and individual, and the Tukey test of comparison of means were performed. The simple crosses with higher productivity and better physical quality characteristics (in both localities) were LQ6 x CML352, LQ3 x CML352 and LQ4 x CML354, which had medium-size grains and medium and hard texture. Only the LQ5 x CML354 cross had percentages of tryptophan and lysine close to those indicated in the literature for quality-protein maize.

Key words: quality-protein maize, QPM, yield, locality, physical properties, quality-protein.

INTRODUCTION

Interest in improving protein quality of cereals is a topic that has stimulated the generation of genotypes with more nutritious grains to

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2020. Aprobado: septiembre, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 1079-1090. 2020.

INTRODUCCIÓN

El interés por mejorar la calidad de la proteína de los cereales es un tema que estimula la generación de genotipos con granos más nutritivos pues incide favorablemente en la salud de la población, así como en la alimentación de animales no rumiantes (Nuss y Tanumihardjo, 2011; Dei, 2017). El maíz (*Zea mays* L.) es el alimento básico de millones de habitantes en el mundo, en especial en México (FIRA, 2015). El grano aporta 15 a 56% de todas las calorías ingeridas por los seres humanos. El maíz consumido cada día es deficiente en aminoácidos esenciales pues contiene 1.6% de lisina y 0.47% de triptófano, mientras que el maíz de calidad proteínica o QPM (por sus siglas en inglés) es más nutritivo, ya que contiene en promedio >3.5% de lisina y >0.75% de triptófano en proteína (Twumasi *et al.* 2016). Por consiguiente, se deben ingerir como parte de la dieta para completar el perfil de aminoácidos esenciales requerido para la síntesis de proteínas (Vivek *et al.*, 2008).

Vasal *et al.* (1980), por medio de mejoramiento convencional, aumentaron el rendimiento del maíz QPM y lograron convertir los granos caracterizados por una textura suave y densidad baja, en granos con textura dura. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en coordinación con el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), realizaron proyectos en maíces QPM en los estados de Guerrero y Chiapas. En el año 2000, con los resultados de esas actividades se realizó la inscripción de híbridos y variedades en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) (Espinosa *et al.*, 2005).

Después del 2000, solo se han registrado nuevos materiales QPM para la Meseta Comiteca, los Altos de Chiapas y el subtrópico de México (Coutiño y Vázquez, 2018; Coutiño *et al.*, 2018; CNVV, 2018). En Valles Altos del Centro de México es poco lo realizado para generar materiales QPM con calidad nutricional alta (Vázquez *et al.*, 2012, 2013). La investigación sobre la calidad del grano de los maíces con calidad de proteína, así como la influencia del ambiente sobre esos genotipos en la expresión de las propiedades físicas y químicas del grano es mínima. Vázquez *et al.* (2012) evaluaron híbridos de maíz de alta calidad proteínica desarrollados para los Valles Altos de México (H-143C, H-145C, H-147C y

favorably drive the health of the population, as well as to improve non-ruminant animal feeding (Nuss and Tanumihardjo, 2011; Dei, 2017). Maize (*Zea mays* L.) is the basic food of millions of inhabitants worldwide, especially in Mexico (FIRA, 2015). This grain supplies 15 to 56% of all the calories ingested by humans. The maize consumed every day is deficient in essential amino acids, containing 1.6% lysine and 0.47% tryptophan, while quality-protein maize (QPM) is more nutritious, containing on average >3.5% lysine and >0.75% tryptophan in protein (Twumasi *et al.*, 2016), which should be eaten as part of the diet to complete the profile of essential amino acids required for protein synthesis (Vivek *et al.*, 2008).

Vasal *et al.* (1980), by conventional breeding, increased the yield of QPM and converted the grains characterized by their soft texture and low density into hard-textured grains. The Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) in coordination with the Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) carried out projects in QPM in the states of Guerrero and Chiapas. In 2000, with the results of these activities, these hybrids and varieties were registered in the Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) (Espinosa *et al.*, 2005).

After 2000, new QPM materials have been registered only for the Meseta Comiteca of Los Altos de Chiapas and subtropical Mexico (Coutiño and Vázquez, 2018; Coutiño *et al.*, 2018; CNVV, 2018). In the High Valleys of Central Mexico, little has been done to generate QPM materials with high nutritional quality (Vázquez *et al.*, 2012, 2013). Research on the grain quality of quality-protein maize and how the environment affects these genotypes in the expression of the physical and chemical properties of the grain is scarce. Vázquez *et al.* (2012) evaluated protein quality maize hybrids developed for the High Valleys of Mexico (H-143C, H-145C, H-147C and H-149C), but of this group, only the hybrid H-143C was released in 2008 (CNVV, 2018).

Evaluating the effect of environment on physicochemical and quality characteristics of tortillas made from QPM hybrids developed for the High Valleys, it was found that they maintained lysine and tryptophan contents, and tortillas of better quality than those of the control were obtained (Vázquez *et al.*, 2012). According to Mittelman *et*

H-149C), pero de ese grupo solo se liberó el híbrido H-143C en el año 2008 (CNVV, 2018).

Al evaluar el efecto del ambiente en las características fisicoquímicas y la calidad de tortillas de híbridos de maíz QPM, desarrollados para Valles Altos, se encontró que mantuvieron los contenidos de lisina y triptófano y se obtuvieron tortillas con mejor calidad que los testigos (Vázquez *et al.*, 2012). De acuerdo con Mittelman *et al.* (2003), los principales factores ambientales que afectan el contenido de proteína en el grano son la temperatura, la disponibilidad de agua y la de nitrógeno en el suelo. La densidad de la población es otro factor que afecta la calidad de la proteína, pero ésta se mantiene en los niveles propios de un maíz QPM (Vázquez *et al.*, 2013).

La Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC-UNAM) ha desarrollado líneas progenitoras de híbridos que poseen androesterilidad, en las cuales se incorporó la característica de alta calidad proteínica (QPM). Dentro de las ventajas de utilizar materiales androestériles destaca la reducción significativa de los costos de producción en el incremento de semilla de maíz híbrida (Canales *et al.*, 2017).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de localidad en el rendimiento, las características físicas y la calidad de la proteína del grano de 18 cruza simples de maíz QPM. La hipótesis fue que al menos una cruza cumple con la calidad para ser promovida como un maíz QPM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el ciclo primavera y verano de 2014 se sembraron 18 cruza simples de maíz de calidad proteínica y los híbridos trilineales H-53 AE y Tsíri Puma de grano de endospermo normal como testigos en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC-UNAM) y el Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX-INIFAP). Los híbridos simples son cruza entre seis líneas androestériles QPM (LQ1, LQ2, LQ3, LQ4, LQ5 y LQ6) y tres líneas élite QPM procedentes del CIMMYT (CML173, CML354 y CML352). La FESC-UNAM está ubicada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, México (19° 41' N, 99° 11' O; 2274 m de altitud), y tiene suelo de textura franco arcillosa. La otra localidad fue Santa Lucía de Prías, Coatlinchán, municipio de Texcoco, estado de México (19° 27' N, 98° 51' O, 2240 m de altitud), con suelo de textura franco arenosa.

Los 18 genotipos y los testigos se evaluaron en un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. La siembra se realizó con una densidad de población de 65 000

al. (2003), the main environmental factors that affect protein content in the grain are temperature and the availability of water and nitrogen in the soil. Population density is another factor that affects protein quality but remains at levels characteristic of QPM (Vázquez *et al.*, 2013).

The Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán of Universidad Nacional Autónoma de México (FESC-UNAM) has developed hybrid progenitor lines that are male-sterile to which the high quality protein (QPM) trait has been incorporated. Among the advantages of using male-sterile materials, it is outstanding the significant reduction in production costs on increasing hybrid maize seed (Canales *et al.*, 2017).

The objective of this study was to determine the effect of locality on yield, physical characteristics and grain protein quality of 18 single cross QPM. The hypothesis was that at least one cross would have the quality necessary to be promoted as a QPM.

MATERIALS AND METHODS

During the spring and summer cycles of 2014, 18 quality protein maize single crosses and the trilinear hybrids H-53 AE and Tsíri Puma of normal endosperm as controls were planted in FESC-UNAM and in the Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX-INIFAP). The single-cross hybrids were crosses between male-sterile QPM lines (LQ1, LQ2, LQ3, LQ4, LQ5 and LQ6) and three elite QPM lines from CIMMYT (CML173, CML354 and CML352). FESC-UNAM is located in the municipality of Cuautitlán Izcalli, Mexico (19° 41' N, 99° 11' W, 2274 m altitude); the soil has a clay loam texture. The other locality was Santa Lucía de Prías, Coatlinchán, Municipality of Texcoco, state of Mexico (19° 27' N, 98° 51' W, 2240 m altitude), with sandy-loam soil.

The 18 genotypes and the controls were evaluated in a complete randomized block design with three replications. Seeds were planted at a population density of 65 000 plants ha⁻¹, and the experimental plot had one row 5 m long and 0.80 m wide. Planting was made in June 2014 in both environments. In Santa Lucía, irrigation was applied only at planting and subsequently moisture was supplied by rainfall. During the crop cycle in Santa Lucía, it hailed before male flowering.

Harvest was manual in both environments in December 2014. Five ears were selected at random from each experimental unit and de-grained by hand to obtain the amount of grain necessary for the tests.

plantas ha⁻¹, y la parcela experimental tuvo un surco de 5 m de largo por 0.80 m de ancho. La siembra se efectuó en junio de 2014 en ambos ambientes. En Santa Lucía se aplicó riego en la siembra y después se aplicaron dos riegos de auxilio. En FESC-UNAM solo se aplicó un riego a la siembra, y la humedad posterior se cubrió con la precipitación pluvial. Durante el ciclo de cultivo en Santa Lucía ocurrieron dos granizadas antes de la floración masculina.

La cosecha fue manual en ambos ambientes y se realizó en diciembre de 2014. Al azar se tomaron cinco mazorcas de cada unidad experimental y se desgranaron a mano para tener la cantidad de grano necesario para realizar las pruebas pertinentes.

El rendimiento se evaluó como lo describieron López *et al.* (2017) y se expresó en Mg ha⁻¹. Las variables físicas evaluadas en los granos fueron: peso hectolítrico (PH) o densidad aparente, según el método 84-10 de la *American Association of Cereal Chemistry* (AACC, 2000), peso de 100 granos (PCG), que es una medida indirecta del tamaño del grano (Billeb y Bressani, 2001), y el índice de flotación (IF) como medida indirecta de la dureza del grano (NMX-FF-034/1-SCFI-2002; SE, 2002).

Para el contenido de proteína, primero se determinó el contenido de nitrógeno con el equipo Technicon y se usó un factor de conversión a proteína de 6.25 (método 46-13 de la AACC, 2000). La lisina y el triptófano se cuantificaron de acuerdo con los métodos colorimétricos de Tsai *et al.* (1975), modificados por Villegas *et al.* (1984) y de Nurit *et al.* (2009), respectivamente. Los resultados se expresan en g de aminoácido por 100 g de proteína.

El índice de calidad de proteína (ICP) es uno de los criterios para calificar a un maíz como genotipo QPM (Vivek *et al.*, 2008; Twumasi *et al.*, 2016) y se obtiene al dividir el porcentaje de triptófano entre el porcentaje de proteína y multiplicar el resultado por 100. Cuando el ICP es superior a 0.6, el genotipo se considera QPM; sin embargo, también es importante tener en cuenta los contenidos de lisina y triptófano. Este criterio se puede justificar ya que por lo regular solo se analiza el triptófano, porque los valores de lisina y triptófano tienen una correlación alta (Vivek *et al.*, 2008).

Análisis estadístico

Con los datos se realizó un análisis de varianza combinado, donde el efecto de los genotipos se consideró fijo y el de ambiente aleatorio (dos ambientes) (Sahagún, 1998). Además, se hicieron análisis estadísticos individuales para cada localidad para conocer el comportamiento de los genotipos. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para cada variable. Los procedimientos se hicieron con SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

Yield was assessed as described by López *et al.* (2017) and expressed in Mg ha⁻¹. The following physical variables were evaluated in grain: hectoliter weight (PH) or bulk density, according to method 84-10 of the *American Association of Cereal Chemistry* (AACC, 2000), 100 grain weight (PCG), which is an indirect measure of grain size (Billeb and Bressani, 2001), and the floatation index (IF) as an indirect measure of grain hardness (NMX-FF-034/1-SCFI-2002; SE, 2002).

For protein content, nitrogen content was determined at first with Technicon equipment, and a protein conversion factor of 6.25 was used (method 46-13 of the AACC, 2000). Lysine and tryptophan were quantified following the colorimetric methods of Tsai *et al.* (1975), modified by Villegas *et al.* (1984) and Nurit *et al.* (2009), respectively. The results are expressed in g amino acid 100 g⁻¹ protein.

The index of protein quality (ICP) is one of the criteria used to grade a maize as a QPM genotype (Vivek *et al.*, 2008; Twumasi *et al.*, 2016). It is obtained by dividing the percentage of tryptophan by the percentage of protein and multiplying the result by 100. When the ICP is above 0.6, the genotype is considered QPM. However, it is also important to bear in mind the lysine and tryptophan contents. This criterion can be justified; usually only tryptophan is analyzed because lysine values correlate highly with tryptophan values (Vivek *et al.*, 2008).

Statistical analysis

With the data, a combined analysis of variance was performed; the effect of the genotypes was considered fixed and that of the environments, random (two environments) (Sahagún, 1998). In addition, individual statistical analyses were conducted for each locality to discriminate genotype behavior. To compare means, the Tukey test ($p \leq 0.05$) was used for each variable. The procedures were performed with SAS® version 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

With the combined analysis of variance, highly significant differences ($p \leq 0.01$) were found between environments (A), among genotypes (G) and in the interaction (A x G) for all variables except 100 grain weight. The significance detected in the interaction showed that both factors jointly affected the variables. The reduced values of the coefficient of variation indicated adequate control (< 7%) of the experimental variation (Table 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el análisis de varianza combinado se encontraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre ambientes (A), entre genotipos (G) y en la interacción (A x G) para todas las variables, excepto para peso de 100 granos. La significancia detectada en la interacción mostró que ambos factores influyeron conjuntamente en las variables. Los valores reducidos del coeficiente de variación indicaron un control adecuado (< 7%) de la variabilidad experimental (Cuadro 1).

La significancia detectada entre localidades indica que los ambientes de evaluación tuvieron diferencias en sus condiciones agroecológicas como la precipitación (825 en FESC-UNAM y 723 mm en CEVAMEX). La lluvia se presentó de manera irregular a lo largo del ciclo del cultivo (junio-diciembre), sobre todo en CEVAMEX (estación meteorológica de la Universidad Autónoma Chapingo). La estación meteorológica de la FESC-UNAM registró la temperatura máxima (26.4 °C) en agosto, y en Santa Lucía la temperatura máxima (25 °C) fue en junio y agosto; estos meses coinciden con la siembra e inicio de la floración. También hubo ausencia de lluvia en dicho periodo más el efecto de las granizadas que ocurrieron en CEVAMEX.

El rendimiento mayor se registró en el ambiente de la FESC-UNAM (Cuadro 2) lo cual se atribuye a la mejor textura del suelo (franco arcilloso) y la distribución de las lluvias, así como a la ausencia de

The significance detected between localities indicates that the environments of the evaluation were different in their agro-ecological conditions, such as precipitation (825 mm in FESC-UNAM and 723 mm in CEVAMEX). Rainfall was irregularly distributed throughout the crop cycle (June-December), especially in CEVAMEX (weather station of the Universidad Autónoma Chapingo). The weather station of the FESC-UNAM registered the maximum temperature (26.4 °C) in August and in Santa Lucía the maximum temperature (25 °C) was in June and August, coinciding with planting and beginning of flowering. There was also an absence of rain in this period, plus the effect of the hailstorms that occurred in CEVAMEX.

The higher yield was recorded in the FESC-UNAM environment (Table 2). This is attributed to better soil texture (clay loam), distribution of rainfall, and absence of hailstorms. In contrast, in CEVAMEX, the soil is sandy (little moisture retention), precipitation was low (< 80 mm) in August, and hailstorms occurred (August 17 and September 12) during the grain fill stage that affected genotype yield (Table 2) (López *et al.*, 2017).

Genotype effect

All the genotypes had higher yield in FESC-UNAM. Sala *et al.* (2007) mentioned that the number of maize grains is the characteristic which is most sensitive to environmental variation, and it

Cuadro 1. Cuadrados medios y significancia estadística del análisis combinado para variables de rendimiento y calidad intrínseca de maíces QPM y testigos comerciales evaluados en dos ambientes del Estado de México. Ciclo primavera-verano 2014.

Table 1. Mean squares and statistical significance of the combined analysis for the variables yield and intrinsic QPM quality and commercial controls evaluated in two environments of the state of Mexico. Spring-summer cycle 2014.

F V	Ambiente (A)	Genotipo (G)	A x G	Media	CV (%)
Rendimiento	195.406 [†]	11.508 [†]	4.527 [†]	5.7	5.9
Peso hectolítrico	456.3 [†]	18.96 [†]	20.4 [†]	74.1	1.8
Peso de 100 granos	36.3 [†]	20.90 [†]	0.65	32.3	3.3
Índice de flotación	8.53 [†]	561.34 [†]	50.76 [†]	28.8	4.7
Proteína	15.7 [†]	1.61 [†]	1.07 [†]	10.0	3.7
Triptófano	0.17 [†]	0.028 [†]	0.025 [†]	0.65	4.5
Lisina	1.04 [†]	0.653 [†]	0.186 [†]	2.8	5.4

[†] $p \leq 0.01$; FV: Fuente de variación; CV: Coeficiente de variación en porcentaje. ♦ [†] $p \leq 0.01$; FV: Source of variation; CV: Coefficient of variation in percentage.

Cuadro 2. Efecto del ambiente sobre el rendimiento y calidad intrínseca del grano de cruza simples de maíz blanco QPM para los Valles Altos de México. Ciclo primavera-verano 2014.

Table 2. Effect of environment on yield and intrinsic grain quality in single crosses of white QPM for the High Valleys of Mexico. Spring-summer cycle 2014.

Variable	Ambientes		
	FESC-UNAM	CEVAMEX-INIFAP	DSH
Rendimiento (Mg ha ⁻¹)	7.04 a	4.48 b	0.12
Peso hectolítrico (kg hL ⁻¹)	72.18 a	76.08 b	0.49
Peso de 100 granos (g)	32.90 a	31.80 b	0.39
Índice de flotación	28.60 b	29.08 a	0.49
Proteína (%)	9.70 b	10.40 a	0.13
Triptófano (%)	0.61 b	0.68 a	0.01
Lisina (%)	2.73 b	2.91 a	0.05

Medias con letra diferente en cada hilera indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). DSH, diferencia significativa honesta. ♦ Means in a row with different letters are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$). DSH, honest significant difference.

granizadas. En CEVAMEX el suelo es arenoso (tiene poca retención de humedad), una precipitación reducida (< 80 mm) en agosto, y granizadas (17 de agosto y 12 de septiembre) que afectaron el rendimiento de los genotipos (Cuadro 2) durante la etapa del llenado del grano (López *et al.*, 2017).

Efecto de genotipo

Todos los genotipos tuvieron un rendimiento mayor en FESC-UNAM. Sala *et al.* (2007) mencionaron que el número de granos de maíz es la característica más sensible a la variación ambiental dada por diversos componentes (radiación, temperatura, agua y nutrientes en el suelo). Las diferencias ambientales propias del ciclo de producción (primavera y verano de 2014) condicionaron el desarrollo de los genotipos. En FESC-UNAM las cruza simples LQ2 x CML354, LQ3 x CML173, LQ4 x CML173 y LQ5 x CML352 superaron en rendimiento al híbrido testigo H-53AE (Cuadro 3), así como al rendimiento medio nacional (3.5 Mg ha⁻¹) y a la media para Valles Altos (3.2 Mg ha⁻¹) (SIAP, 2017). La cruza LQ2 x CML354 presentó la diferencia de rendimiento mayor entre localidades, por lo que puede considerarse como inestable.

Los pesos hectolítricos de las cruza en el ambiente de CEVAMEX tuvieron valores de 68.5 a 75 kg hL⁻¹, pero las cruza en el ambiente de la FESC-UNAM

has diverse components (radiation, temperature, water, soil nutrients). The environmental differences particular to the production cycle (spring-summer 2014) conditioned the development of the genotypes. In FESC-UNAM the single crosses LQ2 x CML354, LQ3 x CML173, LQ4 x CML173 and LQ5 x CML352 surpassed the hybrid control H-53 AE in yield (Table 3) as well as the national mean yield (3.5 Mg ha⁻¹) and the mean for the High Valleys (3.2 Mg ha⁻¹) (SIAP, 2017). The cross LQ2 x CML354 had the greatest difference in yield between localities, and thus can be considered unstable.

Hectoliter weight of the crosses in the CEVAMEX environment had values of 68.5 to 75 kg hL⁻¹, while the crosses in the FESC-UNAM environment showed higher values (70 to 81 kg hL⁻¹). In both environments, the crosses LQ6 x CML352, LQ5 x CML173 and LQ3 x CML352 had values equal to or greater than 74 kg hL⁻¹, the value established in the norm (NMX-FF-034/1- SCFI, 2002) and considered adequate for maize cooked through lime water softening (called in Mexico “nixtamalización”). The crosses that had line LQ2 as the female progenitor were those with the lowest hectoliter weight (< 72 kg hL⁻¹), with the exception of the cross LQ2 x CML352 (Table 3).

Noriega *et al.* (2011) pointed out that grain weight is one of the most stable variables, and according to Billeb and Bressani (2001), hundred grain weight

Cuadro 3. Efecto del ambiente sobre el rendimiento y variables de calidad física del grano de cruzas simples de maíz blanco QPM para los Valles Altos de México. Ciclo primavera-verano 2014.

Table 3. Effect of environment on yield and physical characteristics of the grain of single cross white QPM for the High Valleys of Mexico. Spring-summer cycle 2014.

Genotipo	FESC-UNAM	CEVAMEX	FESC-UNAM	CEVAMEX	FESC-UNAM	CEVAMEX
	Rendimiento (Mg ha ⁻¹)		PH (kg hL ⁻¹)		PCG (g)	
LQ2 x CML354	9.55 a	2.436ij	71.7 jk	68.5 d	33.0 dh	32.0 ae
LQ3 x CML173	9.30 a	6.58 b	79.7 ab	71.3 ad	31.0 ik	30.0 ce
LQ4 x CML173	9.23 a	7.95 a	78.3 ae	70.3 ad	34.0 cf	34.0 ac
LQ5 x CML 352	8.58 ab	7.56 a	79.0 ad	69.7 bd	34.3 be	33.0 ae
LQ2 x CML173	8.26 ac	2.03j	70.0 k	70.5 ad	32.7 ei	32.0 ae
LQ6 x CML 352	7.71 bd	5.21 e	79.3 ac	74.3 ab	36.0 ab	34.3 ab
LQ5 x CML 173	7.39 be	6.42 bc	78.0 af	74.0 ab	31.3 hk	30.0 ce
LQ3 x CML352	7.27 be	4.52 f	76.0 dh	75.0 a	35.0 ac	34.0 ac
LQ6 x CML 354	7.23 bf	2.99 h	73.0 hk	73.8 ac	31.7 gk	31.0 be
LQ6 x CML 173	7.07 cg	5.01 ef	78.0 bf	70.3 ad	34.7 ad	33.0 ae
H 53 AE	7.07 cg	3.82 g	79.3 ac	69.0 cd	31.7 gk	30.0 ce
LQ4 x CML352	6.72 dg	5.9 cd	75.7 ei	73.5 ad	35.0 ac	33.0 ae
LQ1 x CML352	6.72dg	3.24 gh	77.7 bf	72.5 ad	31.3 hk	29.7 de
LQ5 x CML 354	6.28 eg	3.41 gh	72.7 ik	73.8 ac	32.3 fj	32.0 ae
LQ2 x CML352	6.10 eh	3.59 g	76.3 cg	72.3 ad	32.3 fj	32.3 ae
LQ4 x CML354	6.09 eh	5.32 de	75.0 fi	73.8 ac	36.3 a	35.33 a
Tsíri Puma	5.88 fh	5.17 e	81.0 a	72.7 ad	33.3 cg	31.3 ae
LQ3 x CML354	5.75 gh	3.49 gh	75.0 fi	73.2 ad	30.7 jk	30.0 ce
LQ1 x CML173	4.89 hi	2.9 2hi	72.7 ik	72.0 ad	30.3 ij	29.0 e
LQ1 x CML354	3.63 i	2.18 j	73.3 gj	73.0 ad	30.0 k	29.0 e
DSH	1.37	0.58	3.29	5.015	1.88	4.31

La comparación de medias se hizo entre pares de columnas (2vs3, 4vs5, 6vs7). Medias con diferente letra en cada par de columnas son estadísticamente diferentes (Tukey; p≤0.05). ♦ Comparison of means was performed between pairs of columns (2 vs. 3, 4 vs. 5, 6 vs. 7). Means in each pair of columns with different letters are statistically different (Tukey; p≤0.05).

PH= Peso hectolítrico, PCG= Peso de 100 granos, DSH= diferencia significativa honesta. ♦ PH= Hectoliter weight, PCG= 100 grain weight, DSH= honest significant difference.

mostraron valores superiores (70 a 81 kg hL⁻¹). En ambos ambientes las cruzas LQ6 x CML352, LQ5 x CML173, LQ3 x CML352 presentaron valores iguales o mayores a 74 kg hL⁻¹, el valor establecido en la norma (NMX-FF-034/1- SCFI, 2002) y considerado adecuado para los maíces destinados al proceso de nixtamalización. Las cruzas que tuvieron como progenitor hembra a la línea LQ2, fueron las de PH (< 72 kg hL⁻¹) menor, excepto la cruza LQ2 x CML352 (Cuadro 3).

Noriega *et al.* (2011) señalaron que el peso del grano es una de las variables más estables, y según Billeb y Bressani (2001), el PCG es un indicador del tamaño de grano: entre mayor sea el PCG mayor será el tamaño de grano. Las cruzas y los híbridos (testigos) tuvieron un comportamiento similar (p>0.05),

(PCG) is an indicator of grain size, the higher the PCG, the larger the grain size. Both the crosses and the hybrids (controls) had similar behavior (p≤0.05); the grain size that predominated among the crosses was medium (PCG between 33 - 38 g). The single crosses with higher productivity and better physical quality characteristics (in both localities) were LQ6 x CML352, LQ3 x CML352 and LQ4 x CML354. These crosses had medium grain size (PCG=34 g), PH = 75.7 kg hL⁻¹ and hard and medium hardness grains (IF between 32 and 43 floating grains). Therefore, grains meet the specifications of the norm NMX.034/1-2002 for maize destined for lime water softening and can be recommended to the maize processing industries that produce fresh dough and/or lime water softened maize flour (Table 3).

el tamaño del grano que prevaleció en las cruzas fue mediano (peso de cien granos PCG: 33-38 g). Las cruzas simples con productividad mayor y características físicas de calidad mejores (en ambas localidades) fueron LQ6 x CML352, LQ3 x CML352 y LQ4 x CML354. Estas cruzas presentaron granos de tamaño mediano (PCG=34 g), PH= 75.7 kg hL⁻¹ y granos duros e intermedios (IF entre 32 y 43 granos flotantes); por lo tanto, cumplen con las especificaciones de la norma NMX.034/1-2002 para maíces destinados al proceso de nixtamalización y se pueden considerar para recomendar a las industrias procesadoras de maíz que producen masa fresca o harinas de maíz nixtamalizado o ambas (Cuadro 3).

Respecto a la dureza del grano, en ambos ambientes se identificaron dos tipos de textura: intermedia y dura (índice de flotación menor corresponde a maíces más duros). En CEVAMEX en 13 cruzas prevaleció la textura dura (índice de flotación 16-37), y los dos híbridos comerciales presentaron textura dura en las dos localidades (Cuadro 4). En la FESC-UNAM seis genotipos presentaron dureza intermedia y en CEVAMEX solo cinco fueron consistentes con esta dureza (Cuadro 4). De acuerdo con Vázquez *et al.* (2013), los híbridos H-143C y H-149C también presentaron granos de dureza intermedia, cuando se produjeron con una densidad de población de 67 000 plantas por hectárea, similar a la de nuestro experimento.

En esta investigación se corroboró la hipótesis de Vivek *et al.* (2008), quienes señalaron que el progenitor hembra podría ser el responsable de los genes modificadores de la dureza del grano. Cabe destacar que las líneas elite QPM (machos) presentaron granos de textura suaves. Por la dureza de sus granos, las cruzas simples (Cuadro 4) QPM podrían procesarse por la industria de la masa-tortillas y la de harina nixtamalizada, según Vázquez *et al.* (2014).

De acuerdo con lo indicado por Twumasi *et al.* (2016), los valores de proteína de las cruzas QPM en las dos localidades variaron de 8 a 11% (como un maíz no QPM), intervalo que incluye a los híbridos comerciales usados como testigos en CEVAMEX; y las cruzas en las cuales participó la línea CML352, presentaron valores superiores a 10% de proteína. Esto no sucedió en FESC-UNAM, lo que se atribuye a la interacción genotipo-ambiente. Así, en la localidad con más precipitación (FESC-UNAM), el contenido de proteína fue menor en los genotipos, y

Regarding grain hardness, in both environments two types of texture were identified: medium and hard (a lower floatation index corresponds to harder maize grain). In CEVAMEX in 13 crosses, hard texture prevailed (floatation index 16-37), and the two commercial hybrids had hard texture in both localities (Table 4). Six genotypes in FESC-UNAM and only five in CEVAMEX had intermediate texture (Table 4). According to Vázquez *et al.* (2013), hybrids H-143C and H-149C also had intermediate grains when produced at a population density of 67 000 plant ha⁻¹, a density like that used in our experiment.

In this study we corroborated the hypothesis of Vivek *et al.* (2008), who indicated that the female progenitor could be responsible for genes that modify grain hardness. It is worth highlighting that the elite QPM lines (male) had soft grains. Because of the hardness of their grains, the QPM single crosses could be processed in the maize dough-tortilla and lime water softened maize flour industry, as pointed out by Vázquez *et al.* (2014).

Protein values of QPM crosses in the two localities were in the interval of 8 to 11% (non-QPM), indicated by Twumasi *et al.* (2016). These crosses include the commercial hybrids used as controls in CEVAMEX and the crosses, in which line CML 352 participated, that had protein values above 10%. This did not occur in FESC-UNAM because of the interaction genotype-environment. In this locality there was more precipitation, and the genotypes had lower protein content, coinciding with Vázquez *et al.* (2014), who found that the percentage of protein decreased in evaluated genotypes under irrigation and was higher in rainfed conditions. Both controls had acceptable protein contents, but the Tsíri Puma control was superior in FESC-UNAM than H-53 AE (Table 4).

Protein quality

According to Twumasi *et al.* (2016), for maize to be considered QPM, it must have levels of the essential amino acids lysine and tryptophan above 0.35 and 0.072 g 100 g⁻¹, respectively. The contents in the studied crosses showed that only 22% of the materials achieved the level necessary to consider them quality-protein maize (Table 5). This result is attributed to the interaction of the pollen of the crosses with that of non-QPM plants, which were

Cuadro 4. Efecto del ambiente sobre el índice de flotación, textura y porcentaje de proteína del grano de cruza simples de maíz QPM para los Valles Altos de México. Ciclo primavera-verano 2014.
Table 4. Effect of environment on floatation index, texture, and percentage of protein in grains of single cross QPM developed for the High Valleys of Mexico. Spring-summer cycle 2014.

Genotipo	FESC-UNAM	CEVAMEX	FESC-UNAM	CEVAMEX	FESC-UNAM	CEVAMEX
	Índice de flotación (IF)		Textura		Proteína (%)	
LQ6 x CML 173	46 a	39 ab	intermedio	intermedio	9.8 ad	10.3 bf
LQ4 x CML352	44 ab	42 a	intermedio	intermedio	9.6 ad	11.0 ad
LQ6 x CML 352	43 ac	39 ab	intermedio	intermedio	9.4 ae	10.6 bf
LQ3 x CML352	42 bc	40 ab	intermedio	intermedio	10.3 ac	11.2 ab
LQ4 x CML173	40 cd	38 ab	intermedio	intermedio	9.5 ad	9.6 fg
LQ6 x CML 354	40 cd	37 b	intermedio	duro	9.6 ad	11.0 ad
LQ3 x CML173	38 d	36 b	duro	duro	9.9 ad	10.1 cf
LQ4 x CML354	32 e	36 b	duro	duro	10.4 ab	12.0 a
LQ3 x CML354	30 ef	20 ef	duro	duro	9.8 ad	10.0 df
LQ1 x CML352	28 f	30 c	duro	duro	10.6 a	11.1 ac
LQ1 x CML354	23 g	26 cd	duro	duro	9.9 ad	8.9 g
Tsíri Puma	21gh	23 de	duro	duro	10.1 ad	9.5 fg
LQ5 x CML 352	21 gh	38 ab	duro	duro	9.9 ad	10.0 df
LQ5 x CML 354	20 gi	16 f	duro	duro	9.4 ae	10.3 bf
LQ2 x CML173	18 hj	24 de	duro	duro	9.9 ad	10.7 be
LQ2 x CML354	18 hj	27 cd	duro	duro	9.1 de	11.9 a
H 53 AE	18 hj	16 f	duro	duro	8.3 e	9.9 eg
LQ5 x CML 173	18hj	20 ef	duro	duro	9.2 ce	9.7 eg
LQ1 x CML173	17 ij	20 ef	duro	duro	9.7 ad	9.9 dg
LQ2 x CML352	15 j	16 f	duro	duro	9.3 be	10.4 bf
DSH	3.98	4.38			1.23	1.09

La comparación de medias se hizo entre pares de columnas (2 vs.3 , 6 vs. 7). Medias con letra diferente en cada par de columnas indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). Textura: muy duro (0-12); duro (13-36); intermedio (38-62). DSH=Diferencia significativa honesta. ♦ Means were compared between pairs of columns (2 vs. 3, 6 vs. 7). Means in each pair of columns with different letters indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$). Texture: very hard (0-12); hard (13-37); medium (38-62). DSH=honest significant difference.

concuera con lo señalado por Vázquez *et al.* (2014) de que el porcentaje de proteína disminuyó en los genotipos evaluados bajo riego, aunque dicho porcentaje fuera mayor en temporal. Ambos testigos presentaron valores aceptables de proteína, pero el testigo Tsíri Puma fue superior en FESC-UNAM respecto a H-53 AE (Cuadro 4).

Calidad proteínica

De acuerdo con Twumasi *et al.* (2016), para que un maíz se considere como QPM debe tener niveles de los aminoácidos esenciales, lisina y triptófano, superiores a 0.35 y 0.072 g 100 g⁻¹, respectivamente. Los contenidos en las cruza investigadas mostraron que solo 22% de los materiales alcanzaron los contenidos para considerarlos maíces de calidad proteínica (Cuadro 5). Este resultado se atribuye a la interacción

growing around the experiment. In this respect Vivek *et al.* (2008) mentioned that the proportion of normal pollen to QPM pollen that pollinates QPM is 4:1, so that growers can expect that at least 25% of their grain is QPM, as occurred in our study.

Pollen exchange among the study materials was evident. The hybrid H-53 AE showed higher values than those reported for non-QPM (<3.2% lysine and <0.65% tryptophan), (Twumasi *et al.* 2016). This result could have been caused by the genes of this hybrid that interacted with the genes of the QPM genotypes. Vivek *et al.* (2008) mentioned that if a row of QPM is planted next to a non-QPM variety, regardless, 50% of the grain produced will have high lysine and tryptophan contents because the non-QPM pollen competes more or less equally with the QPM pollen to pollinate the QPM variety.

Cuadro 5. Calidad proteínica del grano de genotipos con porcentajes altos de lisina y triptófano, en dos ambientes de evaluación. Ciclo primavera-verano 2014.

Table 5. Protein quality of grain of genotypes with higher percentages of lysine and tryptophan in two environments evaluated. Spring summer cycle 2014.

Genotipo	FESC-UNAM	CEVAMEX	FESC-UNAM	CEVAMEX	FESC-UNAM	CEVAMEX
	% Triptófano		% Lisina		Índice de calidad de proteína	
LQ3 x CML354	0.59 c	0.79 b	2.82 c	3.55 b	0.59 b	0.79 bc
LQ2 x CML352	0.64 bc	0.78 bc	3.03 bc	3.39 b	0.68 b	0.73 bc
LQ1 x CML354	0.66 bc	0.88 a	3.04 bc	3.84 a	0.66 b	0.99 a
H 53 AE	0.71 ab	0.76 bc	3.47 a	3.5 b	0.85 a	0.77 bc
LQ5 x CML 354	0.78 a	0.74 c	3.22 ab	3.07 c	0.83 a	0.71 c
DSH	0.092	0.05	0.27	0.19	0.10	0.08

La comparación de medias se hizo entre pares de columnas (2vs3, 4vs5, 6vs7). Medias con diferente letra en cada par de columnas son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq .05$). DSH = Diferencia significativa honesta. ♦ Means were compared between pairs of columns (2 vs.3, 4 vs. 5, 6 vs. 7). Means in each pair of columns with different letters indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$). DSH=honest significant difference.

del polen de las cruza, con el de plantas que no eran QPM, las cuales estuvieron ubicadas alrededor del experimento. Al respecto, Vivek *et al.* (2008) indicaron que la proporción de polen normal a polen QPM que llega a polinizar el maíz QPM, es 4:1, por lo cual el productor puede esperar que por lo menos 25% de su grano sea QPM, como ocurrió en esta investigación.

El intercambio de polen entre los materiales de estudio fue evidente. El híbrido H-53 AE mostró valores superiores a lo reportado para maíces no QPM (<3.2 % de lisina y <0.65 % de triptófano), (Twumasi *et al.* 2016). Este resultado podría deberse a que los genes de este híbrido interactuaron con los genes de genotipos QPM. Vivek *et al.* (2008) mencionaron que si se siembra una hilera de maíz QPM junto a una variedad que no lo es, 50% del grano producido de todas formas tendrá un contenido alto de lisina y triptófano porque el polen que no es QPM compite en forma más o menos igualitaria con el polen QPM para polinizar la variedad QPM.

La cruza LQ5 x CML354 presentó valores cercanos con lo reportado por Vázquez *et al.* (2013) y Twumasi *et al.* (2016) (% triptófano: 0.76-0.87; >0.8; y % de lisina: 3.38-3.94; >4.0, respectivamente) para que se pueda considerar como un maíz QPM.

Sí la guía es el índice de calidad de proteína para discernir sobre cuales maíces son QPM, se podría mencionar que el testigo H 53 AE es un genotipo QPM (al tomar en cuenta que el índice de calidad

The cross LQ5 x CML354 had values close to those reported by Vázquez *et al.* (2013) and Twumasi *et al.* (2016) (% tryptophan: 0.76-0.87, >0.8; % lysine: 3.38-3.94, >4.0, respectively) to be considered QPM.

If the protein quality index is used as a guide to discern what maize is QPM, we could mention that the H 53AE control is a QPM genotype (considering that the quality index for non-QPM materials presents values of 0.6 to 0.7). Because of this, the criterion used to categorize the single crosses by their protein quality is relative (Gutiérrez *et al.*, 2014). The interaction of the alleles involved in protein quality is a function of the gene action that is generated between them, of how transcription of the trait occurs and of the genetic diversity of the lines (Schön *et al.*, 2010). Expression of protein quality is complex, therefore explaining why not all the crosses were outstanding.

The levels of lysine and tryptophan should be monitored while generating new genotypes, and this is important to point it out because a material with the genotype *o2o2* with lysine and tryptophan levels equal to those of normal endosperm maize may or may not be obtained. For this reason, evaluation of crosses outstanding in lysine and tryptophan content in this study should continue under conditions of total isolation to determine whether they can be denominated QPM.

This type of evaluation allowed discriminating more efficiently the best genotypes, not only for

para materiales no QPM, presenta valores de 0.6 a 0.7). Por esta razón, el criterio utilizado para catalogar a las cruzas simples por su calidad proteínica es relativo (Gutiérrez *et al.*, 2014). La interacción de los alelos involucrados en la calidad proteínica está en función de la acción génica que se genere entre ellos, y de cómo ocurra la transcripción de la característica y de la diversidad genética de las líneas (Schön *et al.*, 2010). La expresión de la calidad proteínica es compleja y, por tanto, esto puede explicar por qué no todas las cruzas destacaron.

Los niveles de lisina y triptófano deben monitorearse mientras se generan genotipos nuevos y es importante señalarlo, porque se puede o no obtener un material con el genotipo *o2o2* con niveles de lisina y triptófano iguales a los del maíz de endospermo normal. Por ello, la evaluación de cruzas sobresalientes en lisina y triptófano de este estudio debería seguir, bajo condiciones de aislamiento total, para comprobar si se pueden denominar QPM.

Este tipo de evaluaciones permitió discriminar de manera más eficiente los genotipos mejores, no solo por su rendimiento sino también por calidad nutricional. La calidad de la materia prima debe enfatizarse, y tener en consideración que con rendimiento menor se pueden obtener granos más nutritivos; por tanto, se debe pensar en un equilibrio entre el rendimiento y la calidad.

CONCLUSIONES

La interacción genotipo-ambiente permitió identificar los genotipos mejores en cada ambiente por su rendimiento, calidad comercial y calidad de proteína. Las cruzas más productivas también fueron las de calidad comercial mejor, aunque la calidad de proteína fue baja. Los híbridos del CEVAMEX fueron menos productivos, aunque mostraron porcentaje de proteína mayor y calidad nutricional mejor.

Los genotipos de grano pequeño (72%) predominaron y solo cinco cruzas presentaron granos de tamaño mediano y cumplieron con las especificaciones de la norma NMX-FF-034/1-SCFI-2002, para maíces destinados al proceso de nixtamalización.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT: IT201618,

their yield but also for their nutritional quality. It is necessary to emphasize the quality of the raw material and to consider that with lower yields it is possible to obtain more nutritious grain. Therefore, a balance between yield and quality should be considered.

CONCLUSIONS

The study of the interaction genotype-environment allowed identification of the best genotypes in each environment by their yield, commercial quality and protein quality. The most productive crosses were also those of better commercial quality, although protein quality was low. The CEVAMEX hybrids were less productive, although they had higher percentages of protein and better nutritional quality.

The small-grained genotypes predominated (72%), and only five crosses had medium-sized grain and met the specifications of the norm NMX-FF-034/1-SCFI-2002 for maize destined to lime water softening process.

—End of the English version—

---*---

UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km 2.5. Cuautitlán Izcalli, estado de México. CP. 54714. AP. 25. Tel. 01 55 56231971.

LITERATURA CITADA

- AACC (American Association of Cereal Chemistry). 2000. Approved Methods of the AACC, 16th. The Association: St. Paul, MN. USA. 1200 p.
- Billeb S., A. C., and R. Bressani. 2001. Características de cocción por nixtamalización de once variedades de maíz. Arch. Latinoam. Nutr. 51: 86-94.
- Canales I., E., R. Tadeo M., J. Mejía C., J. García Z., y A. Espinosa C. 2017. Semilla fértil y androestéril de maíz bajo diferentes densidades de población. Ecosist. Rec. Agropec. 4: 465-473.
- CNVV (Catálogo Nacional de Variedades Vegetales). 2018. Tercer trimestre. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. México, Ciudad de México. 42 p.
- Coutiño E., B., G. Vázquez C., y D. Rincón E. 2018. V56AC, primera variedad de maíz (*Zea mays* L.) olotón QPM para los Altos de Chiapas. Acta Fitogenética. 5: 62.

- Coutiño E., B., y G. Vázquez C. 2018. V238AC: nueva variedad de maíz de grano amarillo QPM. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9: 1089-1092.
- Dei, H. K. 2017. Assessment of maize (*Zea mays* L.) as feed resource for poultry. *Poultry Sci.* InTech. pp: 1-32. <https://www.intechopen.com/books/poultry-science/assessment-of-maize-zea-mays-as-feed-resource-for-poultry>. (Consulta: junio 2016).
- Espinosa C., A., N. Gómez M., M. Sierra M., F. Caballero H., B. Coutiño E., A. Palafox C., F. Rodríguez M., A. García B., C. Cano, y E. Betanzos M. 2005. Variedades e híbridos de maíz de calidad proteínica en México, *Rev. Cienc. Desarrollo. CONACYT. México.* 10 p. <https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php/component/content/article/7/22-variedades-e-hibridos-de-maiz-de-calidad-proteinica-en-mexico.html>. (Consulta: mayo 2016).
- FIRA. 2015. Panorama agroalimentario. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2015.pdf. (Consulta: abril 2016).
- Gutiérrez H., G. F., J. L. Arellano V., M. Vázquez R. J., E. García R., P. Vázquez L., y E. Flores G. 2014. Formación de híbridos de maíz con calidad proteica: lisina, triptófano e índice de calidad. *Rev. Fac. Agron.* 31: 171-189.
- López L., C., M. Tadeo R., A. Espinosa C., J. García Z., I. Benítez R., M. Vázquez C., y J. Carrillo S. 2017. Productividad de cruza simples de maíz con calidad de proteína en Valles Altos de México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 8: 559-570.
- Mittelman A., F. Miranda J., B., M. Mello G., J., L. Hara C., K. Takao R., T. 2003. Potential of the ESA23B maize population for protein and oil content improvement. *Scientia Agrícola.* 60: 319-327.
- Noriega G., L., A. E. Preciado O., R., E. Andrio E., A. Terrón I., y J. Covarrubias P. 2011. Fenología, crecimiento y sincronía floral de los progenitores del híbrido de maíz QPM H-374C. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2: 489-500.
- Nurit E., A. Tiessen, V. Pixley K., and N. Palacios R. 2009. Reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7233-7238.
- Nuss E. T., and A. Tanumihardjo S. 2011. Quality protein maize for Africa: Closing the protein inadequacy gap in vulnerable populations. *Adv. Nutr.* 2: 217-224.
- Sahagún J. 1998. Evaluaciones genotípicas en series de experimentos. *Germen* N°. 14. Sociedad Mexicana de Fitogenética 40 p.
- Sala R., G., F. Andrade H., and M. Westgate E. 2007. Maize kernel moisture at physiological maturity as affected by source-sink relationship during grain filling. *Crop Sci.* 47: 709-714.
- SAS Institute Inc. 2002. *Statistical Analysis System User's Guide.* SAS Institute. Cary, USA. 956 p.
- SE (Secretaría de Economía). 2002. NMX-FF-034/1-SCFI-2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano Cereales-Parte I: Maíz blanco para proceso alcalino para tortillas de maíz y productos de maíz nixtamalizado-Especificaciones y métodos de prueba. Dirección General de Normas. México, D. F. 18 p.
- Schön C., C., S. Dhillon B., F. Utz H., and E. Melchinger A. 2010. High congruency of QTL positions for heterosis of grain yield in three crosses of maize. *Theor. Appl. Genet.* 120: 321-332.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consulta: junio 2017)
- Tsai C., Y., A. Dalby, and A. Jones R. 1975. Lysine and tryptophan increase during germination of maize seed. *Cereal Chem.* 52: 356-360.
- Twumasi A. S., N. Palacios R., D. Friesen, A. Teklewold, D. Wegary, H. De Groote, and M. Prasanna, B. 2016. Guidelines for the quality control of quality protein maize (QPM) seed and grain. CIMMYT: Addis Ababa, Ethiopia. 45 p
- Vasal S., K., E. Villegas, M. Bjarnason, B. Gelaw, and P. Goerts. 1980. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm Opaque-2 materials. *In: Pollmer, W. G., and R. H. Phipps (eds). Improvement of Quality Traits of Maize for Grain and Silage Use.* Martinus Mijhoff Publishers. Amsterdam, Holland. pp: 37-73.
- Vázquez C., M. G., L. Arellano V., J., y D. Santiago R. 2014. Rendimiento y calidad de grano y tortilla de maíces híbridos de Valles Altos de México crecidos en riego y temporal. *Rev. Fitotec. Mex.* 38: 75-83.
- Vázquez C., M. G., H. Mejía A., Y. Salinas M., y D. Santiago R. 2013. Efecto de la densidad de población en la calidad del grano, nixtamal y tortilla de híbridos de maíz de alta calidad proteínica. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 225 - 232.
- Vázquez C., M. G., H. Mejía A., C. Tut C., y N. Gómez M. O. 2012. Características de granos y tortillas de maíces de alta calidad proteínica desarrollados para los Valles Altos centrales de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 35: 23-31.
- Villegas E., E. Ortega, y E. Bauer. 1984. Métodos químicos usados en el CIMMYT para determinar la calidad de proteína de los cereales. México, D.F.: CIMMYT. 29 p.
- Vivek B., S., F. Krivanek A., N. Palacios R., S. Twumasi A., y O. Diallo A. 2008. Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM. México, D.F.: CIMMYT. 56 p.

RESULTADOS DEL PROGRAMA PROAGRO PRODUCTIVO EN LAS REGIONES DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

RESULTS OF THE PROGRAM PROAGRO PRODUCTIVO IN THE REGIONS OF THE STATE OF VERACRUZ, MEXICO

Mario Alejandro **Hernández-Chontal**¹, Felipe **Gallardo-López**¹, María Magdalena **Villarreal-Martínez**²,
Cesáreo **Landeros-Sánchez**¹, Gustavo **López-Romero**¹

¹Agroecosistemas Tropicales. Campus Veracruz. Colegio de Postgraduados 91700. Xalapa-Veracruz, México, (felipegl@colpos.mx). ²Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social-Occidente, Avenida España 1359, Moderna. 44190. Guadalajara, Jalisco.

RESUMEN

La discusión acerca de logros y resultados de la aplicación de los programas gubernamentales es relevante desde una perspectiva del aprendizaje institucional. El resultado de este ejercicio es materia prima para rediseñar programas en operación o diseñar nuevos. El objetivo de este estudio fue analizar la distribución de los beneficiarios, los montos de apoyo, así como la superficie apoyada y su heterogeneidad productiva, con los datos de operación del programa gubernamental PROAGRO Productivo para las regiones del estado de Veracruz, México. El número de beneficiarios, los montos de apoyo y la superficie sembrada del año inicial (2014) al final (2018), se analizaron con base en el padrón oficial de beneficiarios del programa. A través de análisis multivariados (dendrograma y k-medias) se encontró: una disminución del presupuesto y número de beneficiarios de 2014 a 2018, la agrupación de cinco tipos de municipios con niveles muy altos, altos, medio, bajo y muy bajo de acuerdo con el número de beneficiarios, montos de apoyo y superficie apoyada; distribuidos de forma heterogénea en las diferentes regiones del estado, pero con mayor presencia de agricultores en el estrato autoconsumo (A), seguido de transición (T) y en menor proporción comercial (C), con apoyos a diferentes tipos de cultivos y cantidad de superficie incentivada por región. El desempeño del programa fue a la baja en términos de montos y superficie apoyada, de manera que no logró cumplir sus objetivos. Una reflexión sobre las categorías utilizadas para estratificar a los agricultores queda como paso siguiente, así como rediseñar un esquema nuevo de evaluación en el cual los beneficiarios sean los protagonistas principales.

Palabras clave: PROAGRO Productivo, desarrollo rural, evaluación de políticas.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 1091-1107. 2020.

ABSTRACT

The discussion about achievements and results of the application of government programs is relevant from an institutional learning perspective. The result of this exercise is the basis for redesigning programs in operation or designing new ones. The objective of the present study was to analyze the distribution of the beneficiaries, the support provided, as well as the area supported and its productive heterogeneity with the operation data of the government program PROAGRO Productivo, for the regions of the state of Veracruz, Mexico. The number of beneficiaries, the support provided and the area sown from the initial year (2014) to the end (2018) were analyzed based on the program's official list of beneficiaries. Through multivariate analysis (dendrogram and k-means) we found: a lower budget and number of beneficiaries from 2014 to 2018, the grouping of five types of municipalities with very high, high, medium, low and very low levels regarding the number of beneficiaries, support provided and area supported. Their distribution was heterogeneous in the different regions of the state, but with a greater presence of farmers in the self-consumption stratum (A), followed by transition (T) and to a lesser extent commercial (C), with support for different types of crops and extension of the area promoted by region. The program performance went downwards in terms of support provided and area supported, so that it failed to meet its objectives. The next step would be a reflection on the categories used to stratify farmers, as well as redesigning a new evaluation scheme in which the beneficiaries may have a leading role.

Key words: Program PROAGRO Productivo, rural development, policy evaluation.

INTRODUCCIÓN

En las cuatro décadas recientes, la agricultura mexicana se ha caracterizado por la baja capacidad de oferta para satisfacer la demanda interna de alimentos, un desarrollo pobre de los mercados, niveles de ingresos bajos para la mayoría de los productores y reformas al sector agrícola determinadas por la estabilización y la reforma estructural de la economía y no por las necesidades reales del sector agropecuario (Sánchez, 2014). Otro aspecto es el hecho de que las políticas agropecuarias están insertas en la política de desarrollo rural en el marco de La Ley de Desarrollo Rural Sustentable (LDRS), en la ley reglamentaria del Artículo 27 de la Constitución y en el Programa Especial Concurrente (PEC), como instrumento de la LDRS, el cual debe articular el conjunto de acciones de todas las entidades que participan en el desarrollo del medio rural, donde el gasto público rural se orienta de manera creciente a la atención de urgencias sociales (Gómez, 2016).

Una de las principales herramientas de política agrícola en México fue el programa PROCAMPO, el cual operó de 1993 a 2013. Este programa se caracterizó por una asignación presupuestal alta y por tener el número mayor de población rural atendida en un contexto de pobreza, pérdida de auto abasto, migración y productividad baja (Piñera *et al.*, 2016). En 2014 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) formalizó la transición de PROCAMPO Productivo a PROAGRO Productivo (dentro del Programa de Fomento a la Agricultura). La principal diferencia de la transición fue que los incentivos de PROAGRO Productivo se debían dirigir a mejorar la productividad agrícola y los beneficiados estaban obligados a manifestar y acreditar, en los Centros de Apoyo al Desarrollo Rural (CADER), el destino de los incentivos recibidos en conceptos relacionados con aspectos técnicos, productivos, organizacionales y de inversión en función de su estrato y condiciones regionales (SAGARPA, 2014a). De esta forma PROAGRO se convirtió en uno de los programas más relevantes por el presupuesto asignado (14.1 mil millones de MXN pesos, 702.51 millones USD dólares) en 2014 y con una cobertura de alrededor de 2.6 millones de productores al año (Echánove, 2015).

Después de cuatro años de operación, junto con el cambio de gobierno actual, PROAGRO productivo dejó

INTRODUCTION

In the last four decades, Mexican agriculture has been characterized by a low supply capacity to satisfy domestic demand for food, poor market development, low income levels for most farmers, and reforms to the agricultural sector determined by stabilization and structural reform of the economy, and not as a result of the real needs of the agricultural sector (Sánchez, 2014). In addition, agricultural policies are inserted in the rural development policy within the framework of the Sustainable Rural Development Law (LDRS, its acronym in Spanish), in the regulatory law of Article 27 of the Constitution and in the Concurrent Special Program (PEC, its acronym in Spanish), as an instrument of the LDRS. It is meant to articulate the set of actions of all the entities that participate in the development of the rural environment, where rural public spending is increasingly oriented to the care of social emergencies (Gómez, 2016).

One of the main tools of agricultural policy in Mexico was the PROCAMPO program, which operated from 1993 to 2013. The program was characterized by a high budget allocation, and the largest number of rural population served in a context of poverty, self-supply loss, migration and low productivity (Piñera *et al.*, 2016). In 2014, the Ministry of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food (SAGARPA, its acronym in Spanish) made the transition from PROCAMPO Productivo to PROAGRO Productivo (within the Program for the Promotion of Agriculture). The main difference within the transition was that the PROAGRO Productivo incentives were aimed at improving agricultural productivity and the beneficiaries obliged to state and certify, in the Rural Development Support Centers (CADER, its acronym in Spanish), the destination of the incentives received related to technical, productive, organizational and investment aspects, depending on their stratum and regional conditions (SAGARPA, 2014a). In this way, PROAGRO became one of the most relevant programs due to the budget allocated (14.1 billion MXN pesos, 702.51 million USD dollars) in 2014 and a coverage of around 2.6 million farmers per year (Echánove, 2015).

After four years of operation, together with the government change, PROAGRO Productivo

de operar. El 31 de octubre de 2018 la SAGARPA publicó una nota en su página web, titulada “PROAGRO productivo un logro estratégico de productividad”, la que indicó que se había posicionado como el componente estratégico del sector gracias a su visión orientada a incentivar la productividad, y esto implicó: 1) una superficie nacional cultivable de 22.1 millones ha en el país y alrededor de 11 millones ha incentivadas en tres millones de predios; 2) adquisición de semillas mejoradas (10.7%) por los productores, fertilizantes, abonos, correctores y sustratos (29.5%), mano de obra (27%), adquisición de yunta, maquinaria, equipo e implementos agrícolas (22.3%) y otros (10.5%); y 3) se incentivó la productividad del 52% de la superficie cultivable del país (SAGARPA, 2018).

Estos resultados oficiales no son contundentes para demostrar el logro de los objetivos del programa en términos de resultados e impactos, sobre todo al considerar que los propósitos de producción de los productores que, al final, son a quienes se quiere contribuir, están dentro de una gran gama de tipos de productores que va desde productores capitalistas con vocación para exportación (Fiscal *et al.*, 2017), ingresos altos, granjas de gran escala, uso sustancial de insumos y extensiones grandes de posesión de tierras (Ibarrola-Rivas y Galicia, 2017), hasta pequeños productores de ingresos bajos con granjas de pequeña escala y uso bajo de insumos agrícolas, productividad baja y minifundios (ejidatarios, propietarios privados, comuneros y posesionarios que poseen hasta 5 ha) (FAO, 2018).

Lo anterior se acentúa más en espacios con una gran heterogeneidad territorial y productiva debido a una gama de condiciones agroecológicas y socioeconómicas como es el caso del estado de Veracruz (CONABIO, 2011). Algunos territorios de este estado se caracterizan por cultivos de maíz y frijol realizados por pequeños productores minifundistas de temporal, que aplican técnicas agrícolas tradicionales con base en el trabajo familiar y el uso de la energía humana y animal, con saberes y conocimientos ancestrales aún relevantes (Muñoz *et al.*, 2017). Además de otras regiones donde la práctica de la agricultura no se debe a cultivos comerciales rentables y se mantiene la actividad agrícola porque los trabajos urbanos a los que se tienen acceso son inestables y con salarios bajos (Thiébaud y Velázquez, 2017).

Por lo anterior, este estudio discute los logros y resultados del programa PROAGRO Productivo en

stopped operating. On October 31, 2018, SAGARPA published a note on its website, entitled “PROAGRO productivo, a strategic achievement of productivity”, which indicated that it had positioned itself as the strategic component of the sector thanks to its vision aimed at encouraging productivity; this involved: 1) a national arable area of 22.1 million ha in the country and around 11 million ha incentivized in three million farms; 2) acquisition of improved seeds (10.7%) by farmers, fertilizers, correctors and substrates (29.5%), labor (27%), acquisition of yunta, machinery, equipment and agricultural implements (22.3%) and others (10.5%); and 3) the productivity of 52% of the country’s arable area was incentivized (SAGARPA, 2018).

These official results are not conclusive to demonstrate the achievement of the program’s objectives in terms of results and impacts. Especially if we consider that the production purposes of farmers, who are ultimately those who are meant to be supported, make up a wide range of different types. And it ranges from capitalist farmers who intend to export (Fiscal *et al.*, 2017), have high incomes, large-scale farms, substantial use of inputs and possession of large tracts of land (Ibarrola-Rivas and Galicia, 2017), to small low-income farmers with small-scale farms, low use of agricultural inputs, reduced productivity, and smallholdings (ejidatarios, private owners, community members and owners of up to 5 ha) (FAO, 2018).

This is more accentuated in spaces with great territorial and productive heterogeneity due to a variety of agro-ecological and socioeconomic conditions, as is the case in the state of Veracruz (CONABIO, 2011). Some territories in this state are used for cultivating corn and bean crops by rainfed smallholding farmers, who apply traditional agricultural techniques based on family work and the use of human and animal labor, together with ancestral knowledge and practices that are still relevant (Muñoz *et al.*, 2017); as well as other regions where agricultural activity persists not as a result of profitable commercial crops, but because urban jobs which rural workers have access to are unstable and badly paid (Thiébaud and Velázquez, 2017).

Therefore, this study analyzes the achievements and results of the PROAGRO Productivo program in the various regions of the state of Veracruz, as well as their productive heterogeneity. The hypothesis was that the regional diversity and productive

las diversas regiones del estado de Veracruz y analiza su heterogeneidad productiva. La hipótesis fue que la diversidad regional y la heterogeneidad productiva del estado de Veracruz, son factores importantes para definir los alcances de PROAGRO Productivo en términos de resultados e impactos. El objetivo fue analizar la distribución de los beneficiarios, montos de apoyo y superficie apoyada por PROAGRO Productivo, considerando la diversidad regional del estado de Veracruz y su heterogeneidad productiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para conocer la distribución de PROAGRO productivo en el estado de Veracruz, se analizó la situación inicial y final del programa (2014 y 2018). Para ello se tomaron como base los datos del padrón de beneficiarios publicados en la página oficial de la SADER (antes SAGARPA) y las variables analizadas fueron: número de beneficiarios, montos de apoyo y superficie apoyada en hectáreas, considerando los estratos de producción³: autoconsumo (A), transición (T), comercial (C) y los casos fueron los 212 municipios que conforman el estado. Esta información fue del ciclo primavera-verano (PV) para el año inicial (2014) y final (2018) porque en este ciclo se apoya al 83% de la superficie agrícola en México (54% cultivos anuales más 29% perennes) y el 17% restante corresponde al ciclo otoño-invierno (SAGARPA, 2017).

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statistica[®] versión 7 (INC, 2004). Primero se realizó un análisis exploratorio a las bases de datos. Después se aplicaron dos técnicas multivariadas: dendrograma y k-medias (Gallardo-López *et al.*, 2018; Gallardo-López *et al.*, 2019) para identificar grupos de municipios, sus estadísticas descriptivas y sus miembros en relación con la distribución de los estratos de producción.

En los municipios identificados dentro de las diez regiones administrativas del estado de Veracruz (Huasteca Alta, Huasteca Baja, Nautla, Totonaca, Sotavento, Capital, Montaña, Los Tuxtla, Papaloapan y Olmeca), se realizó un análisis regional ya que se utiliza para la planeación regional y considera aspectos geográficos, sociodemográficos y económicos (CONABIO, 2011). Después se calculó la cantidad de superficie incentivada por región y tipos de cultivos para conocer la heterogeneidad productiva. Al final se efectuó una revisión de los informes de resultados oficiales⁴ para

heterogeneity of the state of Veracruz are important factors to define the scope of PROAGRO Productivo in terms of results and impacts. The objective was to analyze the distribution of the beneficiaries, support provided and the area supported by PROAGRO Productivo, considering the regional diversity of the state of Veracruz, especially in its productive capacity.

MATERIALS AND METHODS

To know the distribution of PROAGRO Productivo in the state of Veracruz, we analyzed the initial and final situation of the program (2014 and 2018). For this, we used the data contained on the list of beneficiaries published on Ministry of Agriculture and Rural Development-SADER, its acronym in Spanish (formerly SAGARPA) official website, and the variables analyzed were: number of beneficiaries, support provided, and area in hectares supported, considering the production strata¹: self-consumption (A), transition (T), commercial (C), and the study cases included the 212 municipalities that make up the state. This information corresponds to the spring-summer (PV, its acronym in Spanish) cycle for the initial year (2014) and final year (2018) because this cycle supported 83% of the agricultural area in Mexico (54% annual crops plus 29% perennial); and the remaining 17% corresponds to the autumn-winter cycle (SAGARPA, 2017).

We used Statistica[®] version 7 (INC, 2004) for data analysis. First, we carried out an exploratory analysis of the databases. Then two multivariate techniques were applied: dendrogram and k-means (Gallardo-López *et al.*, 2018; Gallardo-López *et al.*, 2019) to identify groups of municipalities, their descriptive statistics and their members in relation to the distribution of the production strata.

In the municipalities identified within the ten administrative regions of the state of Veracruz (Huasteca Alta, Huasteca Baja, Nautla, Totonaca, Sotavento, Capital, Montaña, Los Tuxtla, Papaloapan and Olmeca), we carried out a regional analysis, since it is used for regional planning, and includes geographical, sociodemographic and economic aspects (CONABIO, 2011). Then we calculated the amount of incentivized area by region and types of crops to determine productive diversity. In the end, we performed a review of the official reports of results² to compare the achievements and results of the program in the different regions of the state of Veracruz.

³Los estratos de producción están en relación con superficie apoyada e importe apoyado. Para el estrato autoconsumo (A) hasta 5 ha, transición (T) más de 5 ha y hasta 20 ha y comercial (C) mayores a 20 ha, con un máximo de apoyo de 80 ha; SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2014b. Cuarto informe trimestral de resultados. SAGARPA Gobierno Federal. México. <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/avances-trimestrales-proagro-2014-2018>. (Consulta: febrero 2019).

⁴Los informes de resultados de los años 2014, 2015, 2016, 2017 y 2018, se consultaron en la página de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, 2019). <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/avances-trimestrales-proagro-2014-2018>. (Consulta: febrero 2019).

comparar los logros y resultados del programa en las regiones distintas del estado de Veracruz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Situación inicial de PROAGRO Productivo en Veracruz

En 2014, 205 de los 212 municipios del estado de Veracruz se beneficiaron por PROAGRO Productivo; un total de 126 831 beneficiarios en padrón, de los cuales 88% pertenecieron al estrato autoconsumo, 11% transición y 1% comercial. Respecto a la concentración de beneficiarios por municipio, el mínimo fue uno y el máximo 5360. El monto total de apoyos, 452 858 052.5 MXN (22 562 882.61 USD), se distribuyó en un 68% para autoconsumo, 25% transición y 7% comercial. El monto de apoyo mínimo por municipio fue 1300.00 MXN (64.77 USD) y el máximo 27 680 932.06 MXN (1 379 155.38 USD). La superficie total apoyada fue 382 229.5 ha en los estratos: 61% autoconsumo, 31% transición y 9% comercial, con municipios desde 1.0 ha de superficie apoyada, hasta máximo 27 435 ha.

De acuerdo con la distribución y consideración de las variables número de beneficiarios (B), montos de apoyo (A) y superficie apoyada (S), se identificaron en el 2014 cinco grupos de municipios (N=205). El primer grupo con un nivel muy alto en las tres variables (MA-BAS), el segundo con un nivel alto (A-BAS), el tercero con un nivel medio (M-BAS), el cuarto con un nivel bajo (B-BAS) y el quinto grupo con un nivel muy bajo en estas mismas (MB-BAS). Por lo tanto, se encontraron municipios de los distintos grupos en las diferentes regiones del estado de Veracruz. Los municipios con superficie territorial menor se asociaron con un número menor de beneficiarios, montos de apoyo y superficie apoyada; lo contrario sucedió con los municipios con superficie territorial mayor (Figura 1).

De los grupos identificados se encontró uno más prolífico por los municipios que lo integran, y los demás con un número menor. Otro aspecto es que los grupos son heterogéneos en relación con los estratos de producción autoconsumo (A), transición (T) y comercial (C) y las tres variables respectivas (Cuadro 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Initial situation of PROAGRO Productivo in Veracruz

In 2014, 205 of the 212 municipalities in the state of Veracruz benefited from PROAGRO Productivo; out of a total of 126,831 beneficiaries in the registry, 88% belonged to the self-consumption stratum, 11% transitional, and 1% commercial. Regarding the number of beneficiaries per municipality, the minimum was one and the maximum 5360. The total support provided amounted to 452 858 052.5 MXN (22 562 882.61 USD); 68% was for self-consumption, 25% transition, and 7% commercial. The minimum amount of support provided per municipality was 1300.00 MXN (64.77 USD), and the maximum 27 680 932.06 MXN (1,379 155.38 USD). The total area covered was 382 229.5 ha in the strata: 61% self-consumption, 31% transition, and 9% commercial, with municipalities from 1.0 ha of area, up to a maximum of 27 435 ha.

According to the distribution and consideration of the variables: number of beneficiaries (B), amounts of support provided (A), and area supported (S), five groups of municipalities were identified in 2014 (N=205). The first group registered a very high level in the three variables (MA-BAS), the second a high level (A-BAS), the third a medium level (M-BAS), the fourth a low level (B-BAS), and the fifth group a very low level (MB-BAS). Therefore, we found municipalities of the different groups in the regions of the state of Veracruz. The municipalities with smaller land area had a smaller number of beneficiaries, lower support provided and area supported; the opposite occurred in the municipalities with a larger land area (Figure 1).

Of the groups identified, one was found to be more prolific because of the municipalities comprising it, while the others recorded lower numbers. Another aspect is that the groups are heterogeneous in relation to the self-consumption (A), transition (T) and commercial (C) production strata, and the three respective variables (Table 1).

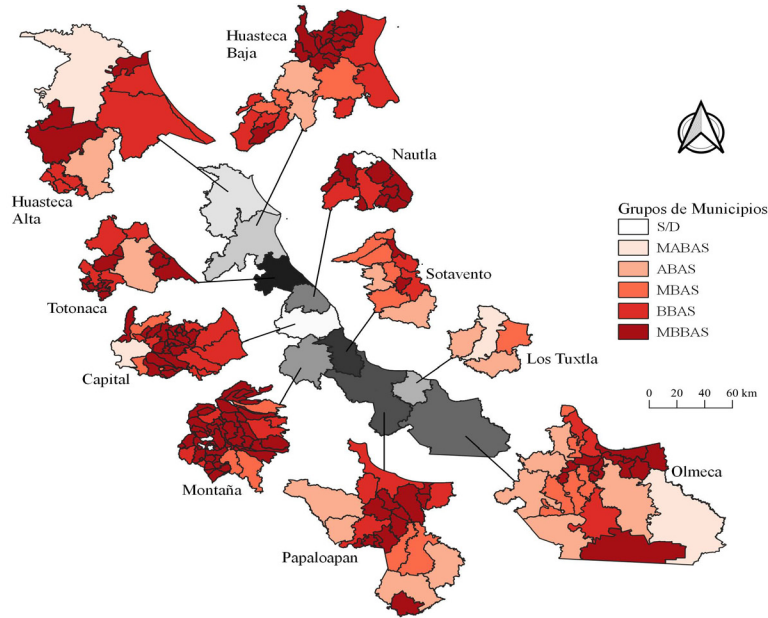


Figura 1. Grupos de municipios y su distribución en las regiones del estado de Veracruz, en 2014 (Fuente: elaborado con datos de SADER, 2019).
Figure 1. Groups of municipalities and their distribution in the regions of the state of Veracruz, in 2014 (Source: prepared with data from SADER, 2019).

Situación final de PROAGRO Productivo en Veracruz

En 2018, 204 de los 212 municipios analizados se beneficiaron y se registraron 89 049 beneficiarios, pertenecientes a los estratos 89% A, 10% T y 1% C. Respecto a la concentración de beneficiarios por municipio, el mínimo fue uno y el máximo 4219. Lo anterior representó un monto total de apoyo de

Final situation of PROAGRO Productivo in Veracruz

In 2018, 204 of the 212 municipalities analyzed benefited and 89,049 beneficiaries were registered, belonging 89% to A, 10% T and 1% C strata. Regarding the number of beneficiaries per municipality, the minimum was one and the maximum 4219. This represented a total support

Cuadro 1. Características de los grupos identificados en relación con los estratos de producción y las variables consideradas.

Table 1. Characteristics of the groups identified in relation to the production strata and the variables included.

Grupo	Municipios	Beneficiarios %			Montos %			Superficie %		
		A	T	C	A	T	C	A	T	C
		----- Media -----			----- Media -----			----- Media -----		
MABAS	4.0	71.0	27.0	2.0	52.0	37.0	11.0	46.0	42.0	12.0
ABAS	17.0	80.0	18.0	1.0	63.0	29.0	8.0	57.0	34.0	9.0
MBAS	20.0	87.0	13.0	1.0	72.0	23.0	5.0	67.0	27.0	6.0
BBAS	40.0	93.0	7.0	0.0	83.0	14.0	3.0	80.0	17.0	4.0
MBBAS	124.0	96.7	3.0	0.3	90.4	7.4	2.3	88.1	9.2	2.7

A: autoconsumo; T: transición; C: comercial; BAS: integra beneficiarios, monto del apoyos, superficie en los niveles, MA: muy alto; A: alto; M: medio; B: bajo; MB: muy bajo. ♦ A: self-consumption; T: transition; C: commercial; BAS: includes beneficiaries, support provided, area in the levels; MA: very high; A: high; M, medium; B: low; MB: very low.

258 143 432.1 MXN (12 861 557.66 USD) para el estado, el cual se distribuyó en 79% para autoconsumo, 19% transición y 2% comercial. El monto de apoyo mínimo por municipio fue 360.00 MXN (17.94 USD) y el monto de apoyo máximo fue 13 249 647.4 MXN (652 319.89 USD). La superficie total apoyada fue 269 294.08 ha y 62% correspondió a autoconsumo, 30% transición y 8% comercial, con municipios desde 3 ha de superficie apoyada hasta un máximo de 19 651 ha.

Para el año 2018 se identificaron también los cinco grupos (MA-BAS, A-BAS, M-BAS, B-BAS y MB-BAS) de acuerdo con la distribución de beneficiarios, montos de apoyo y superficie apoyada (N = 204 municipios). Por consiguiente, los municipios con superficie territorial menor tuvieron un número de beneficiarios menor, con montos de apoyo y superficie apoyada también menores. Lo contrario sucedió con los municipios con mayor superficie territorial. Además, en las regiones se encontraron municipios clasificados en grupos diferentes (Figura 2).

De los grupos identificados se encontró uno más prolífero en cuanto a los municipios que lo integran y los demás con un número menor. Otro aspecto es que los grupos son heterogéneos en relación con los estratos de producción autoconsumo (A), transición (T) y comercial (C) y las tres variables (Cuadro 2).

provided of 258 143 432.1 MXN (12 861 557.66 USD) for the state, which was distributed as follows: 79% for self-consumption, 19% transition and 2% commercial. The minimum support provided per municipality was 360.00 MXN (17.94 USD) and the maximum support was 13 249 647.4 MXN (652 319.89 USD). The total area supported was 269 294.08 ha and 62% corresponded to self-consumption, 30% transition and 8% commercial, with municipalities ranging from 3 ha of area supported to a maximum of 19 651 ha.

For the year 2018, the five groups (MA-BAS, A-BAS, M-BAS, B-BAS, and MB-BAS) were also identified according to the distribution of beneficiaries, support provided and area supported (N=204 municipalities). Consequently, the municipalities with a smaller territorial area had a lower number of beneficiaries, also with less support provided and reduced area supported. The opposite happened in the municipalities with larger land areas. Besides, we found municipalities classified in different groups in the regions (Figure 2).

Of the groups identified, one was found to be more prolific in relation to the municipalities comprising it, while the others recorded lower numbers. Another aspect is that the groups are heterogeneous in relation to the self-consumption (A), transition (T) and

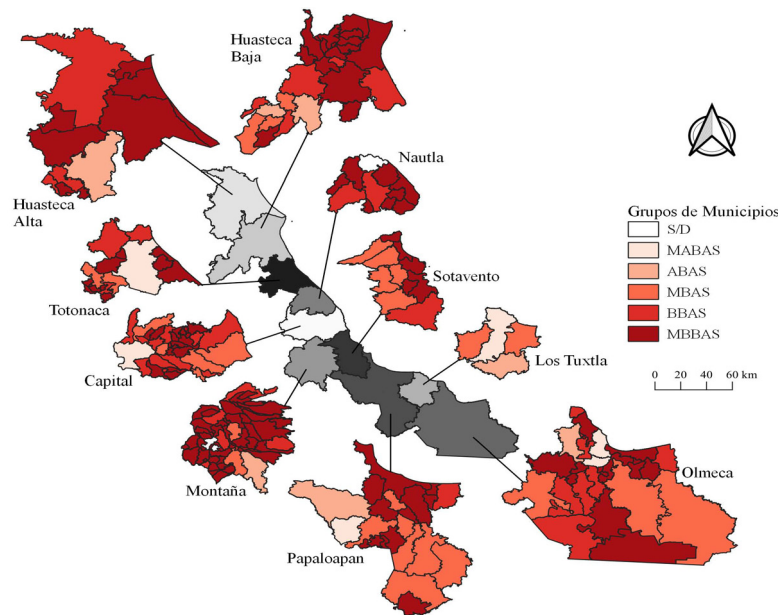


Figura 2. Grupos de municipios y su distribución en las regiones del estado de Veracruz, para el año 2018 (Fuente: elaborado con datos de SADER, 2019).

Figure 2. GROUPS of municipalities and their distribution in the regions of the state of Veracruz, in 2018 (Source: data from SADER, 2019).

Cuadro 2. Características de los grupos identificados en relación con los estratos de producción y las variables consideradas.**Table 2. Characteristics of the groups identified in relation to the production strata and the variables considered.**

Grupo	Municipios	Beneficiarios %			Montos %			Superficie %		
		A	T	C	A	T	C	A	T	C
		----- Media -----			----- Media -----			----- Media -----		
MABAS	6	77	21	2	68	29	3	56	33	10
ABAS	7	90	10	0	85	14	1	75	22	3
MBAS	29	86	14	1	79	20	2	67	28	6
BBAS	37	93	7	0	90	10	1	81	15	3
MBBAS	124	95.4	4.5	0.2	90.3	9	0.7	85.5	12.6	2

A: autoconsumo; T: transición; C: comercial; BAS: integra beneficiarios, monto del apoyos, superficie en los niveles, MA: muy alto; A: alto; M: medio; B: bajo; MB: muy bajo. ♦ A: self-consumption; T: transition; C: commercial; BAS: includes beneficiaries, support provided, area in the levels; MA: very high; A: high; M: medium; B: low; MB: very low.

De 2014 a 2018, disminuyó el monto de apoyo, número de beneficiarios y por lo tanto la superficie apoyada. Estos cambios se reflejaron en la distribución con relación a las tres variables de los años analizados. También se encontraron cambios en la proporción de los estratos de producción, el porcentaje de beneficiarios del estrato A disminuyó de 2014 a 2018, pero los estratos T y C tuvieron un comportamiento similar en ambos años.

Heterogeneidad regional y productiva

De acuerdo con la base de datos de PROAGRO Productivo del 2018 (el último año que operó), se encontró el registro de 115 cultivos diferentes y con base en la superficie total sembrada en el estado (269 294.08 ha), los diez cultivos principales sembrados fueron: maíz (*Zea mays* L. 54.24%), pastos perennes (19.61%), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L. 10.61%), naranja (*Citrus sinensis* L. 3.70%), soya (*Glycine max* L. 1.95%), sorgo (*Sorghum bicolor* L. 1.91%), piña (*Ananas comosus* L. 1.91%), maíz con cualquier otro cultivo anual (0.74%), limón (*Citrus limon* L. 0.66%) y café (*Coffea arabica* L. 0.58%).

En la región Montaña se sembraron 30 cultivos diferentes en 8.26% de la superficie total incentivada por PROAGRO Productivo. Los municipios se caracterizaron en su mayoría por un nivel MB-BAS (Figura 2). Los agricultores recibieron poco dinero desde el programa y sembraron cultivos en superficies menores a 5.0 ha. Los cultivos se distribuyeron

commercial (C) production strata, and the three variables (Table 2).

From 2014 to 2018, the support provided, number of beneficiaries and the area supported decreased. These changes were reflected in the distribution in relation to the three variables of the years analyzed. Changes were also found in the proportion of the production strata; the percentage of beneficiaries of stratum A decreased from 2014 to 2018, but strata T and C had a similar behavior in both years.

Regional and productive heterogeneity

According to the PROAGRO Productivo database of 2018 (its last year of operation), the registry of 115 different crops was found, and based on the total area planted in the state (269 294.08 ha), the ten main crops planted were: corn (*Zea mays* L. 54.24%), perennial grasses (19.61%), sugar cane (*Saccharum officinarum* L. 10.61%), orange (*Citrus sinensis* L. 3.70%), soy (*Glycine max* L. 1.95%), sorghum (*Sorghum bicolor* L. 1.91%), pineapple (*Ananas comosus* L. 1.91%), corn with any other annual crop (0.74%), lemon (*Citrus limon* L. 0.66%) and coffee (*Coffea arabica* L. 0.58%).

In the Montaña region, 30 different crops were planted in 8.26% of the total area promoted by PROAGRO Productivo. Most municipalities recorded a MB-BAS level (Figure 2). Farmers received little money from the program and planted crops in areas smaller than 5.0 ha. The crops were distributed as follows: 1) 98.26% for corn (83.68%), sugar cane

así: 1) 98.26% para maíz (83.68%), caña de azúcar (5.19%), maíz/cualquier otro cultivo anual (5.07%), café (2.34%) y pastos perennes (1.97%); 2) 1.33% para caña de azúcar industrial (*Saccharum officinarum* L.), plantaciones forestales, café robusta (*Coffea canephora* P.), limón, hule hevea (*Hevea brasiliensis* M.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); y 3) 0.40% para cultivos de pastos anuales, otros perennes, avena (*Avena sativa* L.), flores tropicales, sorgo, reforestación con especies maderables en zonas de clima templado-frío, papa/papa por semilla (*Solanum tuberosum* L.), plátano (*Musa paradisiaca* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), chayote (*Sechium edule*), ejote (*Phaseolus vulgaris* L.), otros frutales, plátano morado (*Musa acuminata*), reforestación y revegetación, alfalfa (*Medicago sativa* L.), epazote (*Dysphania ambrosioides* L.), reforestación con especies arbóreas en zonas áridas y semiáridas, aguacate (*Persea americana* M.) y algodón (*Gossypium hirsutum*).

En la Región Papaloapan la superficie sembrada abarcó 16.29% del total incentivado, fue una de las regiones con mayor proporción y se distribuyó así: 1) 98.01% para caña de azúcar (43.24%), maíz (27.38%), pastos perennes (15.90%) y piña (11.48%); y 2) 1.62% para limón persa (*Citrus latifolia* T.), arroz (*Oryza sativa* L.), limón (*Citrus limon* L.), hule hevea; 3) 0.36% para frijol, sorgo, plátano, toronja (*Citrus paradisi* M.), sandía (*Citrullus lanatus* T.), cebolla/cebollín (*Allium fistulosum* L.), yuca (*Manihot esculenta* C.), litchi (*Litchi chinensis* L.), pastos anuales, plantaciones forestales, maíz forrajero (*Zea mays* L.), plátano macho, caña de azúcar industrial y mango (*Mangifera indica* L.).

En total se sembraron 22 cultivos diferentes. Los municipios se caracterizaron por un nivel M-BAS y B-BAS (Figura 2).

En la Región Capital la superficie sembrada abarcó 11.17% del total de la superficie sembrada incentivada y se distribuyó así: 1) 96.27% para cultivo de maíz (80.48%), plantaciones forestales (2.86%), maíz/cualquier otro cultivo anual (2.73%), pastos perennes (2.55%), frijol (1.87%), café (1.59%), haba (*Vicia faba* L. 1.56%), papa/papa semilla (1.55%) y limón persa (1.03%); 2) 2.72% para caña de azúcar, papa alpha (*Solanum tuberosum* L.), piñón (*Jatropha curcas* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), limón, calabaza pipian (*Cucurbita argyrosperma* H.), otros perennes, plantaciones agroforestales, alfalfa y papa criolla (*Solanum phureja*); y 3) 0.99% para chayote,

(5.19%), corn/any other annual crop (5.07%), coffee (2.34%) and perennial pastures (1.97%); 2) 1.33% for industrial sugar cane (*Saccharum officinarum* L.), forest plantations, robusta coffee (*Coffea canephora* P.), lemon, rubber hevea (*Hevea brasiliensis* M.) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.); and 3) 0.40% for annual pasture crops, other perennials, oats (*Avena sativa* L.), tropical flowers, sorghum, reforestation with timber species in temperate-cold climate zones, potato/potato per seed (*Solanum tuberosum* L.), banana (*Musa paradisiaca* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), chayote (*Sechium edule*), green bean (*Phaseolus vulgaris* L.), other fruit trees, purple banana (*Musa acuminata*), reforestation and revegetation, alfalfa (*Medicago sativa* L.), epazote (*Dysphania ambrosioides* L.), reforestation with tree species in arid and semi-arid zones, avocado (*Persea americana* M.) and cotton (*Gossypium hirsutum*).

In the Papaloapan Region, the planted area covered 16.29% of the total area promoted; it was one of the largest regions and was distributed as follows: 1) 98.01% for sugar cane (43.24%), corn (27.38%), perennial pastures (15.90%) and pineapple (11.48%); and 2) 1.62% for Persian lemon (*Citrus latifolia* T.), rice (*Oryza sativa* L.), lemon (*Citrus limon* L.), rubber hevea; 3) 0.36% for beans, sorghum, banana, grapefruit (*Citrus paradisi* M.), watermelon (*Citrullus lanatus* T.), onion/chives (*Allium fistulosum* L.), cassava (*Manihot esculenta* C.), litchi (*Litchi chinensis* L.), annual grasses, forest plantations, forage corn (*Zea mays* L.), male plantain, industrial sugar cane and mango (*Mangifera indica* L.).

In all, 22 different crops were planted. The municipalities registered the M-BAS and B-BAS levels (Figure 2).

In the Capital Region, the sown area covered 11.17% of the total incentivized sown area and was distributed as follows: 1) 96.27% for corn cultivation (80.48%), forest plantations (2.86%), corn/any other annual crop (2.73%), perennial grasses (2.55%), beans (1.87%), coffee (1.59%), broad bean (*Vicia faba* L. 1.56%), potato/seed potato (1.55%) and Persian lemon (1.03%); 2) 2.72% for sugarcane, alpha potato (*Solanum tuberosum* L.), pine nut (*Jatropha curcas* L.), carrot (*Daucus carota* L.), lemon, pipian squash (*Cucurbita argyrosperma* H.), other perennials, agroforestry plantations, alfalfa and Creole potato (*Solanum phureja*); and 3)

sandía, brócoli (*Brassica oleracea*), maracuyá (*Passiflora edulis* S.), trigo (*Triticum aestivum* L.), pastos anuales, zapote chico/chico zapote (*Manilkara zapota* L.), durazno (*Prunus persica* L.), manzana (*Malus domestica*), maíz blanco (*Zea mays* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate saladette (*Solanum lycopersicum* L.), tomate (*Physalis philadelphica*), mango, zapote (*Pouteria sapota* J.), mango manila (*Mangifera indica* L.), avena, arvejón (*Pisum sativum* L.), otros frutales, cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), ebo/veza (*Vicia sativa* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), ajo (*Allium sativum* L.), reforestación y revegetación, chícharo (*Pisum sativum* L.), sábila (*Aloe vera* L.), papaya (*Carica papaya* L.), guanábana (*Annona muricata* L.), aguacate Hass (*Persea americana* M.), calabacita castilla (*Cucurbita argyrosperma*), café típico (*Coffea arabica* L.), plátano macho (*Musa balbisiana* L.), maíz amarillo (*Zea mays* L.), higo (*Ficus carica* L.), nopal criollo (*Opuntia ficus-indica*), caña de azúcar (*S. officinarum* L.) fruta marañón (*Anacardium occidentale* L.), chile poblano, ciruela (*Prunus domestica* L.) y garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

Con base en lo anterior, esta región fue la más diversa pues se sembraron 61 cultivos diferentes. Los municipios se caracterizaron por un nivel MBAS y MBBAS (Figura 2).

La Región Sotavento abarcó 9.45% de la superficie sembrada distribuida así: 1) 96.35% para maíz (50.21%), pastos perennes (33.43%), caña de azúcar (11.55%) y papaya (1.14%); 2) 2.64, para limón, pastos anuales, arroz, piña, frijol, calabaza pipián y papaya marado; y 3) 1%, para sandía, maíz forrajero, piña cayena lisa, limón persa, maíz, pastos perennes, caña de azúcar, papaya, limón, plátano, mango, sorgo, piña esmeralda, naranja, camote (*Ipomoea batatas* L.), pepino, plátano manzano, ciruela, otros perennes, zapote, agave (*Agave americana* L.), caña de azúcar fruta, guanábana, tangerina (*Citrus reticulata* B.), cacahuete, maíz blanco, palma (coco, copra, dátil, palmataco) y ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). En total se sembraron 39 cultivos diferentes.

Los municipios se caracterizaron por un nivel BBAS y MBBAS (Figura 2).

La Región Olmeca tuvo una mayor superficie incentivada (comparada con las otras regiones) en el estado, con 17.98% y distribuida así: 1) 96.11%, para maíz (55.05%), pastos perennes (37.93%), palma (coco, copra, dátil, palmataco) (3.12%); 2) 3.21%

0.99% for chayote, watermelon, broccoli (*Brassica oleracea*), passion fruit (*Passiflora edulis* S.), wheat (*Triticum aestivum* L.), annual grasses, small sapote/small sapote (*Manilkara zapota* L.), peach (*Prunus persica* L.), apple (*Malus domestica*), white corn (*Zea mays* L.), cucumber (*Cucumis sativus* L.), saladette tomato (*Solanum lycopersicum* L.), tomato (*Physalis philadelphica*), mango, sapote (*Pouteria sapota* J.), manila mango (*Mangifera indica* L.), oats, pea (*Pisum sativum* L.), other fruit trees, peanut (*Arachis hypogaea* L.), ebo/vetch (*Vicia sativa* L.), chili (*Capsicum annuum* L.), amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.), garlic (*Allium sativum* L.), reforestation and revegetation, pea (*Pisum sativum* L.), aloe (*Aloe vera* L.), papaya (*Carica papaya* L.), soursop (*Annona muricata* L.), Hass avocado (*Persea americana* M.), squash (*Cucurbita argyrosperma*), typical coffee (*Coffea arabica* L.), male plantain (*Musa balbisiana* L.), yellow corn (*Zea mays* L.), fig (*Ficus carica* L.), Creole nopal (*Opuntia ficus-indica*), sugar cane (*S. officinarum* L.) fruit cashew (*Anacardium occidentale* L.), poblano pepper, plum (*Prunus domestica* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.).

Therefore, this region was the most varied as 61 different crops were planted. The municipalities were characterized by a MBAS and MBBAS level (Figure 2).

The Sotavento region covered 9.45% of the sown area distributed as follows: 1) 96.35% for corn (50.21%), perennial pastures (33.43%), sugar cane (11.55%) and papaya (1.14%); 2) 2.64, for lemon crops, annual grasses, rice, pineapple, beans, pipián squash and papaya marado; and 3) 1% for watermelon, fodder corn, smooth cayenne pineapple, Persian lemon, corn, perennial grasses, sugar cane, papaya, lemon, banana, mango, sorghum, emerald pineapple, orange, sweet potato (*Ipomoea batatas* L.), cucumber, apple banana, plum, other perennials, sapote, agave (*Agave americana* L.), sugar cane fruit, soursop, tangerine (*Citrus reticulata* B.), peanut, white corn, palm (coconut, copra, date, palmataco), and sesame (*Sesamum indicum* L.).

In all, 39 different crops were planted. The municipalities exhibited a BBAS and MBBAS level (Figure 2).

The Olmec Region had a larger incentivized area (compared to the other regions) in the state, with 17.98% and distributed as follows: 1) 96.11% for corn (55.05%), perennial pastures (37.93%), palm (coconut, copra, date, palmataco) (3.12%); 2) 3.21%

para caña de azúcar, sorgo, hule, hevea, naranja, café, maíz forrajero, palma de aceite (*Elaeis guineensis* J.), arroz y limón; y 3) 0.66% para pastos anuales, otros pastos perennes, calabaza pipian, plantaciones forestales, maíz blanco, maíz/cualquier otro cultivo anual, piña, limón persa, papaya, litchi, establecimiento de pastizales, plátano, cereza (*Prunus cerasus* L.), naranja valencia, melón valenciano/honey dew (*Cucumis melo* L.), frijol, yuca, café robusta (*Coffea canephora* P.), papaya maradol, reforestación y revegetación.

Los municipios se caracterizaron por un nivel MBAS, BBAS y MBBAS (Figura 2).

La Región Huasteca Baja abarcó 9.92% de la superficie sembrada incentivada y se distribuyó así: 1) 97.02% para maíz (70.71%), naranja (18.86%) y pastos perennes (7.44%); 2) 2.55% para frijol, plantaciones forestales, cítricos dulces, avena y mandarina (*Citrus reticulata* B.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), caña de azúcar, café; y 3) 0.41% para litchi, toronja, ebo/veza, plátano, trigo, naranja valencia, café típico, maíz forrajero, calabaza pipián, sistema agroforestal, aguacate, chile, durazno, plantaciones agroforestales, cacahuate, limón, maguey aguamiel (*Agave salmiana* L.), otros perennes, plátano macho y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.).

Los municipios se caracterizaron por un nivel BBAS y MBBAS (Figura 2) de agricultores que tenían superficies cultivables iguales o menores a 5 ha.

La Región Huasteca Alta tuvo 11.43% del total de la superficie sembrada y se distribuyó así: 1) 98.64% para maíz (29.24%), pastos anuales (25.03%), soya (17.04%), sorgo (15.65%), caña de azúcar (10.23%) y caña de azúcar industrial (1.42%); 2) 1% para naranja, calabaza pipian, plantaciones forestales y jicama (*Pachyrhizus erosus* L.); y 3) 0.34% para sábila, cítricos dulces, frijol, girasol (*Helianthus annuus* L.), maíz forrajero, tabaco, plátano, perenne asociado con cultivo anual, cacahuate, nopal tuna, limón, chile, ajonjolí, caña de azúcar fruta y papaya.

Los municipios se caracterizaron por un nivel BBAS y MBBAS (Figura 2).

La Región Los Tuxtlas abarcó 8.38% del total de la superficie sembrada incentivada y distribuida así: 1) 98.94% con maíz (58.44%), pastos perennes (31.90%), caña de azúcar (7.18%) y otros perennes (1.40%); 2) 0.71% con plantaciones forestales y café; y 3) 0.33% con cacahuate, reforestación con especies maderables en zonas de clima templado-frío, frijol, yuca, mango manila, otros frutales, reforestación y

for sugar cane, sorghum, rubber, hevea, orange, coffee, fodder corn, oil palm (*Elaeis guineensis* J.), rice and lemon; and 3) 0.66% for annual grasses, other perennial grasses, pipian squash, forest plantations, white corn, maize/any other annual crop, pineapple, Persian lemon, papaya, lychee, grassland establishment, banana, cherry (*Prunus cerasus* L.), Valencian orange, Valencian melon/honey dew (*Cucumis melo* L.), beans, yucca, robusta coffee (*Coffea canephora* P.), papaya maradol, reforestation and revegetation.

The municipalities recorded a MBAS, BBAS and MBBAS level (Figure 2).

The Lower Huasteca Region covered 9.92% of the incentivized planted area and was distributed as follows: 1) 97.02% for corn (70.71%), orange (18.86%), and perennial pastures (7.44%); 2) 2.55% for beans, forest plantations, sweet citrus, oats and mandarin (*Citrus reticulata* B.), barley (*Hordeum vulgare* L.), sugar cane, coffee; and 3) 0.41% for litchi, grapefruit, ebo/vetch, banana, wheat, Valencia orange, typical coffee, fodder corn, pipián squash, agroforestry system, avocado, chili, peach, agroforestry plantations, peanut, lemon, maguey aguamiel (*Agave salmiana* L.), other perennials, plantain and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.).

The municipalities exhibited a BBAS and MBBAS level (Figure 2) of farmers who had arable areas equal to or less than 5 ha.

The Huasteca Alta Region represented 11.43% of the total planted area and was distributed as follows: 1) 98.64% for: corn (29.24%), annual pastures (25.03%), soybeans (17.04%), sorghum (15.65%), sugarcane sugar (10.23%) and industrial sugar cane (1.42%); 2) 1% for orange, pipian squash, forest plantations and jicama (*Pachyrhizus erosus* L.); and 3) 0.34% for aloe, sweet citrus, beans, sunflower (*Helianthus annuus* L.), fodder corn, tobacco, banana, perennial associated with annual crops, peanuts, prickly pear, lemon, chili, sesame, sugar cane fruit and papaya.

The municipalities registered a BBAS and MBBAS level (Figure 2).

The Los Tuxtlas Region had 8.38% of the total planted area promoted and distributed as follows: 1) 98.94% for corn (58.44%), perennial pastures (31.90%), sugar cane (7.18%) and other perennials (1.40%); 2) 0.71% with forest plantations and coffee; and 3) 0.33% with peanuts, reforestation with

revegetación, camote, acelga (*Beta vulgaris* L.), palma (coco, copra, dátil, palmataco), tabaco, maíz blanco, orégano (*Origanum vulgare* L.), café robusta, café caturra, cítricos dulces, mamey y mango.

Los municipios se caracterizaron por un nivel MABAS, ABAS y MBAS (Figura 2).

La Región Totonaca tuvo 5.60% del total de la superficie sembrada y se distribuyó así: 1) 96.85% con maíz (57.53%), naranja (28.68%), limón (4.64%), pastos perennes (3.76%), plátano (1.20%) y limón persa (1.02%); 2) 2.77% con naranja valencia, plátano macho, toronja, litchi, otros perennes y mandarina; y 3) 0.37% con maíz forrajero, toronja Ruby-red, chile, café, tangerina, maíz amarillo, plátano manzano, pimienta, tomate, caña de azúcar, frijol, maíz/cualquier otro cultivo anual, palma (coco, copra, dátil, palmataco), plantaciones forestales y macadamia (*Macadamia integrifolia*).

Los municipios se caracterizaron por un nivel BBAS y MBBAS (Figura 2).

La Región Nautla abarcó 1.52% del total de la superficie sembrada para: 1) 96.71% con maíz (49.70%), limón (14.62%), pastos perennes (11.37%), café (6.97%), naranja (5.95%), otros perennes (2.48%), caña de azúcar (2.29%), tangerina (1.97%) y plátano 1.32%; 2) 2.92% con frijol, pimienta (*Piper nigrum* L.), tomate, plátano macho, litchi, plantaciones forestales, sandía y palma (coco, copra, dátil, palmataco); y 3) 0.36% con mandarina, papaya, sorgo, naranja valencia, aguacate, guanábana, limón persa, pimienta verde, plátano dominico y aguacate has.

Los municipios se caracterizaron por un nivel BBAS y MBBAS (Figura 2).

Impactos e implicaciones del programa

Los resultados muestran diferencias entre las regiones del estado en relación con el número de beneficiarios, los montos de apoyo y la superficie apoyada, lo que mostró regiones con valores muy bajos en estas variables y muy altos en otras, de acuerdo con la estratificación realizada. Además, estas regiones fueron heterogéneas en cuanto a los tipos de cultivos y superficies destinadas, por lo cual se identificaron regiones con más diversidad de cultivos y con menor superficie destinada. Así como algunos casos contrarios, menos diversos y con superficie destinada mayor. Los cultivos incluyeron granos básicos, frutales,

timber species in temperate-cold climates, beans, cassava, manila mango, other fruit trees, reforestation and revegetation, sweet potato, chard (*Beta vulgaris* L.), palm (coconut, copra, date, palmataco), tobacco, white corn, oregano (*Origanum vulgare* L.), robusta coffee, caturra coffee, sweet citrus, mamey and mango.

The municipalities recorded a MABAS, ABAS and MBAS level (Figure 2).

The Totonaca Region covered 5.60% of the total planted area and was distributed as follows: 1) 96.85% for corn (57.53%), orange (28.68%), lemon (4.64%), perennial grasses (3.76%), banana (1.20%) and Persian lemon (1.02%); 2) 2.77% with Valencia orange, male banana, grapefruit, lychee, other perennials and mandarin; and 3) 0.37% with fodder corn, Ruby-red grapefruit, chili, coffee, tangerine, yellow corn, apple banana, pepper, tomato, sugar cane, beans, corn/any other annual crop, palm (coconut, copra, date, palmataco), forest plantations and macadamia (*Macadamia integrifolia*).

The municipalities recorded a BBAS and MBBAS level (Figure 2).

The Nautla Region covered 1.52% of the total planted area for 1) 96.71% for: corn (49.70%), lemon (14.62%), perennial grasses (11.37%), coffee (6.97%), orange (5.95%), other perennials (2.48%), sugar cane (2.29%), tangerine (1.97%) and banana 1.32%; 2) 2.92% with beans, pepper (*Piper nigrum* L.), tomato, plantain, lychee, forest plantations, watermelon and palm (coconut, copra, date, palmataco); and 3) 0.36% with mandarin, papaya, sorghum, Valencia orange, avocado, soursop, Persian lemon, green pepper, Dominican banana and avocado has.

The municipalities registered a BBAS and MBBAS level (Figure 2).

Impacts and implications of the program

The results obtained show differences between the regions of the state in relation to the number of beneficiaries, the support provided and area supported, which showed regions with very low values in these variables and very high in others, according to the stratification carried out. In addition, these regions were heterogeneous in terms of the types of crops and areas allocated, which meant identifying areas smaller in size with more diversity of crops.

forestales, pastizales, hortalizas, entre otros. En el estado de Veracruz se siembran cultivos en superficies de tierra menores a 5.0 ha, lo cual es un indicador de diversificación. Esto quiere decir que PROAGRO Productivo no solo incentivó a cultivos altamente rentables y productivos a gran escala, sino también a cultivos destinados al consumo familiar y que contribuyen al auto abasto de las comunidades rurales. Para ello, a continuación se muestra el contraste de la visión oficial de los resultados del programa y la literatura científica que han realizado algunas evaluaciones en campo y que muestran los impactos que tuvo el programa.

De acuerdo con la revisión de las evaluaciones oficiales realizadas por la SAGARPA, se logró la meta de los objetivos planteados a través del incremento en los rendimientos y la productividad. SAGARPA aplicó una encuesta de productividad a los agricultores con base en el incremento de los rendimientos en los cultivos, pero no consideró cómo se vincularon y acreditaron específicamente los incentivos; tampoco las características socioeconómicas y culturales de los agricultores. El hecho de que los agricultores recibieran apoyo se asoció con el cumplimiento de logro del objetivo. Los agricultores del estrato A de hasta 3 ha de temporal recibieron (MXN por hectárea), 1500.00 MXN (74.73 USD) y hasta 5 ha 1300.00 MXN (64.77 USD). Los del estrato T recibieron 750.00 MXN (37.37 USD). Los del estrato C con productores con UERA's (Unidades Económicas Rurales Agrícolas) de 20 hasta 50 ha de temporal y de más de 5 ha hasta 12.5 ha de riego recibieron 450.00 MXN (22.42 USD) y el resto del estrato comercial recibió 180.00 MXN (8.97 USD). Según el estrato, la acreditación del incentivo fue distinta: a través de factura, contrato de arrendamiento, lista de raya y pagaré de crédito para C; alguno de los anteriores y ticket para T; y carta bajo protesta de decir verdad para A. En este sentido, se acreditó por factura, lista de raya, nota de venta y carta bajo protesta de decir verdad. La vinculación del incentivo se destinó para la compra de fertilizantes, compra de semillas, mano de obra, compra de diésel, renta de maquinaria agrícola y otros conceptos como herbicidas, pago de créditos y pago de luz eléctrica.

Los resultados de las evaluaciones analizadas indicaron que se coadyuvó al cumplimiento del objetivo del Programa de Fomento a la Agricultura de incrementar la producción y productividad agrícola.

The opposite also happened: less diversity of crops in more extensive areas. Crops included basic grains, fruit trees, forestry, grasslands, vegetables, among others. In the state of Veracruz, crops are planted on land areas smaller than 5.0 ha, which is an indicator of diversification. This means that PROAGRO Productivo not only encouraged highly profitable and productive crops on a large scale, but also crops intended for family consumption and that contribute to self-supply of rural communities. To this end, we present below the contrast between the official view of the program's results and the scientific literature resulting from some field evaluations that show the impacts of the program.

According to the review of the official evaluations carried out by SAGARPA, the objectives were met through the increase in yields and productivity. SAGARPA applied a productivity survey to farmers based on the increase in crop yields, but did not consider how incentives were specifically linked and credited; neither the socio-economic and cultural characteristics of the farmers. The fact that farmers received support was associated with the achievement of the objective. Farmers in stratum A of up to 3 ha of rainfed received (MXN per hectare), 1,500.00 MXN (74.73 USD) and up to 5 ha 1,300.00 MXN (64.77 USD). Those in stratum T received 750.00 MXN (37.37 USD). Those in stratum C, with farmers having UERA's (Rural Agricultural Economic Units) of 20 to 50 ha of rainfed and from more than 5 ha up to 12.5 ha of irrigation received 450.00 MXN (22.42 USD) and the rest of the commercial stratum received 180.00 MXN (8.97 USD). Depending on the stratum, the accreditation of the incentive was different: for C through an invoice, lease contract, line list and credit note; any of the above plus ticket for T; and letter under protest of telling the truth for A. In this sense, it was credited by invoice, line list, sales note and letter under protest of telling the truth. The incentive was used for the purchase of fertilizers, seeds, labor hiring, purchase of diesel, rental of agricultural machinery and other items such as herbicides, payment of credits and electricity.

The results of the evaluations analyzed showed that the Program's objective of increasing agricultural production and productivity was accomplished. In addition, the percentage of beneficiaries satisfied with PROAGRO was more than 80%, with farmers rating it as excellent and good; only about 5% were

Además, que el porcentaje de beneficiarios satisfechos por PROAGRO fue más del 80% con productores que tuvieron una opinión excelente y buena; solo un porcentaje alrededor del 5% no estuvo satisfechos con el monto otorgado y con la oportunidad en la entrega del incentivo de acuerdo con los informes de resultados⁵.

Las evaluaciones académicas nacionales, como en los municipios de Chihuahua (Cuauhtémoc y Guachochi), encontraron que el programa tuvo deficiencias desde su diseño, porque no se cumplió el objetivo de incrementar el beneficio financiero de los productores, ni se logró englobar toda la superficie sembrada (se apoyó en promedio el 60%). El apoyo se concentró en los grandes productores, y esto incrementó la desigualdad entre los diferentes estratos, para beneficiar al estrato comercial en proporción mayor. Además representó cerca de 10% del ingreso, lo cual hizo evidente un funcionamiento débil del programa, ya que se percibió como una dádiva y no como mecanismo financiero, para mejorar la producción o productividad agrícola (Carrera y Carrillo, 2016).

Otro estudio realizado en el municipio de Zacatlán, Puebla, mostró que con la llegada tardía de los apoyos, el programa no tuvo un impacto positivo en lograr incrementos en los rendimientos agrícolas entre los pequeños productores; por lo tanto, no cumplió con su objetivo. No se encontraron evidencias suficientes de un efecto positivo del programa, expresado como incremento en la productividad, debido al monto bajo del apoyo. Además, por el retraso en su entrega, dicho apoyo se utilizó para comprar fertilizantes y en algunos casos, para financiar otras actividades productivas no agrícolas o para satisfacer necesidades básicas de la familia (Valentín-Garrido *et al.*, 2016). Un estudio de Morán *et al.* (2017) mostró que los apoyos de PROAGRO Productivo no cubrieron los costos de producción, lo cual contribuyó a no lograr un mejoramiento efectivo de la productividad, tampoco un impacto significativo en el mejoramiento del bienestar de las familias de los beneficiarios; y los productores recibieron el apoyo durante un periodo igual o mayor a trece años, equivalente en promedio a 3584.61 MXN (178.60 USD) por beneficiario.

not satisfied with the amount awarded and the timing of the incentive delivery, according to the results reported⁵.

The national academic evaluations, and those from the municipalities of Chihuahua (Cuauhtémoc and Guachochi) found that the program had deficiencies, first of all in its design, because the objective of increasing the financial benefit of farmers was not met, nor was it possible to include all the planted area (60% was supported on average). Support was concentrated on large producers, and this increased inequality between the different strata, to benefit the commercial stratum in a greater proportion. Besides, it represented about 10% of income, which made evident the weak operation of the program, since it was perceived as a gift and not as a financial mechanism to improve agricultural production or productivity (Carrera and Carrillo, 2016).

Another study carried out in the municipality of Zacatlán, Puebla, showed that when support arrived late, the program failed to have an increase in agricultural yields among small producers; therefore, it did not meet its objective. There was insufficient evidence of a positive effect of the program, expressed as an increase in productivity, due to the low amount of support. Also, due to the delay in its delivery, this support was used to buy fertilizers, and in some cases to finance other non-agricultural productive activities or satisfy family basic needs (Valentín-Garrido *et al.*, 2016). A study by Morán *et al.* (2017) showed that PROAGRO Productivo's support did not cover production costs, which contributed to not achieving an effective improvement in productivity, nor a significant impact on improving the welfare of the beneficiaries' families; and farmers received the support for a period equal to or longer than thirteen years, equivalent on average to MXN 3,584.61 (USD 178.60) per beneficiary.

Official evaluations show results related to the farmers of stratum C, while the academic evaluations show findings that are far from achieving increased productivity. The latter show scenarios in which diversification in agricultural activities and income acquires relevance. These two views coincide with the results of our study, since the farmers exhibited

⁵La información presentada se obtuvo de los informes de resultados de los años 2014, 2015, 2016, 2017 y 2018, se consultaron en la página de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, 2019). <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/avances-trimestrales-proagro-2014-2018> (Consulta: febrero 2019).

Las evaluaciones oficiales ponen en evidencia resultados relacionados con los productores del estrato C, mientras que las evaluaciones académicas muestran hallazgos distantes al logro del incremento de la productividad. Estas últimas muestran escenarios en los cuales la diversificación en actividades agrícolas e ingreso adquiere relevancia. Estas dos visiones coinciden con los resultados de nuestro estudio, ya que los productores se caracterizaron, en proporción mayor, por una cantidad menor del monto de apoyo recibido, la superficie sembrada y en la cantidad de beneficiarios. Además, con una heterogeneidad productiva alta en las diferentes regiones, las cuales también son heterogéneas por sus características agroecológicas y culturales.

En la práctica y como ejercicio para discutir los logros del programa, estos escenarios deben analizarse porque, los agricultores con potencial de desarrollo o quienes son considerados receptivos al cambio, reciben la porción más grande de recurso, crédito, ganado o tecnología; y aun cuando muchos de ellos no utilizan estos beneficios estrictamente de acuerdo con el método recomendado, el programa continuaría estimulando sus metas iniciales (Long, 2007), como sucedió en este análisis. Parte esencial para demostrar si PROAGRO Productivo logró tener impactos positivos y logró sus objetivos es preguntarse: ¿Los productores de autoconsumo solo consumen lo que producen? ¿Los de transición están transitando a comercializar? o ¿Los comerciales, en realidad lo son? Las categorías pueden rediseñarse, porque es claro que no corresponden a las características de los productores y de los sistemas de producción; esto al considerar la estratificación realizada en este estudio, al lado de otras visiones oficiales y académicas.

El estrato denominado “autoconsumo” recibió cantidades relativamente pequeñas de dinero del programa y la superficie cultivada no rebasó las 5 ha; por tanto, etiquetar como “autoconsumo” a este estrato sirve para reforzar las metas originales y los valores normativos del programa, pues cualquier déficit o falla percibidos por el programa podría llevar solo a incrementar los esfuerzos, o a renovar el proselitismo por el personal de la entidad para lograr sus objetivos en la próxima ocasión (Long, 2007). Por ello deberá reconstruirse esta categoría, al tomar en cuenta que se ha encasillado en ella al 80% de los agricultores en el estado. Un ejemplo es que el nuevo programa que sustituye a PROAGRO Productivo es el programa

in a great proportion a lower amount of support provided, a reduced area sown and smaller number of beneficiaries. Also having a high productive heterogeneity in the different regions, which are also diverse in their agro-ecological and cultural characteristics.

In practice, and as an exercise to analyze the achievements of the program, these scenarios should be analyzed because farmers with development potential or considered receptive to change usually receive the largest share of support, loans livestock or technology; and even when many of them do not use these benefits strictly following the recommended method, the program would continue stimulating their initial goals (Long, 2007), as it happened in this analysis. In order to demonstrate whether PROAGRO Productivo had positive impacts and achieved its objectives, it is necessary to ask the following questions: Do self-consumption farmers only consume what they produce? Are those in transition moving to marketing? or Are the commercials really so?

Categories can be redesigned, because it is clear that they do not correspond to the characteristics of farmers and production systems; this after considering the stratification carried out in this study, alongside other official and academic views.

The stratum called “self-consumption” received relatively small amounts of money from the program, and the cultivated area did not exceed 5 ha; therefore, labeling this stratum as “self-consumption” serves to reinforce the original goals and normative values of the program, since any deficit or failure perceived by the program could only lead to increased efforts, or renewed proselytism by the staff of the entity to meet its objectives on a subsequent occasion (Long, 2007). For this reason, this category must be reconstructed, taking into account that 80% of the farmers in the state have been labelled as being part of it. An example is that the new program that replaces PROAGRO Productivo is the Production for Wellbeing program (Producción para el Bienestar), which uses the same pattern made up of farmers with georeferencing of properties, although with some slight differences in the types of farmers (Gómez Mena, 2019).

With these contrasting results between official and academic evaluations, a critical analysis of intervention practices is indispensable to go beyond the simple statement of the political functions

Producción para el Bienestar, el cual utiliza el mismo padrón integrado por productores con georreferenciación de predios, aunque con algunos matices distintos en las tipologías de productores (Gómez Mena, 2019).

Con estos resultados contrastantes entre las evaluaciones oficiales y académicas, es indispensable un análisis crítico de las prácticas de intervención, para ir más allá de la declaración simple de las funciones políticas de los estudios de evaluación. La evaluación debe analizarse en primer lugar, como un mecanismo que interconecta diferentes intervenciones en el curso del tiempo; y en segundo lugar, como un factor importante en la producción sistemática de ideologías que legitiman la función de las instancias que intervienen y por lo tanto un cofactor en las relaciones de poder implícitas entre dichas instancias y los grupos beneficiados (Long, 2007).

CONCLUSIONES

PROAGRO Productivo en el estado de Veracruz tuvo un presupuesto y número de beneficiarios que disminuyeron de 2014 a 2018. Los datos analizados de ambos años mostraron cinco grupos de municipios agrupados en niveles muy altos, altos, medio, bajo y muy bajo número de beneficiarios, montos de apoyo y superficie apoyada. Los apoyos se distribuyeron de forma heterogénea en las diferentes regiones del estado, pero con presencia mayor del estrato autoconsumo, seguido del de transición y, en menor proporción, el comercial.

La superficie cultivada e incentivada y los tipos de cultivos fueron heterogéneos por región. Los resultados contrastan entre las evaluaciones oficiales y académicas, con una tendencia de mostrar el logro de los objetivos del programa por las evaluaciones oficiales y las investigaciones que muestran un escenario de incumplimiento de los objetivos del programa.

Es importante considerar la diversidad regional y la heterogeneidad productiva del estado como elementos importantes para coadyuvar en el logro de objetivos de los programas. Las categorías utilizadas deberán rediseñarse para estratificar a los agricultores y sus evaluaciones desde un enfoque donde los beneficiarios sean los protagonistas principales. Este estudio es una base para reformular los programas nuevos y para reorientar los ya existentes hacia el logro de sus metas y objetivos.

of evaluation studies. Evaluation must be first analyzed as a mechanism that interconnects different interventions over time; and secondly, as an important factor in the systematic production of ideologies that legitimize the role of the instances that intervene, and therefore a cofactor in the implicit power relations between such instances and the benefited groups (Long, 2007).

CONCLUSIONS

PROAGRO Productivo in the state of Veracruz had a budget and number of beneficiaries that decreased from 2014 to 2018; the data analyzed for both years showed five groups of municipalities grouped in very high, high, medium, low and very low levels regarding numbers of beneficiaries, support provided and area supported. The support provided was distributed differently in the different regions of the state, but with a greater presence of the self-consumption stratum, followed by the transitional stratum and, to a lesser extent, the commercial one.

The cultivated and incentivized area and the types of crops were heterogeneous by region. The results of the official and academic evaluations do not coincide, with a tendency by the former to show the achievement of the program's objectives; while academic research shows the opposite: a scenario of non-fulfillment of such objectives.

It is important to consider regional diversity and the productive heterogeneity of the state as important elements to contribute to the achievement of program objectives. The categories used should be redesigned to stratify the farmers and their evaluations from an approach where the beneficiaries assume a leading role. This study is a basis for reformulating the approach of new programs and reorienting existing ones towards the achievement of their goals and objectives.

—End of the English version—

---*---

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al laboratorio de Geomática del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, por su apoyo para la realización de los mapas.

LITERATURA CITADA

- Carrera C. B., y J. C. Carrillo. 2016. Pobreza rural y procampo: Un análisis comparativo de dos municipios de Chihuahua. *CIENCIA ergo-sum: Rev. Cient. Multidisc. Univ. Aut. Edo. Méx.* 23: 134-144.
- CONABIO. 2011. La biodiversidad en Veracruz: Estudio de estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Veracruz, Universidad Veracruzana, Instituto de Ecología A.C. México. <https://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/estudios.html>. (Consulta: febrero 2019).
- Echánove H. F. 2015. Subsidios gubernamentales para riesgos de precios: El caso de los productores de maíz amarillo en México. *Papeles de Geografía* 61: 33-43.
- FAO. 2018. México rural del siglo XXI. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Ciudad de México. 25 p. <http://www.fao.org/3/i9548es/i9548es.pdf>.
- Fiscal C. B., L. F. Restrepo, y H. Rodríguez. 2017. Estructura productiva agrícola del estado de Sinaloa, México, y el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN). *Chilean J. Agric. Anim. Sci.* 33: 14-23.
- Gallardo-López F., M. A. Hernández-Chontal, P. Cisneros-Saguilán, and A. Linares-Gabriel. 2018. Development of the concept of agroecology in Europe: A review. *Sustainability* 10: 1210.
- Gallardo-López F., M. A. Hernández-Chontal, A. Linares-Gabriel, and P. Cisneros-Saguilán. 2019. Scientific contributions of agroecology in Latin America and the Caribbean: A review. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 51: 215-229.
- Gómez M. C. 2019. Un tercio de beneficiarios recibía doble apoyo al campo: Sader. La Jornada <https://www.jornada.com.mx/2019/03/10/politica/007n2pol?partner=rss#>. (Consulta: marzo 2019).
- Gómez O. L. 2016. Evolución del empleo y de la productividad en el sector agropecuario en México. Naciones Unidas Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/40769>. 60 p.
- Ibarrola-Rivas M. J., y L. Galicia. 2017. Repensando la seguridad alimentaria en México: La necesidad de discutir políticas transversales sustentables enlazando la producción de alimento con el consumo. *Investigaciones Geográficas*. 94: 1-16. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/40769>
- StatSoft, Inc. S. S. 2004. *Statistica (Data Analysis Software System) version 7*. StatSoft Inc.: Tulsa, OK, USA.
- Long N. 2007. *Sociología del Desarrollo: Una Perspectiva Centrada en el Actor*. Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social (CIESAS) y el Colegio de San Luis (COLSAN). México. 498 p.
- Morán G. D., E. Valtierra Pacheco, V. Vázquez García, y J. M. Salas González. 2017. Concurrencia de los programas de la SAGARPA y la CONAFOR en una comunidad rural: El caso de Santiago Ihuatlán Plumas, Oaxaca. *Sociedad y Ambiente*. 15: 39-66.
- Muñoz M. T., I. Ocampo Fletes, F. Parra Inzunza, J. Cervantes Vargas, A. Argumedo Macías, y S. Cruz Ramírez. 2017. Proceso de producción y mecanismos de comercialización de chía (*salvia hispánica* L.) por familias campesinas de los municipios de Atzitzihuacán y Tochimilco, Puebla, México. *Nova Scientia* 9: 788-818.
- Piñera B. A., T. Martínez Saldaña, M. A. Jiménez Velázquez, y J. L. García Cue. 2016. Política pública para el campo: Procampo en el centro del país. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7: 147-157.
- SADER. 2019. Avances trimestrales ProAgro 2014-2018. Reportes descriptivos de los avances correspondientes a los años 2014, 2015, 2016, 2017 y 2018 del ProAgro Productivo. <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/avances-trimestrales-proagro-2014-2018>. (Consulta: febrero 2019).
- SAGARPA. 2014a. Antecedentes Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Programas/proagro/Paginas/Antecedentes.aspx>. 2018. (Consulta: noviembre 2018).
- SAGARPA. 2017. El ciclo de cultivo primavera/verano Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/el-ciclo-de-cultivo-primavera-verano?idiom=es>. (Consulta: noviembre 2018).
- SAGARPA. 2018. PROAGRO Productivo, un logro estratégico de productividad. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/proagro-productivo-un-logro-estrategico-de-productividad?idiom=es>. (Consulta: noviembre 2018).
- Sánchez C. J. E. 2014. La política agrícola en México, impactos y retos. *Rev. Mex. Agroneg.* 35: 946-956.
- Thiébaud V., y E. Velázquez Hernández. 2017. Entre la agricultura y el trabajo urbano: Dos estudios de caso en la periferia de Xalapa, una ciudad media del estado de Veracruz (México). *LiminaR* 15: 142-162.
- Valentín-Garrido, J. M., A. León-Merino, M. Hernández-Juárez, D. M. Sangerman-Jarquín, y E. Valtierra-Pacheco. 2016. Evaluación del programa proagro productivo en comunidades rurales de la sierra norte de Puebla. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7: 413-425.

