

Agrociencia

Volumen 55, Número 4

16 de mayo- 30 de junio, 2021



Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga
Director en Jefe
SENASICA



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

MÉXICO



DIRECTORIO

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Said Infante Gil

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

Said Infante Gil

Ana Rita Román Jiménez

FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN

L. Brenda Espejel Lagunas

APOYO

Belem M. Villegas Contreras

Yolanda Feroso Meraz

Oscar Vieyra Durán

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, **Volumen 55, número 4, 16 de mayo - 30 de junio, 2021**, 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. Said Infante Gil**. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo 04-2021-031913431800-203. ISSN: En trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Dr. Said Infante Gil. Fecha de última modificación, **29 de junio del 2021**.

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 (TEAL), 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 Luis Huexotla. Texcoco, 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: Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 55

16 de mayo - 30 de junio, 2021

Número 4

Agua-Suelo-Clima ⇌ Water-Soil-Climate

- EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE COMPOSTA DE RESIDUOS AVÍCOLAS Y CACHAZA ⇌ PHYSICOCHEMICAL EVALUATION OF WASTE COMPOST FROM POULTRY AND SUGARCANE FILTER MUD
 Verónica **Rosas-Martínez**, Daniel Arturo **Rodríguez-Lagunes**, Régulo Carlos **Llarena-Hernández**, Nelson **Milanés-Ramos**, José Octavio **Rico-Contreras**, Odón **Castañeda-Castro**..... 291

Biotecnología ⇌ Biotechnology

- ANÁLISIS MOLECULAR Y DIFERENCIACIÓN DE GENOTIPOS DE ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADOS ⇌ MOLECULAR ANALYSIS AND DIFFERENTIATION OF GENETICALLY MODIFIED COTTON GENOTYPES
 Roberto Carlos **Cid-Contreras**, José Oscar **Mascorro-Gallardo**, Agustín de Jesús **López-Herrera**, Ernestina **Valadez-Moctezuma**..... 303

Ciencia Pecuaria ⇌ Animal Science

- OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE UNA β -CAROTENO 15,15'-MONOOXIGENASA RECOMBINANTE A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN ⇌ OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION AND PURIFICATION OF A RECOMBINANT β -CAROTENE 15,15'-MONOOXYGENASE FROM INCLUSION BODIES
 Martín **Barbosa-Amezcu**a, Luz **Vázquez-Moreno**, Laura **González-Dávalos**, Armando **Shimada**, Ofelia **Mora** 317

Fitociencia ⇌ Crop Science

- CYTOKININ, GIBBERELIC ACID AND DEFOLIATION ON DENSITY AND MORPHOLOGY OF TRICHOME OF *Pelargonium graveolens* L'Hér FOR ESSENTIAL OIL BIOSYNTHESIS ⇌ CITOQUININA, ÁCIDO GIBERÉLICO Y DEFOLIACIÓN SOBRE DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE TRICOMAS DE *Pelargonium graveolens* L'Hér PARA BIOSÍNTESIS DE ACEITE ESENCIAL
 Zenzile Peter **Khetsha**, Moosa Mahmood **Sedibe**, Rudolph Johannes **Pretorius**, Elmarie **van der Watt**..... 331

- MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO SOBRE EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE NOGAL PECANERO CULTIVADO EN EL VALLE DEL YAQUI, SONORA, MÉXICO ⇌ GROWTH PROMOTING MICROORGANISMS ON YIELD AND QUALITY OF PECAN GROWN IN THE YAQUI VALLEY, SONORA, MEXICO
 Paola Carolina **Cantú-Nava**, Marco Antonio **Gutiérrez-Coronado**, Luciano **Castro-Espinoza**, Juan Manuel **Soto-Parra**, Juan Manuel **Cortez-Jiménez**, Humberto **Núñez-Moreno**..... 347

- RENDIMIENTO, CONTENIDO MINERAL Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FRIJOL CAUPÍ BIOFORTIFICADO CON COMBINACIONES DE SULFATOS DE HIERRO Y ZINC ⇌ YIELD, MINERAL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COWPEA BEANS BIOFORTIFIED WITH COMBINATIONS OF FERROUS AND ZINC SULFATES
 Moisés **Guillén-Molina**, Efraín **de la Cruz-Lázaro**, Esteban **Sánchez-Chávez**, José Rodolfo **Velázquez-Martínez**, Rodolfo **Osorio-Osorio**, César **Márquez-Quiroz**..... 357

EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE COMPOSTA DE RESIDUOS AVÍCOLAS Y CACHAZA

PHYSICOCHEMICAL EVALUATION OF WASTE COMPOST FROM POULTRY AND SUGARCANE FILTER MUD

Verónica Rosas-Martínez¹, Daniel Arturo Rodríguez-Lagunes¹, Régulo Carlos Llerena-Hernández¹, Nelson Milanés-Ramos¹, José Octavio Rico-Contreras², Odón Castañeda-Castro^{3*}

¹Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Camino Peñuela-Amatlán de los Reyes S/N, Amatlán de los Reyes, Veracruz. C.P. 94945. (verodesorcia@gmail.com), (rllarena@uv.mx, darola63@hotmail.com), (nmilanes@yahoo.com). ²Grupo Pecuario San Antonio, S.A. de C.V. km 335 Carretera federal Fortín-Córdoba S/N C.P. 94540, Colonia San Nicolás, Córdoba, Veracruz, México. (jrico@gporres.com.mx). ³Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Prolongación de Oriente 6 No. 1009. Orizaba, Veracruz. C.P. 94340 (odcastaneda@uv.mx).

RESUMEN

El compostaje es una alternativa sostenible de valorización de residuos y conversión en abono orgánico. Bajo la hipótesis de que mezclas de residuos tienen características físicas y químicas que modifican el aporte mineral a los cultivos. El objetivo de este estudio fue evaluar las características físico-químicas de tres compostas obtenidas por la mezcla de residuos avícolas y cachaza de la industria azucarera, como alternativa al uso de insumos minerales. Un experimento completamente al azar se estableció con tres tratamientos y tres repeticiones, cada unidad experimental consistió en una pila dinámica de 2 m de largo, 1 m de ancho y 1 m de alto; en Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. Temperatura, pH y humedad se registraron. Los elementos se cuantificaron por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados se analizaron con un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La composta de pollinaza presentó las concentraciones mayores de nitrógeno, potasio, calcio, sodio, materia orgánica, carbono total, capacidad de intercambio catiónico y densidad aparente. La mezcla de pollinaza y cachaza tuvo las concentraciones mayores de fósforo y magnesio. La composta obtenida a partir de pollinaza presentó una calidad alta para su uso como abono orgánico, por tanto, puede utilizarse como sustrato de cultivos agrícolas.

Palabras clave: sector avícola, agroindustria azucarera, abonos orgánicos, contenido elemental.

ABSTRACT

Compost is a sustainable alternative of valorization of waste and conversion to organic fertilizer. Under the hypothesis that mixtures of residues have physical and chemical characteristics that modify the mineral supply to crops; the objective of this study was to evaluate the physicochemical characteristics of three composts obtained by mixing poultry waste and sugarcane filter mud from the sugar industry, as an alternative to the use of mineral inputs. A completely randomized experiment was established with three treatments and three replications; each experimental unit consisted of a dynamic pile 2 m long, 1 m wide and 1 m high, in Amatlán de los Reyes, Veracruz, Mexico. Temperature, pH and moisture were recorded. The elements were quantified by atomic absorption spectrophotometry. Results were analyzed with an analysis of variance and the Tukey ($p \leq 0.05$) means comparison test. The poultry waste compost showed the highest concentrations of nitrogen, potassium, calcium, sodium, organic matter, total carbon, cationic exchange capacity and apparent density. The mixture of poultry waste and sugarcane filter mud had the highest concentrations of phosphorus and magnesium. The compost obtained from poultry waste showed a high quality for its use as organic fertilizer, therefore, it can be used as a substrate of agricultural crops.

Key words: poultry sector, sugar agroindustry, organic fertilizers, elemental content.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8275-2753>.

Recibido: marzo, 2020. Aprobado: mayo, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 291-302. 2021.

INTRODUCCIÓN

El aumento en los procesos productivos agrícolas e industriales da como resultado generación de residuos de origen animal o vegetal, que conllevan impactos negativos al ambiente, el medio y la salud humana. Debido a ello se buscan alternativas de manejo sostenible para la reducción, reutilización o transformación de dichos residuos (López-Andrés *et al.*, 2018).

La producción de aves para consumo humano es un sector en constante crecimiento por estar vinculado con la demanda de la población. A nivel internacional, México ocupa el séptimo lugar en producción de pollo, detrás de países como Estados Unidos, Brasil, China, Unión Europea, India y Rusia (UNA, 2019). Mientras que, en México en el año 2019, se produjeron 3.55 millones toneladas (Mg), lo cual representa un 2.72% global, con un crecimiento de 2.4% respecto a 2018 (SIAP, 2019).

El aumento de la producción en el sector avícola genera residuos que incluyen estiércol o pollinaza, aves muertas y residuos de la planta de incubación (cascarones, líquido viscoso, embriones no eclosionados, pollitos muertos). La pollinaza de aves es el residuo que se produce en volúmenes mayores, debido a la producción intensiva y al tiempo que dura el ciclo de vida de un pollo. Unas cinco a siete semanas, en las cuales se generan 1.55 kg de estiércol por ave. Lo anterior se convierte en un problema grave por la acumulación y contaminación al ambiente (Rico-Contreras *et al.*, 2017). Por su contenido, la pollinaza emite a la atmósfera gases y olores, generados por la descomposición aeróbica y anaeróbica del material (Chen *et al.*, 2020); aunque el olor no representa riesgos a la salud es inaceptable por la población.

La agroindustria azucarera también genera residuos o subproductos que originan costos adicionales para su manejo y disposición final. Por cada Mg de caña de azúcar procesada (*Saccharum* spp.) se generan entre 25 a 30 kg de cachaza; un residuo orgánico que usualmente se elimina en el proceso de clarificación del jugo de caña de azúcar. Por la necesidad de disminuir la dependencia de agroinsumos químicos en el cultivo, la búsqueda de alternativas sostenibles como las compostas es una opción de agricultura alternativa, porque su incorporación en forma de abonos orgánicos promueve la biodiversidad del suelo. Además, con un manejo adecuado de residuos

INTRODUCTION

The increase in the agricultural and industrial productive processes results in the generation of residues of animal or plant origin, which have negative impacts to the environment and human health. Therefore, alternatives of sustainable management are searched for the reduction, reutilization or transformation of these residues (López-Andrés *et al.*, 2018).

The production of poultry for human consumption is a sector in constant growth, as it is linked to the demand of the population. At the international level, Mexico occupies seventh place in poultry production, after countries such as the United States, Brazil, China, the European Union, India and Russia (UNA, 2019). In 2019, Mexico produced 3.55 million tons (Mg), which represents 2.72% of world production, with an increment of 2.4% respect to 2018 (SIAP, 2019).

The increase in production in the poultry sector generates residues that include manure or poultry waste, dead birds and residues from the incubation plant (eggshells, viscous liquid, unhatched embryos, dead chicks). Poultry manure is the residue produced in the highest volumes, due to intensive production and the duration time of the life cycle of the chicken, five to seven weeks, in which 1.55 kg of manure are generated per chicken. This becomes a serious problem because of accumulation and contamination of the environment (Rico-Contreras *et al.*, 2017). Due to its content, poultry waste emits gasses and odors to the atmosphere, generated by aerobic and anaerobic decomposition of the material (Chen *et al.*, 2020). Although the odor does not represent risks to health, it is unacceptable for the population.

Sugar industry also generates residues or byproducts that cause additional costs for their management and final disposal. For each Mg of sugarcane (*Saccharum* spp.) processed, 25 to 30 kg of filter mud are generated. This organic residue is usually eliminated in the process of clarification of the sugarcane juice. Due to the need to reduce the dependency of chemical agro-inputs in the crop, the search for sustainable alternatives such as compost is an alternative option for agriculture, because its incorporation in the form of organic fertilizers promotes soil biodiversity. Furthermore, with adequate management of organic residues, sugarcane

orgánicos, la cachaza se transforma por microorganismos que degradan y convierten la materia orgánica en un producto final estable con nutrientes disponibles para ser absorbidos por las plantas (Zhao *et al.*, 2016).

Con la hipótesis de que, en la combinación de estos materiales, al menos una de ellas tendrá las características físico-químicas convenientes para mejorar la absorción nutrimental; el objetivo de esta investigación fue evaluar las características físico-químicas de la composta obtenida a partir de la mezcla de residuos avícolas y cachaza de la industria azucarera para conocer su composición elemental como fuente alternativa de nutrientes para las plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en la planta de compostaje del Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, ubicado en Carretera Federal Córdoba-Veracruz, km. 348.5, en la congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México.

Colecta de residuos orgánicos

La empresa Grupo Pecuario San Antonio S.A. de C. V. proporcionó los residuos avícolas, pollinaza y residuos de la incubadora: cascarones, líquido viscoso, embriones y pollitos muertos. En tanto que el Ingenio Central El Potrero S. A. de C. V. suministró la cachaza, durante la zafra 2017-2018.

Preparación de las mezclas de composta

El compostaje se realizó siguiendo la metodología descrita por Román *et al.* (2013). A partir de los residuos orgánicos seleccionados se prepararon tres mezclas, las cuales constituyeron los tratamientos bajo estudio: pollinaza al 100% (T1); pollinaza con cachaza al 1:1 P/V (T2); y residuos de la incubadora (cascarones, embriones, líquido viscoso y pollitos muertos) con cachaza al 3:1 P/V (T3). Después, se formó una pila dinámica con dimensiones (alto x ancho x largo) de 1 x 1 x 2 m, con un peso total de 1 Mg cada una, cubiertas con plástico transparente. Los tratamientos se evaluaron con un diseño completamente al azar dentro del área de compostaje, con tres réplicas por tratamiento.

Durante el proceso de compostaje se realizó aireación por medio de volteos manuales cada 8 d. La temperatura se registró cada 3 d con un termómetro digital (Traceable modelo 4371, Control Products, Estado Unidos). El pH se midió cada 8 d con potenciómetro (Medidor de pH y temperatura Milwaukee Modelo Mi150, Estados Unidos), en disolución agua:suelo en

filter mud is transformed by microorganisms degrading and converting the organic matter into a stable final product with available nutrients that can be absorbed by plants (Zhao *et al.*, 2016).

Our hypothesis was that in combinations of these materials, at least one of them will have the adequate physicochemical characteristics for improving nutrimental absorption. The objective of this study was to evaluate the physicochemical characteristics of the compost from the mixture of poultry residue and sugarcane filter mud to know their elemental composition as an alternative source of nutrients for plants.

MATERIALS AND METHODS

This study was established at the compost plant of Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, located at Carretera Federal Córdoba-Veracruz, km. 348.5, in the village Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz, Mexico.

Collection of organic residues

The firm Grupo Pecuario San Antonio S.A. de C.V. provided the poultry residues, poultry manure and residue from incubators: eggshells, viscous liquid, embryos and dead chicks. The Ingenio Central El Potrero S. A. de C.V. supplied the sugarcane filter mud during the harvest 2017-2018.

Preparation of the compost mixtures

Compost mixtures were made following the methodology by Román *et al.* (2013). From the organic residues selected, three mixtures were prepared which formed the treatments under study: 100% poultry waste (T1); poultry waste with sugarcane filter mud at 1:1 P/V (T2); and residues of the incubator (eggshells, embryos, viscous liquid and dead chicks) with sugarcane filter mud at 3:1 P/V (T3). Next, a dynamic compost pile was formed with dimensions (height x width x length) of 1 x 1 x 2 m, with a total weight of 1 Mg each one, covered with transparent plastic. Treatments were evaluated with a completely randomized design in the compost area, with three replications per treatment.

During the compost process, aeration was made by manual overturning every 8 d. Temperature was registered every 3 d with a digital thermometer (Traceable model 4371, Control Product, United States). The pH was measured every 8 d with a potentiometer (for pH and temperature, Milwaukee Model Mi150, United States), in a water:soil 1:2 solution. In order to do this, 10 g of compost were taken, to which 20 mL of distilled water were added, then left to rest for 30 minutes (min) to

relación 1:2. Para ello, se tomaron 10 g de composta, se agregaron 20 mL de agua destilada, y se dejó reposar por 30 minutos para el registro de la lectura. La humedad se midió cada 8 d por el método de gravimetría; se pesaron 25 g de muestra que se sometió a un proceso de secado a 70 °C en un horno (Modelo 3488M Imperial V Lib-line, IL, Estados Unidos) por 72 h. Las variables temperatura, pH y humedad se registraron hasta el momento en que las compostas entraron a proceso de enfriamiento o maduración.

Materia orgánica (MO)

Para cuantificar la MO, se homogenizaron 0.5 g de composta, después se agregó 10 mL de dicromato de potasio 1 N y se agregó ácido sulfúrico concentrado; se dejó reposar por 30 min y se hizo una disolución a 200 mL con agua destilada. Ácido fosfórico al 85% se añadió y 1 mL del indicador difenilamina sulfonato de bario. Por último, se valoró por retroceso con sulfato ferroso hasta obtener un color verde brillante.

Carbono Orgánico (CO)

La determinación de CO consistió en la oxidación de la muestra con dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado; con un factor de oxidación de 1.72 y se tituló con dicromato en intervalos de temperaturas de 125 a 150 °C.

Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

Para la determinación de la CIC se usó el método de reposo con acetato de amonio 1 N pH 7.0. Para ello se pesaron 10 g de composta seca, se le agregó acetato de amonio 1 N, en seguida se filtró para obtener una solución transparente, para después lavarla con cloruro de amonio y alcohol etílico. El cloruro de sodio y el ácido sulfúrico se utilizaron respectivamente como indicador y reactivo para la titulación.

Densidad Aparente (DA)

La determinación de la DA consistió en pesar 20 cm de hilo; después se ató un agregado de suelo de aproximadamente 3 a 4 g, se registró el peso y se sumergió en la parafina a punto de solidificar, se dejó enfriar y nuevamente se registró el peso, en seguida se colocó el agregado en una probeta con agua para determinar el volumen desplazado.

Contenido elemental

La concentración de nitrógeno (N) se realizó por el método micro-Kjeldahl, mientras los elementos fósforo (P), potasio (K),

record data. Moisture was measured every 8 d by the method of gravimetry: 25 g of sample were measured and dried at 70 °C in an oven (Model 3488M Imperial V Lib-line, IL, United States) for 72 h. The variables temperature, pH and moisture were recorded until the time when composts started the process of cooling and ripening.

Organic matter (MO)

To quantify the MO, 0.5 g of compost were homogenized, then 10 mL of 1 N potassium dichromate were added along with concentrated sulfuric acid. It was left to rest for 30 min; and a solution to 200 mL with distilled water was made. Phosphoric acid at 85% was added along with 1 mL of the indicator barium diphenylamine sulfonate. Finally, a back titration was made with ferrous sulfate until a bright green color was obtained.

Organic Carbon (CO)

The determination of CO consisted of the oxidation of the sample with potassium dichromate and concentrated sulfuric acid; with an oxidation factor of 1.72, and was titrated with dichromate in temperature intervals of 125 to 150 °C.

Cationic Exchange Capacity (CIC)

For the determination of CIC, the method of repose in ammonium acetate 1 N pH 7.0 was used. To this end 10 g of dry compost were weighed, 1 N ammonium acetate was added; then it was filtered to obtain a transparent solution, and washed with ammonium chloride and ethylic alcohol. The sodium chloride and the sulfuric acid were used respectively as indicator and reagent for the titration.

Apparent Density (DA)

The determination of DA consisted of weighing 20 cm of thread; then a soil aggregate of approximately 3 to 4 g was tied, the weight was recorded, and it was submerged in paraffin at the solidifying point. Next, it was left to cool, and the weight was again recorded, then the aggregate was placed in a test tube with water to determine the displaced volume.

Elemental content

The concentration of nitrogen (N) was made by the micro-Kjeldahl method, while the elements phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sodium (Na) through quantification by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES model 725, Agilent; Mulgrave, Australia) (Alcántar and Sandoval, 1999).

calcio (Ca), magnesio (Mg) y sodio (Na) a través de cuantificación por espectrofotometría de emisión óptica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES modelo 725, Agilent; Mulgrave, Australia) (Alcántar y Sandoval, 1999).

Análisis estadístico

Las variables físico-químicas evaluadas se sometieron a ANDEVA y prueba de comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$) con el paquete estadístico SPSS v. 25 (IBM, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperatura

Las compostas evaluadas presentaron comportamiento diferente durante el proceso de compostaje. El T1 (composta de pollinaza) y el T2 (composta de pollinaza y cachaza) presentaron una temperatura inicial de 35.8 y 32.3 °C respectivamente, comparados con el T3 (composta de residuos de la incubadora y cachaza) con 38.4 °C. En los tres tratamientos, la temperatura mostró la oscilación característica del proceso de compostaje. Los primeros 30 d se registraron valores mesófilos que oscilaron de 20 a 40 °C. Después, las temperaturas de 40 a 66 °C indicaron que los tratamientos estaban en la etapa termófila. Luego, en el día 58 se observó un descenso en la temperatura (la temperatura de la composta, al estabilizarse, disminuye hasta alcanzar la temperatura ambiente). Este decremento indicó que, en el proceso de degradación, T2 y T3 alcanzaron la etapa de maduración y enfriamiento. No obstante, el proceso de estabilización del T1 se prolongó por más tiempo, esto debido a la composición del material (Figura 1).

Las amplitudes de temperatura registradas durante el proceso de compostaje fueron similares a las registradas por Riera *et al.* (2014) en la fase termófila. Cuando el establecimiento de actividad microbiana se inicia, comienza también la eliminación de los posibles patógenos presentes en el material; así como de semillas de plantas no deseadas (Jiang *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, durante este estudio se alcanzaron temperaturas superiores a 60 °C, mismas que coinciden con lo hallado por Román *et al.* (2013) quienes mencionaron que las temperaturas se elevan de 60 a 70 °C en esta etapa.

Statistical analysis

The physicochemical variables evaluated were subjected to ANOVA and the Tukey ($p \leq 0.05$) means comparison test with SPSS v. 25 (IBM, 2017).

RESULTS AND DISCUSSION

Temperature

The evaluated composts exhibited different behavior during the compost process. T1 (poultry waste compost) and T2 (poultry waste and sugarcane filter mud compost) showed an initial temperature of 35.8 and 32.3 °C, respectively, compared with T3 (compost of incubator residue and sugarcane filter mud) with 38.4 °C. In the three treatments, the temperature showed the characteristic oscillation of the compost process. The first 30 d mesophilic values were registered oscillating from 20 to 40 °C. Later, the temperatures of 40 to 66 °C indicated that the treatments were in the thermophilic stage. Then, at 58 d a decrease in temperature was observed (compost temperature, at the stabilization stage, decreases until levelling the ambient temperature). This decrease indicated that in the decomposition process, T2 and T3 reached the stage of ripening and cooling. However, the stabilization process of T1 was extended for more time, due to the composition of the material (Figure 1).

Temperature intervals registered during the compost process were similar to those observed by Riera *et al.* (2014) in the thermophilic stage. When the establishment of microbial activity initiates, it also the elimination starts of the possible pathogens in the material; as well as seeds of undesired plants (Jiang *et al.*, 2015). At the same time, temperatures above 60 °C were reached during this study, which coincides with what was found by Román *et al.* (2013) who reported temperatures that increased from 60 to 70 °C in this stage.

Oscillation of the pH

The pH registered variations in the compost samples of the three treatments during the process. T1 (poultry waste compost) showed a neutral value

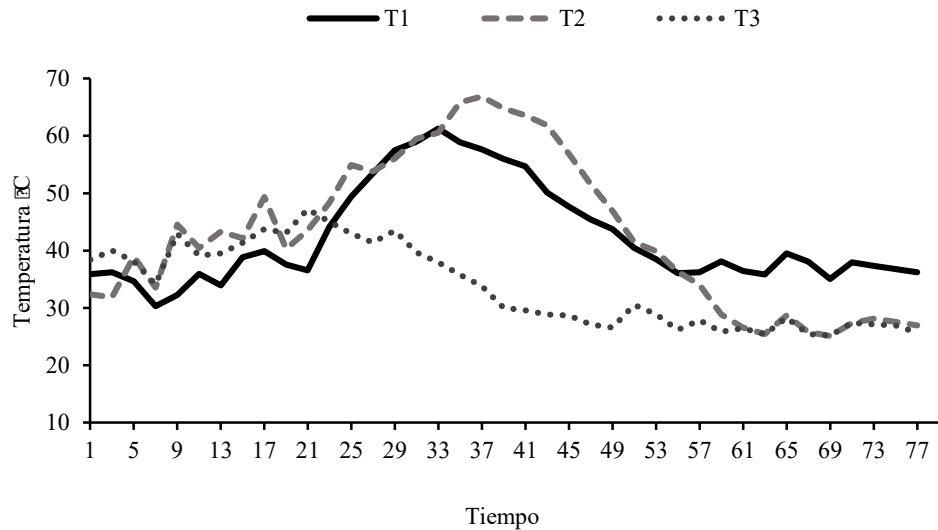


Figura 1. Variación de temperatura durante el proceso de compostaje de residuos avícolas y cachaza de la industria azucarera. T1: composta de pollinaza, T2: composta de pollinaza y cachaza, T3: composta de residuos de la incubadora y cachaza.
Figure 1. Variation of temperature during the compost process of poultry residues and sugarcane filter mud from sugar industry. T1: poultry residue compost, T2: compost of poultry residue and sugarcane filter mud, T3: compost of incubator residues and sugarcane filter mud.

Oscilación del pH

El pH registró variaciones en las muestras de composta de los tres tratamientos durante el proceso. El T1 (composta de pollinaza) presentó al inicio un valor neutro de pH de 7.12, en el día 28 este valor bajó a 6.8 y finalizó con un pH estable de 7.70. Por tanto, el T2 (composta de pollinaza y cachaza) mostró un valor inicial de 7.16, a los 21 d presentó una disminución a 6.33 y en días posteriores al proceso registró un valor neutro de 7.18. En tanto que el T3 (composta de residuos de la incubadora y cachaza) presentó un pH mínimo de 6.21 y un máximo de 7.38, pero en la recta final el pH mostró una completa disminución finalizando el proceso con un pH ácido de 6.4 (Figura 2).

Los valores de pH registrados en los tres tratamientos oscilaron entre 6.21 y 7.70 y de acuerdo con la NMX-FF-109-SCFI-2008 son valores aceptables ya que se encuentran dentro del intervalo óptimo. Sin embargo, durante el proceso de compostaje se presentaron variaciones en pH; disminuyó y se incrementó de nuevo hasta alcanzar neutralidad; esto coincide con Román *et al.* (2013). Los cambios en pH se considera que son resultado de la composición química, del contenido de estiércol y la actividad microbiana (Haroon *et al.*, 2018).

of pH of 77.12 at the start, on day 28. This value decreased to 6.8 but ended at a stable pH of 7.70. Therefore, for T2 (compost of poultry waste and sugarcane filter mud) there was an initial value of 7.16, it decreased to 6.33 at 21 d, and a neutral value of 7.18 was established a few days after the process. On the other hand, T3 (compost of incubator residues and sugarcane filter mud) showed a minimum pH of 6.21 and a maximum of 7.38; but at the end the pH showed a complete decrement; thus, ending the process with an acid 6.4 pH (Figure 2).

Moisture

Moisture attained values of 40 to 60%, for T1 (poultry waste compost) the percentage of moisture remained stable throughout the process. In contrast, T2 (compost of poultry waste and sugarcane filter mud) presented a slight decrease on day 56. Similarly, T3 (compost of incubator residues and sugarcane filter mud) at day 28 started a decrease in moisture until 49 d; and later it increased more than 50% (Figure 3).

Moisture is an important factor, due to organisms utilize water for metabolic processes. Therefore, moisture variations observed in the compost piles could be attributed to the application of water to

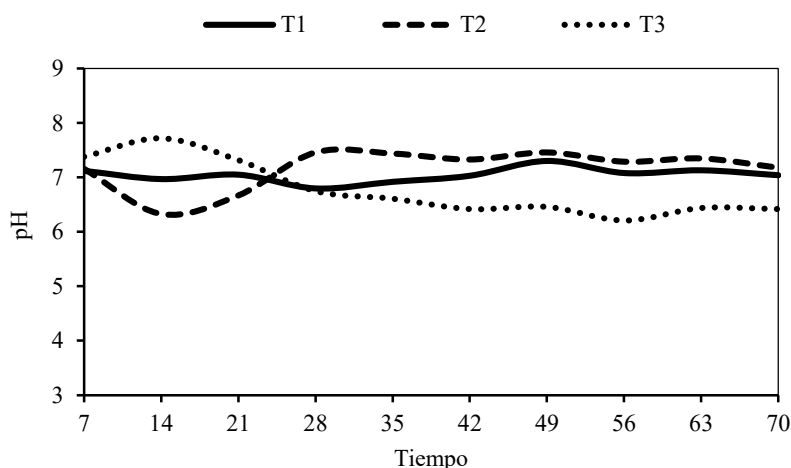


Figura 2. Variación de pH durante el proceso de compostaje en los tres tratamientos. T1: composta de pollinaza, T2: composta de pollinaza y cachaza, T3: composta de residuos de la incubadora y cachaza.

Figure 2. Variation of pH during the compost process in the three treatments. T1: poultry waste compost, T2: compost of poultry waste and sugarcane filter mud, T3: compost of incubator residues and sugarcane filter mud.

Humedad

La humedad registró valores del 40 a 60%, para el T1 (composta de pollinaza) el porcentaje de humedad permaneció estable durante todo el proceso. En contraste el T2 (composta de pollinaza y cachaza) presentó una ligera disminución en el día 56. Así mismo, el T3 (composta de residuos de la incubadora y cachaza) en el día 28 presentó una disminución en la humedad hasta el día 49 y después se incrementó a más del 50% (Figura 3).

La humedad es un factor importante debido a que los organismos utilizan el agua para realizar los procesos metabólicos; por ello las variaciones de humedad registradas en las pilas de composta podrían atribuirse a la aplicación de riego a las pilas. Los resultados en humedad de la composta se situaron dentro de los niveles óptimos (40 a 60%) y coincidieron con lo documentado por Riera *et al.* (2014) quienes mencionaron que un contenido de humedad bajo evita el proceso de fermentación, mientras que contenidos superiores a 75% detienen el proceso de compostaje.

Características de las compostas

Los resultados finales registrados para las muestras de composta presentaron un pH alcalino de 7.7 en el T1 (composta de pollinaza); en el T2 (composta de pollinaza y cachaza) un pH neutro de 7.2. En el

the piles. Results in compost moisture content were within the optimum levels (40 to 60%) and coincided with what was documented by Riera *et al.* (2014). Those authors mentioned that a low moisture content prevents fermentation, while those above 75% detain the compost process.

Characteristics of the composts

The ending results recorded for the compost samples showed an alkaline pH of 7.7 for T1 (poultry waste compost), in T2 (compost of poultry waste and sugarcane filter mud) a neutral pH of 7.2. In the case of T3 (compost of incubator residues and sugarcane filter mud) an acid pH of 5.9 was recorded. Therefore, the properties of the residues affected the decomposition and their properties (Figure 4A). T1 (poultry waste compost) presented the highest content of organic matter (MO), 13.77% (Figure 4 B). The cationic exchange capacity (CIC) was favored and reached 49 mEq 100 g⁻¹ (Figure 4D). Organic carbon (CO) content was 7.9% (Figure 4 C), and the apparent density showed a value of 690 kg m⁻³ (Figure 4 E).

The pH provides information respect to the fermentation type that is present in the process and varies according to the type of organic residue used. The final values of pH were between 7.04 and 7.85; they are considered optimal values that can improve

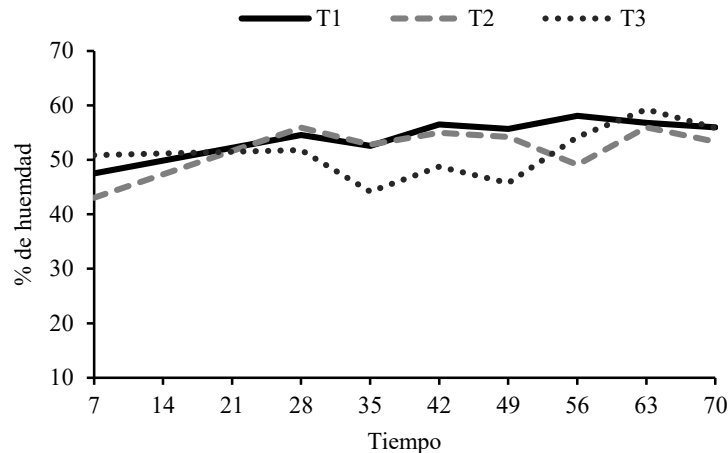


Figura 3. Humedad relativa de las pilas dinámicas durante el proceso compostaje. T1: composta de pollinaza, T2: composta de pollinaza y cachaza, T3: composta de residuos de la incubadora y cachaza.

Figure 3. Relative moisture content in dynamic piles during the compost process. T1: poultry waste compost, T2: compost of poultry waste and sugarcane filter mud, T3: compost of incubator residues and sugarcane filter mud.

caso del T3 (composta de residuos de la incubadora y cachaza) se registró un pH ácido de 5.9. Por lo tanto, las propiedades de los residuos afectaron la descomposición y sus propiedades (Figura 4 A). El T1 (composta de pollinaza) presentó el contenido de materia orgánica (MO) más alto, 13.77% (Figura 4 B). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se favoreció y alcanzó 49 mEq 100 g⁻¹ (Figura 4 D). El carbono orgánico (CO) presentó un 7.9% (Figura 4 C) y la densidad aparente registró un valor de 690 kg m⁻³ (Figura 4 E).

El pH brinda información respecto al tipo de fermentación que está presente en el proceso y varía de acuerdo con el tipo de residuo orgánico utilizado. Los valores finales de pH encontrados se situaron entre 7.04 y 7.85; se consideran valores óptimos que pueden mejorar la calidad del suelo, en el intervalo establecido por la norma mexicana NMX-AA-180-SCFI-2018. Ésta refiere que las compostas terminadas se encuentran en el intervalo de 6.7 a 8.5.

En diferentes cultivos, el uso de composta ha mostrado grandes beneficios, por ejemplo, el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) respondió favorablemente a la aplicación de composta con fertilizantes químicos y resultó ser una buena alternativa sostenible para los sistemas de producción agrícola (Luna *et al.*, 2016). En el caso de semillas de boniato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], la aplicación de composta garantizó la producción de material de buena calidad (Simo *et al.*, 2018). En cultivos de lechuga (*Lactuca*

soil quality according to the interval established by the Mexican standard NMX-AA-180-SCFI-2018. This indicates that the finished composts pH values are in the interval of 6.7 to 8.5.

In different crops, the use of compost has shown great benefits, for example, the potato crop (*Solanum tuberosum*). It responded favorably to the application of compost with chemical fertilizers and compost was a good sustainable alternative for agricultural production systems (Luna *et al.*, 2016). In the case of boniato seeds [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], the application of compost guaranteed the production of good quality material (Simo *et al.*, 2018). In lettuce crops (*Lactuca sativa*), it contributed with a positive effect on growth and plant development, as well as improving soil fertility and increasing organic matter content (Neri *et al.*, 2017).

Regarding the sugarcane crop, the application of 5 Mg ha⁻¹ of compost with 75% of mineral fertilizer, caused a positive effect on the agricultural yield (Rodríguez *et al.*, 2017). All the above shows that the use of organic fertilizers alone or in combination with fertilizer has a high potential in agricultural production. However, the highest impact is shown in the reduction of costs from the application of chemical fertilizers and in the increase of soil fertility (Volverás-Mambusca *et al.*, 2020).

The ending results registered in T1 (poultry waste compost) for the carbon variable, indicated that the organic carbon is linked to the amount and

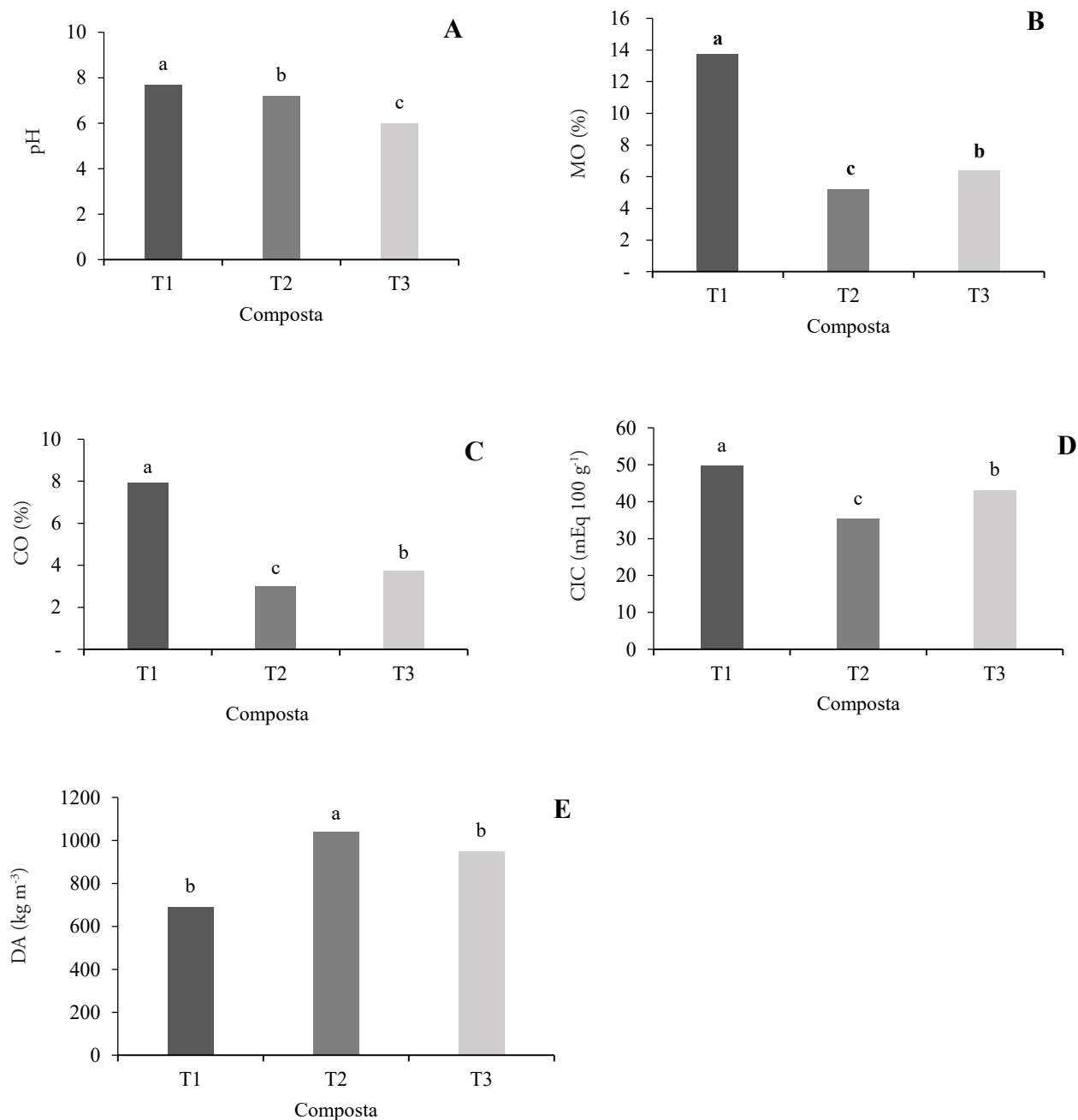


Figura 4. Características de las compostas obtenidas de las mezclas de residuos avícolas más cachaza. A) pH, B) materia orgánica (MO, %), C) carbono orgánico (CO, %), D) capacidad de intercambio catiónico (CIC, mEq 100 g⁻¹ de sustrato) y E) densidad aparente (DA, kg m⁻³). T1: composta de pollinaza, T2: composta de pollinaza y cachaza, T3: composta de residuos de la incubadora y cachaza. Medias con letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Figure 4. Characteristics of the composts obtained from the mixtures of poultry residues plus sugarcane filter mud, A) pH, B) organic matter (MO, %), C) organic carbon (CO, %), D) cationic exchange capacity (CIC, mEq 100 g⁻¹ of substrate) and E) apparent density (DA, kg m⁻³). T1: poultry waste compost, T2: compost of poultry waste and sugarcane filter mud, T3: compost of incubator residues and sugarcane filter mud. Means with different letters in columns indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

sativa) presentó un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como mejoró fertilidad del suelo e incrementó materia orgánica (Neri *et al.*, 2017).

Respecto al cultivo de caña de azúcar, la aplicación de 5 Mg ha⁻¹ de composta con 75% de fertilizante mineral, presentó efecto positivo en el rendimiento agrícola (Rodríguez *et al.*, 2017). Todo lo anterior muestra que el uso de abonos orgánicos solos y en combinación con fertilizante tiene un alto potencial en la producción agrícola. Aunque el impacto mayor se evidencia en la disminución de costos por aplicación de fertilizantes químicos y en el incremento de la fertilidad del suelo (Volverás-Mambusca *et al.*, 2020).

Los resultados finales registrados en el T1 (composta de pollinaza) para la variable de carbono, indicaron que el carbono orgánico se vincula con la cantidad y disponibilidad de nutrientes, y también está asociado con la materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico y la distribución del espacio poroso del suelo. Por eso, en el caso de esta variable, el T1 (composta de pollinaza) es el más recomendable.

Los valores encontrados en CIC se asocian con el contenido de carbono orgánico. Al tener una concentración mayor existe una retención de los elementos necesarios para la planta, lo cual favorece la fertilidad del suelo. Respecto a la densidad aparente, los resultados del T1 (composta de pollinaza) obtenidos se encontraron entre 400 y 700 kg m⁻³ lo cual indica una buena porosidad, así como aireación y drenaje adecuados. La densidad aparente final es el resultado de una degradación mayor y una reducción en el tamaño de partículas, afectadas por humedad y materia orgánica (López *et al.*, 2017).

Contenido elemental

Los resultados de este estudio muestran que el T1 (composta de pollinaza) presenta mayor concentración de nitrógeno, potasio, calcio y sodio, comparado con los demás tratamientos. Sin embargo, el T2 (composta de pollinaza y cachaza) mostró concentraciones mayores de fósforo y magnesio. Mientras tanto, el tratamiento con residuos de incubadora y cachaza (T3) presentó los contenidos elementales más bajos, a excepción del nitrógeno (Cuadro 1).

availability of nutrients, and is also associated with the organic matter, the cationic exchange capacity and the distribution of porous space in the soil. Therefore, in the case of this variable, T1 (poultry waste compost) is the most recommendable.

Values found in the CIC are associated with the content of organic carbon. When there is a higher concentration, there is a retention of the elements necessary for the plant, which favors soil fertility. Regarding apparent density, the results of T1 (poultry compost) obtained were between 400 and 700 kg m⁻³ indicating good porosity, as well as adequate aeration and drainage. The final apparent density is the result of a higher decomposition and a decrease in the size of particles, affected by moisture and organic matter content (López *et al.*, 2017).

Elemental content

The results of this study show that T1 (poultry waste compost) allowed a higher concentration of nitrogen, potassium, calcium and sodium, compared with the other treatments. However, T2 (compost of poultry waste and sugarcane filter mud) showed higher concentration of phosphorus and magnesium. Meanwhile, the treatment with incubator residues and sugarcane filter mud (T3) caused the lowest elemental contents, except nitrogen (Table 1).

The potassium recorded in T1 (poultry compost) and T2 (compost of poultry waste and sugarcane filter mud) coincides with the results obtained by Asma *et al.* (2018) in compost of poultry manure with the addition of 50% of sugarcane residues. Anwar *et al.* (2017) in their study with poultry manure and garden pruning residue obtained a higher concentration of potassium. Another study of compost with a mixture of poultry manure and cypress residue showed high contents of N, P, Ca, Na and Mg (Haroon *et al.*, 2018). Results obtained in this study showed an elemental increment directly related to time of decomposition and mineralization of organic residues. Therefore, these composts are considered ideal for agriculture.

CONCLUSIONS

The reutilization of poultry residues such as poultry waste and sugarcane filter mud through compost is a sustainable alternative. The highest

Cuadro 1. Comparación de medias del contenido nutrimental de las compostas obtenidas de residuos avícolas.**Table 1. Comparison of means of the elemental content of the composts obtained from poultry waste.**

Residuos orgánicos	N	P	K	Ca	Mg	Na
				g kg ⁻¹		
T1	4.30a	11.99b	9.17a	4.51a	9.24b	3.93a
T2	2.22b	12.49a	8.58b	4.40a	10.81a	1.02b
T3	3.80a	0.71c	2.94c	1.79b	4.35c	0.31b

T1: composta de pollinaza, T2: composta de pollinaza y cachaza, T3: composta de residuos de la incubadora y cachaza). N: nitrógeno, P: fósforo, K: potasio, Ca: calcio, Mg: magnesio, Na: sodio. Las medias con letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). ♦ T1: poultry waste compost, T2: compost of poultry waste and sugarcane filter mud. N: nitrogen, P: phosphorus, K: potassium, Ca: calcium, Mg: magnesium, Na: sodium. Means with different letters in the columns indicate statistical differences among treatments ($p \leq 0.05$).

El potasio registrado en el T1 (composta de pollinaza) y T2 (composta de pollinaza y cachaza), coincide con los resultados obtenidos por Asma *et al.* (2018) en composta de estiércol de aves y adición del 50% de residuos de caña de azúcar. Anwar *et al.* (2017) en su estudio con estiércol de aves y residuos de podas de jardín obtuvieron una mayor concentración de potasio. Otro estudio de composta con mezcla de estiércol de pollo y residuos de ciprés mostró contenidos altos de N, P, Ca, Na y Mg (Haroon *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en este estudio presentaron un incremento elemental a medida que transcurrió el tiempo de degradación y mineralización de residuos orgánicos. Por lo tanto, estas compostas se consideran ideales para su uso en agricultura.

CONCLUSIONES

La reutilización de residuos avícolas como la pollinaza y la cachaza a través del compostaje es una alternativa sostenible. La mayor concentración de nitrógeno, potasio, calcio y sodio, al final del proceso, se registró en la composta elaborada a partir de pollinaza.

Esta composta también mostró los contenidos mayores de materia orgánica, pH, carbono orgánico; así como capacidad de intercambio catiónico y densidad aparente mayores. Por lo tanto, la composta de pollinaza se considera y recomienda como una alternativa sostenible para los sistemas de producción agrícola.

concentration of nitrogen, potassium, calcium and sodium, at the end of the process, was observed in the compost made from poultry waste.

This compost also presented the highest content of organic matter, pH, organic carbon; also, higher cationic exchange capacity, and apparent density. Thus, composted poultry waste is considered and recommended as a sustainable alternative for agricultural production systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for their support through the doctoral grant No. 301506; Ciencias Agropecuarias, Universidad Veracruzana.

—End of the English version—

—*—

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el apoyo de la beca doctoral No. 301506; Ciencias Agropecuarias, Universidad Veracruzana.

LITERATURA CITADA

- Alcántar G., G., y M. Sandoval V. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publ. Esp. No. 10. Soc. Mex. Cienc. Suelo. Chapingo, México. 156 p.
- Anwar Z., M. Irshad., M. Bilal., F. Hafeez., U. Irshad., and G. Owen. 2017. Changes in availability of plant nutrients during composting of cow manure with poplar leaf litter. *Compost Sci. Utilization*. 25:242-50. doi:10.1080/1065657X.2017.1300547.
- Asma S., F. Iftikhar., I. Muhammad., M. Qaisar., A. Egrinya E., and S. Muhammad. 2018. Transformations of phosphorus and other plant nutrients in poultry litter composted with sugarcane and cabbage wastes. *Compost Sci. Utilization*. 26: 114-127.
- Chen H., K. Sanjeev A., T. Liu., Y. Duan., X. Ren., Z. Zhang., A. Pandey., and A. Kumar M. 2020. Effects of microbial culture and chicken manure biochar on compost maturity and greenhouse gas emissions during chicken manure composting. *J. Hazard. Mat.* 9 p.
- Haroon B., A. Abbasi M., P. Faridullah, A. Pervez, and M. Irshad. 2018. Chemical characterization of cow manure and poultry manure after composting with Privet and Cypress residues. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 49: 2854-2866. DOI: 10.1080/00103624.2018.1546873.
- Jiang J., X. Liu, Y. Huang, and H. Huang. 2015. Inoculation with nitrogen turnover bacterial agent appropriately increasing nitrogen and promoting maturity in pig manure composting. *Waste Manage.* 39: 78-85. DOI: org/10.1016/j.wasman.2015.02.025.
- López-Andrés J., J., A. A. Aguilar-Lasserre., L. F. Morales-Mendoza., C. Azzaro-Pantel., J. R. Pérez-Gallardo., and J. J. Rico-Contreras. 2018. Environmental impact assessment of chicken meat production via an integrated methodology based on LCA, simulation and genetic algorithms. *J. Cleaner Prod.* 174: 477-491.
- López B., E. R., A. Andrade J., S. Herrera M., C. González O., and C. García de la Figal A. 2017. Properties of a compost obtained starting from residuals of the production of sugar cane. *Agric. Center Magaz.* 44: 49-55.
- Luna M., R., A., K. Espinosa C., R. Trávez T., C. Ulloa M., A. Espinoza C., y A. Bejarano A. 2016. Respuesta de variedades de papa (*Solanum tuberosum*, L) a la aplicación de abonos orgánicos y fertilización química. *Cienc. Tecnol.* 9: 11 - 16.
- Neri Ch., J., C., R. Collazos S., E. Huamán H., y M. Oliva. 2017. Aplicación de abonos orgánicos y biofertilizante en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.), distrito de Chachapoyas. *Agroprod. Sustentable* 1: 38 - 46.
- Rico-Contreras J., O., A. A. Aguilar-Lasserre., J. M. Méndez-Contreras., J. J. López-Andrés., and G. Cid-Chama. 2017. Moisture content prediction in poultry litter using artificial intelligence techniques and Monte Carlo simulation to determine the economic yield from energy use. *J. Environ. Manage.* 202: 254-267.
- Riera N., I., V. Della T., P. Rizzo F., Butti M., F. Bressan M., C. Zarate N., D. Weigandt. y C. Crespo. 2014. Evaluación del proceso de compostaje de dos mezclas de residuos avícolas. *Rev. Fac. Cienc. Agrarias* 46: 195 - 203.
- Rodríguez I., H. Pérez I., y W. Jara O. 2017. Efecto del compost en el rendimiento agrícola de caña de azúcar en el Ingenio Valdez. *Rev. Cumbres* 3:119 - 126.
- Román, P., M. Martínez M., y A. Pantoja. 2013. Manual del compostaje del agricultor, experiencias en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Oficina Regional para América Latina y del Caribe. Santiago de Chile. 112 p.
- SIAP (Sistema de información agroalimentaria y pesquera). 2019. Anuario estadístico de la producción agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consultado: mayo 2020).
- Simo G., J., E., E. Espinosa C., A. Espinosa C., F. de Almeida M., y R. Espinosa E. 2018. Aplicación de abonos orgánicos en la producción de material de propagación en el cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Agric. Trop.* 4:10 - 21.
- UNA (Unión de avicultores). 2019. Situación de la avicultura mexicana. <https://una.org.mx/industria/#:~:text=Durante%202019%20la%20industria%20av%20C3%ADcola,6%20de%20cada%2010%20kg.&text=En%202019%20la%20avicultura%20mexicana,36.6%25%20en%20el%20PIB%20pecuario.> (Consultado: noviembre 2020).
- Volverás-Mambusca B., C. F. González-Chavarro., B. Huertas., E. Kopp-Sanabria., and J. Ramírez-Durán. 2020. Effect of the organic and mineral fertilizer on the performance of sugarcane yield in Nariño, Colombia. *Agron. Mesoam.* 31: 547-565. <http://doi:10.15517/am.v31i3.37334>.
- Zhao, X., X. He, B. Xi, R. Gao, W. Tan, H. Zhang, and D. Li. 2016. The evolution of water extractable organic matter and its association with microbial community dynamics during municipal solid waste composting. *Waste Manage.* 56: 79-87.

ANÁLISIS MOLECULAR Y DIFERENCIACIÓN DE GENOTIPOS DE ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

MOLECULAR ANALYSIS AND DIFFERENTIATION OF GENETICALLY MODIFIED COTTON GENOTYPES

Roberto Carlos **Cid-Contreras**, José Oscar **Mascorro-Gallardo**, Agustín de Jesús **López-Herrera**, Ernestina **Valadez-Moctezuma***

Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, estado de México. 56230 México.
(evaladezm@chapingo.mx)

RESUMEN

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es confiable y precisa para verificar si las plantas pueden estar genéticamente modificadas (GM). Por razones ecológicas y reglamentarias es importante saber si las variedades de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) que se siembran en México son convencionales o GM y se necesitan procedimientos inequívocos para identificarlas. Bajo la hipótesis de que la presencia de al menos un elemento de transgénesis permite diferenciación y agrupación genotípica en muestras ciegas, el objetivo de este estudio fue determinar por medio de PCR la presencia de los elementos de transgénesis *CaMV35S*, *nptII* o *Tnos* en un conjunto de muestras ciegas de algodón bajo el supuesto de ser GM, para diferenciarlas y agruparlas con base en su estructura genética. El material estudiado fueron 20 muestras de algodón recolectadas en la Comarca Lagunera, México. Las muestras se analizaron con PCR para detectar el tipo de secuencia regulatoria de transgénesis utilizada; luego se genotiparon con marcadores de Inter-Secuencia Simple Repetida (ISSR) para determinar tipo y número de grupos. Los resultados indicaron que el 50% de las muestras contenía las secuencias *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos*; 15% a *nptII* y *Tnos*; 5% a *CaMV35S* y *nptII*, y 5% solo a *nptII*, y revelaron que la construcción genética en estos materiales de algodón fue distinta. El 25% de las muestras analizadas no presentó ningún elemento de transgénesis. Los iniciadores ISSR amplificaron 283 fragmentos, de los cuales el 61.5% fueron polimórficos. De acuerdo con los valores del índice de marcador y de bandas polimórficas, los iniciadores MicroAnch 4, MicroAnch 6 y UBC 872 fueron los más eficientes para diferenciar las muestras en estudio. El análisis de conglomerados y el de coordenadas principales separaron a las 20 muestras en dos grupos, además del genotipo silvestre. El análisis

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) technique is a reliable and accurate tool to prove that plants may be genetically modified (GM). For ecological and regulatory reasons, it is important to know whether cotton (*Gossypium hirsutum* L.) varieties planted in Mexico are conventional or GM. Unequivocal procedures are necessary to identify them. Under the hypothesis that the presence of at least one transgenesis element would allow genotypic differentiation and clustering in blind samples; the objective of this study was to determine by PCR the presence of the transgenesis elements *CaMV35S*, *nptII* or *Tnos* in a set of blind cotton samples assumed to be GM, in order to differentiate clusters based on their genetic structure. The material studied was 20 cotton samples collected in the Comarca Lagunera, Mexico. Samples were analyzed with PCR to detect the type of regulatory transgenesis sequence used; then, the samples were genotyped with Inter-Single Sequence Repeat (ISSR) markers to determine type and number of clusters. The results indicated that 50% of the samples contained *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* sequences; 15% corresponding to *nptII* and *Tnos*; 5% to *CaMV35S* and *nptII*, and 5% to *nptII* only, and revealed that the gene construction in these cotton materials was distinct. Twenty-five percent of the samples tested had no transgenesis elements. The ISSR primers amplified 283 fragments, 61.5% of which were polymorphic. According to the values of the index of marker and polymorphic bands, the primers MicroAnch 4, MicroAnch 6 and UBC 872 were the most efficient in differentiating the samples under study. Cluster analysis and principal coordinate analysis separated the 20 samples into two clusters, in addition to the wild genotype; and analysis of molecular variance indicated that 85% of the variation was attributed to genotypes within the clusters. PCR is a useful molecular technique to identify transgenesis elements for grouping plants according to their genetic similarity.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8765-6613>.

Recibido: octubre, 2020. Aprobado: mayo, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 303-316. 2021.

de varianza molecular indicó que el 85% de la variación se atribuyó a los genotipos dentro de los grupos. La PCR es una técnica molecular útil para identificar elementos de transgénesis y para agrupar plantas de acuerdo con su similitud genética.

Palabras clave: elementos de transgénesis, *Gossypium hirsutum*, muestras ciegas, marcadores ISSR, PCR.

INTRODUCCIÓN

Las plantas genéticamente modificadas (GM) aún generan gran polémica, tanto en el ámbito productivo y ambiental, como en la salud. El algodón (*Gossypium hirsutum* L.) es una especie que tiene importancia mayor en la industria textil por su fibra natural, pero su manejo tradicional requiere costos altos de producción y procesamiento (Fernández, 2001; Rocha-Munive *et al.*, 2018). India, China, Estados Unidos, Pakistán, Brasil, Turquía, Australia, Turkmenistán y Burkina son los productores principales de algodón GM (CIBIOGEM, 2018). Las variedades de algodón GM incorporan tipos diferentes de modificaciones, pero como en cualquier planta GM la modificación genética contiene secuencias reguladoras (elementos de transgénesis) que facilitan la expresión de los genes de interés que pueden modificarse (Chen *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2009). En México, el algodón GM se ha cultivado desde 1996 con adopción gradual y en el año 2008, el 96% del área cultivada era algodón GM (Purcell *et al.*, 2008; Rocha-Munive *et al.*, 2018).

Los laboratorios de detección y análisis de plantas GM por lo general usan técnicas basadas en métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares, los cuales permiten tener certeza sobre el tipo de modificación o evento genético presente en el material de estudio (Pérez-Urquiza *et al.*, 2013; Bajwa *et al.*, 2014). El método molecular de cribado basado en la detección específica con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias reguladoras más comunes, como el promotor *CaMV35S* y el terminador *Tnos*, permite identificar las plantas GM bajo un esquema cualitativo (Díaz y Galindo, 2014; Trejo-Saavedra *et al.*, 2015). Como opción, también se analiza la presencia de genes marcadores para la resistencia a antibióticos, y el más usado es el de la neomicin-fosfotransferasa (neomycin phosphotransferase II; *nptII*) que confiere resistencia a kanamicina (Breyer *et al.*, 2014). En muestras ciegas, la detección

Key words: transgenesis elements, *Gossypium hirsutum*, blind samples, ISSR markers, PCR.

INTRODUCTION

Genetically modified (GM) plants still generate a great deal of controversy, both in the productive and environmental aspects, as well as in health. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is a species of major importance in the textile industry for its natural fiber, but its traditional management requires high production and processing costs (Fernandez, 2001; Rocha-Munive *et al.*, 2018). India, China, USA, Pakistan, Brazil, Turkey, Australia, Turkmenistan and Burkina are the main producers of GM cotton (CIBIOGEM, 2018). GM cotton varieties incorporate different types of modifications, but as in any GM plant the genetic modification contains regulatory sequences (transgenesis elements) that facilitate the expression of genes of interest that can be modified (Chen *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2009). In Mexico, GM cotton has been grown since 1996 with gradual adoption and in 2008, 96% of the cultivated area was GM cotton (Purcell *et al.*, 2008; Rocha-Munive *et al.*, 2018).

GM plant detection and analysis laboratories generally use techniques based on biochemical, immunological and molecular methods, which allow certainty about the type of modification or genetic event present in the study material (Pérez-Urquiza *et al.*, 2013; Bajwa *et al.*, 2014). The molecular screening method based on the specific detection with polymerase chain reaction (PCR) of the most common regulatory sequences, such as the *CaMV35S* promoter and the *Tnos* terminator, allows the identification of GM plants under a qualitative scheme (Díaz and Galindo, 2014; Trejo-Saavedra *et al.*, 2015). As an option, the presence of marker genes for antibiotic resistance is also analyzed, and the most widely used is neomycin phosphotransferase II (*nptII*), which confers resistance to kanamycin (Breyer *et al.*, 2014). In blind samples, the detection of any of these three sequences allows identification of GM plants.

Molecular markers, especially those that scan the genome, differentiate closely related genotypes. Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) (Weising *et al.*, 2005) are used to establish genetic similarities and relationships, population structures and

de cualquiera de estas tres secuencias permite identificar plantas GM.

Los marcadores moleculares, en especial los que exploran el genoma, diferencian genotipos con relación estrecha. Las Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR) (Weising *et al.*, 2005) se utilizan para establecer similitudes y relaciones genéticas, estructuras de población y diferencias entre eventos en algodón GM (Ullah *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2014; Chandrashekar *et al.*, 2015). En este estudio, con el fin de definir el número de grupos a los cuales pertenecían las muestras recolectadas, los marcadores moleculares se utilizaron para diferenciar y agrupar a los genotipos de algodón en función de su estructura genómica.

En el norte de México se realizaron estudios experimentales sobre aspectos agronómicos e industriales con variedades GM de algodón introducidas a México durante los años 2005 a 2015. Las modificaciones genéticas de esas variedades se consideraban de primera generación, cuya construcción genética incluía genes para tolerancia a insectos, a herbicidas o a ambos (CIBIOGEM, 2018). En nuestro estudio, algunos de estos genotipos de algodón se recolectaron en la región de la Comarca Lagunera, una zona algodoneira importante del norte de México, y se analizaron por vía molecular con la finalidad de conocer si eran GM, y en su caso, el tipo de elemento de transgénesis utilizado.

Con base en lo anterior, este estudio se planteó bajo la premisa de que la presencia de al menos un elemento de transgénesis permitiría la diferenciación y agrupación de muestras ciegas. El objetivo fue determinar por medio de PCR la presencia y el tipo de los elementos de transgénesis *CaMV35S*, *nptII* o *Tnos* en un conjunto de muestras ciegas de algodón bajo el supuesto de estar GM, para diferenciarlas y determinar su estructura genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de algodón de 20 muestras (numeradas del 1 al 20) se recolectaron en la zona de la Comarca Lagunera, México, de las cuales se desconocía si eran GM o convencionales. Un genotipo de algodón silvestre (NT, genotipo número 21) se incluyó como testigo negativo, y al vector binario pBI121 (muestra número 22) como testigo positivo por contener las secuencias *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* en su estructura genética (Chen *et al.*,

differences between events in GM cotton (Ullah *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2014; Chandrashekar *et al.*, 2015). In this study, in order to define the number of clusters present in the collected samples, molecular markers were used to differentiate, and cluster cotton genotypes based on their genomic structure.

In northern Mexico, experimental studies on agronomic and industrial aspects were conducted with GM cotton varieties introduced to Mexico during the years 2005 to 2015. The genetic modifications of these varieties were considered first generation, whose genetic construction included genes for tolerance to insects, herbicides, or both (CIBIOGEM, 2018). In our study, some of these cotton genotypes were collected in the region of Comarca Lagunera, an important cotton-growing area in northern Mexico, and were molecularly analyzed in order to know whether they were GM, and if so, the type of transgenesis element used.

Based on the above, this study was aimed under the assumption that the distinctive presence of transgenesis elements would allow blind samples differentiation and clustering. The objective was to determine by PCR the presence and type of the transgenesis elements *CaMV35S*, *nptII* or *Tnos* in a set of cotton blind samples assumed to be GM, in order to differentiate them and determining their genetic structure.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Cotton seeds from 20 samples (numbered 1 to 20) were collected in the Comarca Lagunera area, Mexico, of which it was not known whether they were GM or conventional. A wild cotton genotype (NT, genotype number 21) was included as a negative control, and the binary vector pBI121 (sample number 22) was included as a positive control because it contained the *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* sequences in its genetic structure (Chen *et al.*, 2003). Samples of ten seeds of each genotype were disinfested with 10% extran (Extran® MA, Merk) for 5 min and rinsed with water to remove detergent residues; they were then sown in Peat moss:Agrolita® (2:1) and watered twice a week with 50% Steiner nutrient solution (Steiner, 1961). Seedlings were grown under greenhouse conditions until they presented three true leaves.

2003). Muestras de diez semillas de cada genotipo se desinfectaron con extran 10% (Extran® MA, Merk) durante 5 min y se enjuagaron con agua hasta eliminar los residuos del detergente; después se sembraron en Peat moss:Agrolita® (2:1) y se regaron dos veces por semana con solución nutritiva Steiner 50% (Steiner, 1961). Las plántulas se desarrollaron en condiciones de invernadero hasta que presentaron tres hojas verdaderas.

Extracción de ADN

Para cada muestra (21 recolectas y el vector binario pBI121), el ADN se extrajo de hojas de tres repeticiones biológicas independientes. La extracción se realizó con 1 g de hojas frescas con el método duodecil sulfato de sodio (SDS) (Weising *et al.*, 2005). La integridad del ADN se evaluó con electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹) y la cuantificación se realizó por espectrofotometría a 260 nm en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Detección de elementos de transgénesis

La detección de *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* se efectuó por triplicado (repeticiones técnicas) para cada réplica biológica (9 reacciones totales de PCR por muestra). La mezcla de reacción para PCR contenía 200 µM de dNTPs, 1x de amortiguador *Taq*, 3 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador (Cuadro 1), 1U de *Taq* ADN polimerasa (Promega, EUA) y 100 ng de ADN genómico; excepto para el plásmido pBI121 para el cual se usaron 40 ng de ADN. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 µL con agua libre de nucleasas. La reacción control consistió en agua en lugar de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) con la siguiente programación: un ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min, 35 ciclos (94 °C, 60 s; 60-61 °C, 45 s y 72 °C, 60 s) (Cuadro 1) y una extensión final a 72 °C por 10 min.

DNA extraction

For each sample (21 collections and the binary vector pBI121), DNA was extracted from leaves of three independent biological replicates. Extraction was performed on 1 g of fresh leaves using the sodium dodecyl sulfate (SDS) method (Weising *et al.*, 2005). DNA integrity was assessed with electrophoresis in 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg mL⁻¹) and quantification was performed by spectrophotometry at 260 nm on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Detection of transgenesis elements

The detection of *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* was performed in triplicate (technical replications) for each biological replicate (9 total PCR reactions per sample). The PCR reaction mixture contained 200 µM dNTPs, 1x *Taq* buffer, 3 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer (Table 1), 1U *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) and 100 ng genomic DNA; except the plasmid pBI121, for which 40 ng DNA was used. The reactions were brought to a final volume of 25 µL with nuclease-free water. The control reaction consisted of water instead of DNA. Amplification was performed on a GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA) with the following programming: one pre-denaturation cycle at 94 °C for 5 min, 35 cycles (94 °C for 60 s, 60-61 °C for 45 s and 72 °C for 60 s) (Table 1) and a final extension at 72 °C for 10 min.

The amplified products were visualized with 6% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and silver nitrate staining (Sambrook and Russell, 2001). The molecular weight of the amplicons was determined with 100 and 1000 bp molecular weight markers (Promega®, Madison, WI, USA). Biological and technical replications were used to identify potential false positives and false negatives. A cluster analysis was performed to separate GM organisms based on the number and type of

Cuadro 1. Características de los iniciadores utilizados para la detección de los elementos regulatorios de transgénesis.

Table 1. Characteristics of the primers used for the detection of transgenesis regulatory elements.

Nombre	Secuencia del iniciador	T _m [†] (°C)	Amplicón (pb [‡])	Fuente
35S	F: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCAGATAGT-3' R: 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	61	195	Díaz y Galindo (2014)
<i>nptII</i>	F: 5'-TGATTGAACAAGATGGATTGC-3' R: 5'-GAACCTCGTCAAGAAGGGGATA-3'	60	780	Ghanem (2011)
<i>Tnos</i>	F: 5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTGC G-3' R: 5'-GCGGGACTCTAATCATAAAAACCC-3'	60	130	Díaz y Galindo (2014)

[†]Temperatura de alineamiento utilizada; [‡]pb: pares de bases. ♦ [†]Alignment temperature used; [‡]pb: base pairs.

Los productos amplificados se visualizaron con electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por Polyacrylamide gel electrophoresis) 6% y tinción con nitrato de plata (Sambrook y Russell, 2001). El peso molecular de los amplicones se determinó con los marcadores de peso molecular de 100 y 1000 pb (Promega®, Madison, WI, USA). Las repeticiones biológicas y técnicas permitieron identificar los posibles falsos positivos y falsos negativos. Un análisis de conglomerados se realizó para separar a los organismos GM en función del número y tipo de elementos regulatorios de transgénesis que contenían. Este análisis de conglomerados se realizó con el método de promedio aritmético de los grupos de pares no ponderados (UPGMA, por Unweighted pair group method with arithmetic mean) a partir de la matriz binaria de las amplificaciones de los tres elementos de transgénesis, y se usó el coeficiente de coincidencia simple (Rohlf, 2002).

Análisis ISSR

Los marcadores ISSR se obtuvieron con 16 iniciadores del conjunto #9 de la Universidad de Columbia Británica (Cuadro 2). La mezcla de reacción de 25 μ L para PCR contenía 200 μ M de dNTPs, 1x de amortiguador *Taq*, 3 mM de $MgCl_2$, 20 pmol del iniciador, 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega, EUA) y 100 ng de ADN genómico. El programa de termociclaje fue: un ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C durante 60 s, la temperatura de alineamiento específica para cada iniciador (Cuadro 2) por 45 s, y 72 °C durante 3 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se separaron en geles PAGE 6% y la tinción se realizó con nitrato de plata (Sambrook y Russell, 2001). Los perfiles de bandeado se codificaron en una matriz binaria.

La eficiencia de los iniciadores utilizados se determinó por medio del cálculo del Contenido de Información Polimórfica (PIC), Poder de resolución (Rp) e Índice de Marcador (MI) (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000). La matriz de similitud y el análisis de agrupamiento con el coeficiente de coincidencia simple (SM, por considerar las dobles ausencias como un factor de similitud; Lamdoy, 1994) se realizaron con el programa NTSYSpc 2.2. El análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en la matriz de similitud genética, se realizó con el paquete estadístico GenA-LEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). El análisis de varianza molecular (AMOVA) se efectuó con el programa GenA-LEx 6.5 para conocer la partición de la variación genética (Peakall y Smouse, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de elementos de transgénesis

La cantidad y calidad del ADN obtenido fueron adecuadas para el desarrollo de las técnicas de PCR.

transgenesis regulatory elements they contained. This cluster analysis was performed using the Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) from the binary matrix of the amplifications of the three transgenesis elements, and the simple coincidence coefficient was used (Rohlf, 2002).

ISSR Analysis

ISSR markers were obtained with 16 primers from set #9 from the University of British Columbia (Table 2). The 25 μ L reaction mixture for PCR contained 200 μ M dNTPs, 1x *Taq* buffer, 3 mM $MgCl_2$, 20 pmol of primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) and 100 ng of genomic DNA. The thermocycling program was: one pre-denaturation cycle at 94 °C for 5 min; 35 cycles at 94 °C for 60 s, at primer-specific alignment temperature (Table 2) for 45 s, and at 72 °C for 3 min; and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were separated on 6% PAGE gels and staining was performed with silver nitrate (Sambrook and Russell, 2001). Banding profiles were coded on a binary matrix.

The efficiency of the primers used was determined by calculating the Polymorphic Information Content (PIC), Resolution Power (Rp) and Marker Index (MI) (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000). The similarity matrix and clustering analysis with the simple matching coefficient (SM, because double absences are considered as a similarity factor; Lamdoy, 1994) were performed with the NTSYSpc 2.2 program. The principal coordinate analysis (PCoA), based on the genetic similarity matrix, was performed with the statistical package GenA-LEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). The analysis of molecular variance (AMOVA) was performed with the GenA-LEx 6.5 program to know the partitioning of genetic variation (Peakall and Smouse, 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

Detection of transgenesis elements

The quantity and quality of DNA obtained were adequate for the development of PCR techniques. The amplified products of the *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* transgenesis elements had molecular weights of 160, 780 and 190 bp, respectively (Figure 1); Ghanem (2011), Diaz and Galindo (2014) and Cid-Contreras *et al.* (2019) found products of similar molecular weights for the primer pairs used. The *CaMV35S* promoter sequence was detected in 60% of the samples (genotypes 2, 4, 5, 7, 8, 8, 11, 11, 13, 14, 14, 15, 16, 17 and 18); the *nptII* gene sequence was detected in 75% of the samples (2, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 14, 15, 16, 17, 19 and 20) and the

Cuadro 2. Características de los iniciadores ISSR utilizados en genotipos de algodón (*Gossypium hirsutum*).**Table 2. Characteristics of ISSR primers used in cotton genotypes (*Gossypium hirsutum*).**

Iniciador	Secuencia	Tm [†] (°C)	Bandas totales	Bandas polimórficas	PBP [‡] (%)	Rp [§]	PIC ^b	MI ^o
Microsat 2	(GACA) ₄	48	9	3	33.3	2.00	0.17	0.52
MicroAnch2	VDV(CT) ₇	68	11	1	9.10	0.10	0.01	0.01
MicroAnch4	(AGAC) ₄ GC	56	30	30	100	13.8	0.32	9.59
MicroAnch6	AC(GACA) ₄	54	30	30	100	19.7	0.42	12.7
INI2	(GA) ₈ YC	54	14	7	50.0	2.48	0.13	0.88
UBC 810	(GA) ₈ T	50	15	4	26.7	1.90	0.10	0.39
UBC 811	(GA) ₈ C	52	22	17	77.3	10.2	0.32	5.50
UBC 812	(GA) ₈ A	50	10	7	70.0	2.86	0.22	1.50
UBC 814	(CT) ₈ A	50	20	10	50.0	8.48	0.29	2.88
UBC 834	(AG) ₈ YT	52	11	5	45.5	4.19	0.25	1.26
UBC 842	(GA) ₈ YG	54	13	3	23.1	2.38	0.15	0.45
UBC 872	(GATA) ₄	42	48	48	100	32.8	0.42	20.3
UBC 879	(CTTCA) ₃	42	12	4	33.3	3.52	0.21	0.82
UBC 889	DBD(AC) ₇	68	15	2	13.3	0.67	0.04	0.08
UBC 890	VHV(GT) ₇	68	15	1	6.67	0.95	0.06	0.06
IS-16	B(ACA) ₅	50	8	2	25.0	2.86	0.28	0.56
Total			283	174	61.4			

[†]Tm: Temperatura de alineamiento utilizada; [‡]PBP: Porcentaje de bandas polimórficas; [§]Rp: Poder de resolución; ^bPIC: contenido de información polimórfica; ^oMI: Índice de marcador. ♦ [†]Tm: Alignment temperature used; [‡]PBP: Percentage of polymorphic bands; [§]Rp: Resolution power; ^bPIC: Polymorphic information content; ^oMI: Marker index.

Los productos amplificados de los elementos de transgénesis *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* tuvieron pesos moleculares de 160, 780 y 190 pb, respectivamente (Figura 1); Ghanem (2011), Díaz y Galindo (2014) y Cid-Contreras *et al.* (2019) encontraron productos de pesos moleculares similares para los pares de iniciadores utilizados. La secuencia del promotor *CaMV35S* se detectó en el 60% de las muestras (genotipos 2, 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 17 y 18); la secuencia del gen *nptII* se detectó en el 75% de las muestras (2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 y 20) y el terminador *Tnos* en el 65% (4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 19).

Lo anterior indicó que el 75% de las muestras de algodón recolectadas en la zona de la Comarca Lagunera eran plantas GM construidas con estos elementos de transgénesis, pero no todas compartían los mismos. Los tres elementos *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* estuvieron presentes en un mismo genotipo en el 50% de las muestras analizadas (genotipos 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 y 17); tres muestras contenían los elementos *nptII* y *Tnos* (genotipos 6, 12 y 19); una muestra (genotipo 2) presentó los elementos

Tnos terminator in 65% (4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 and 19).

This indicated that 75% of the cotton samples collected in the Comarca Lagunera area were GM plants constructed with these transgenesis elements, but not all of them shared the same elements. The three elements *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* were present in the same genotype in 50% of the samples analyzed (genotypes 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 and 17); three samples contained the elements *nptII* and *Tnos* (genotypes 6, 12 and 19); one sample (genotype 2) presented the elements *CaMV35S* and *nptII*, and only one sample was positive for *nptII* (genotype 20). The remaining 25% of the samples (genotypes 1, 3, 9, 10 and 18) did not present any of the genetic elements analyzed.

Regarding the controls used, the three sequences of interest (*CaMV35S*, *nptII* and *Tnos*) were identified in the pBI121 plasmid with the indicated primers, whereas none of these elements were detected in the wild-type cotton genotype.

The use of biological and technical replications decreases the final probability of experimental error.

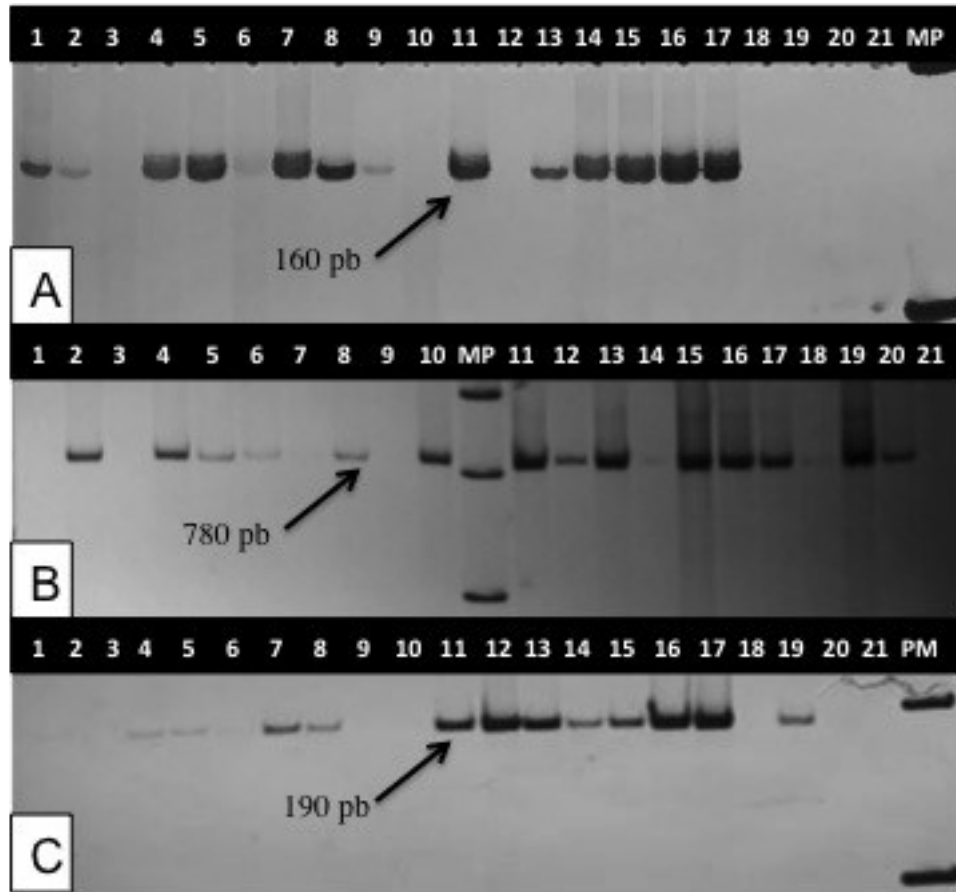


Figura 1. Amplicones de los tres elementos de transgénesis en algodón (*Gossypium hirsutum*). Líneas 1 a 20 corresponden a las muestras ciegas de algodón y 21 al algodón silvestre. Panel A: fragmento de 160 pb del promotor *CaMV35S*; panel B: fragmento de 780 pb del gen *nptII*; C: fragmento de 190 pb del terminador *Tnos*. MP: marcador de peso molecular de 100 pb.

Figure 1. Amplicons of the three transgenesis elements in cotton (*Gossypium hirsutum*). Lines 1 to 20 correspond to blind cotton samples and 21 to wild cotton. Panel A: 160-bp fragment of the *CaMV35S* promoter; panel B: 780-bp fragment of the *nptII* gene; C: 190-bp fragment of the *Tnos* terminator. MP: 100 bp molecular weight marker.

CaMV35S y *nptII*, y solamente una muestra fue positiva para *nptII* (genotipo 20). El 25% de las muestras restantes (genotipos 1, 3, 9, 10 y 18) no presentaron ninguno de los elementos genéticos analizados.

Respecto a los controles utilizados, en el plásmido pBI121 se identificaron las tres secuencias de interés (*CaMV35S*, *nptII* y *Tnos*) con los iniciadores indicados, mientras que en el genotipo silvestre de algodón no se detectó ninguno de estos elementos.

El uso de repeticiones biológicas y técnicas disminuye la probabilidad final del error experimental. Bajo nuestro esquema de trabajo, sólo en una repetición técnica se obtuvieron tres falsos positivos y tres falsos negativos. Estos problemas se han reportado anteriormente por Lipp *et al.* (1999) al determinar

Under our scheme of work, three false positives and three false negatives were obtained in only one technical repetition. These problems have been reported previously by Lipp *et al.* (1999) in determining the presence of the *CaMV35S* promoter and the *Tnos* terminator in GM maize and soybean plants. The errors that have been reported may be mainly due to cross-contamination, out-of-calibration measuring equipment or pipetting errors. For this reason, in this type of assay, it is suggested to perform at least three technical replicates for each biological repetition in order to avoid false results as much as possible.

The reliability in the validity of a qualitative method, such as endpoint PCR, requires including

la presencia del promotor *CaMV35S* y el terminador *Tnos* en plantas de maíz y soya GM. Los errores que se han informado se pueden deber principalmente a la contaminación cruzada, equipos de medición descalibrados o errores de pipeteo. Por esta razón en este tipo de ensayos se sugiere realizar al menos tres repeticiones técnicas por cada repetición biológica con el fin de evitar tanto como sea posible resultados falsos.

La confiabilidad en la validez de un método cualitativo, como el de PCR punto final, requiere incluir repeticiones durante todo el proceso, desde la obtención inequívoca de la muestra, la obtención de ADN de calidad, la cantidad del ADN y de los iniciadores; así como una separación electroforética adecuada, sin prescindir del uso de testigos positivos y negativos confiables (Centro Nacional de Metrología, 2017). Además, la experiencia del analista es muy importante para identificar las posibles causas de error y la determinación del resultado final. En nuestro estudio, se utilizaron geles PAGE para separar y visualizar de manera más apropiada los productos de PCR, porque su sensibilidad de separación es superior a la documentada para geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001).

El análisis de conglomerados UPGMA, basado en el tipo de elemento genético, permitió separar a los genotipos de algodón en dos grupos (Figura 2). El primer grupo incluyó a los genotipos 1, 3, 9, 10 y 18 que no presentaron ninguno de los elementos buscados; mientras que el segundo grupo contenía los genotipos GM. En este segundo grupo, los genotipos se subdividieron en función del número de elementos de transgénesis detectados; un subgrupo contuvo los genotipos que presentaron conjuntamente los tres elementos genéticos (genotipos 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 y 17); otro subgrupo estuvo formado por los genotipos que presentaron los elementos *nptII* y *Tnos* (genotipos 6, 12 y 19). En otro subgrupo estuvo el genotipo 2 que contenía a los elementos *CaMV35S* y *nptII*, y el último subgrupo contuvo el genotipo 20 con el elemento *nptII*. La no coincidencia de los tres elementos en algunas muestras sugiere que estos genotipos pudieron transformarse con el uso de otros promotores, u otros terminadores. Esto promueve que los genes de interés insertados se puedan regular de manera diferente en las plantas GM expuestas a ambientes diversos. Shao *et al.* (2009) y De Guglielmo y Fernández Da Silva (2016) observaron combinaciones de promotores y terminadores para la generación

replicaciones durante el todo el proceso, from the unequivocal obtaining of the sample, the obtaining of quality DNA, the quantity of DNA and primers. As well as an adequate electrophoretic separation, without dispensing the use of reliable positive and negative controls (Centro Nacional de Metrología, 2017). In addition, the analyst's experience is very important in identifying possible causes of error and the determination of results at the end. In our study, PAGE gels were used to more appropriately separate and visualize PCR products because their separation sensitivity is superior to that documented for agarose gels (Sambrook and Russell, 2001).

The UPGMA cluster analysis, based on the type of genetic element, allowed separating the cotton genotypes into two clusters (Figure 2). The first group included genotypes 1, 3, 9, 10 and 18 that did not present any of the elements searched, while the second group contained the GM genotypes. In this second group, the genotypes were subdivided according to the number of transgenesis elements detected. One subgroup contained the genotypes that jointly presented the three genetic elements (genotypes 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 and 17); another subgroup consisted of the genotypes that presented the *nptII* and *Tnos* elements (genotypes 6, 12 and 19). In another subgroup was genotype 2 containing the *CaMV35S* and *nptII* elements, and the last subgroup contained genotype 20 with the *nptII* element. The mismatch of the three elements in some samples suggests that these genotypes were transformed with the use of other promoters, or other terminators. This promotes that the inserted genes of interest may be regulated differently in GM plants exposed to diverse environments. Shao *et al.* (2009) and De Guglielmo and Fernandez Da Silva (2016) observed combinations of promoters and terminators for the generation of gene constructs, some of them different from those identified in this study.

Differentiation with ISSR markers

The 16 ISSR primers generated 283 total fragments in 21 cotton samples, of which 174 were polymorphic (61.4%). The number of total fragments and polymorphic fragments varied depending on the primer used. Total fragments ranged from 8 for primer IS-16 to 48 for primer UBC 872, and polymorphic fragments ranged from one fragment for primers

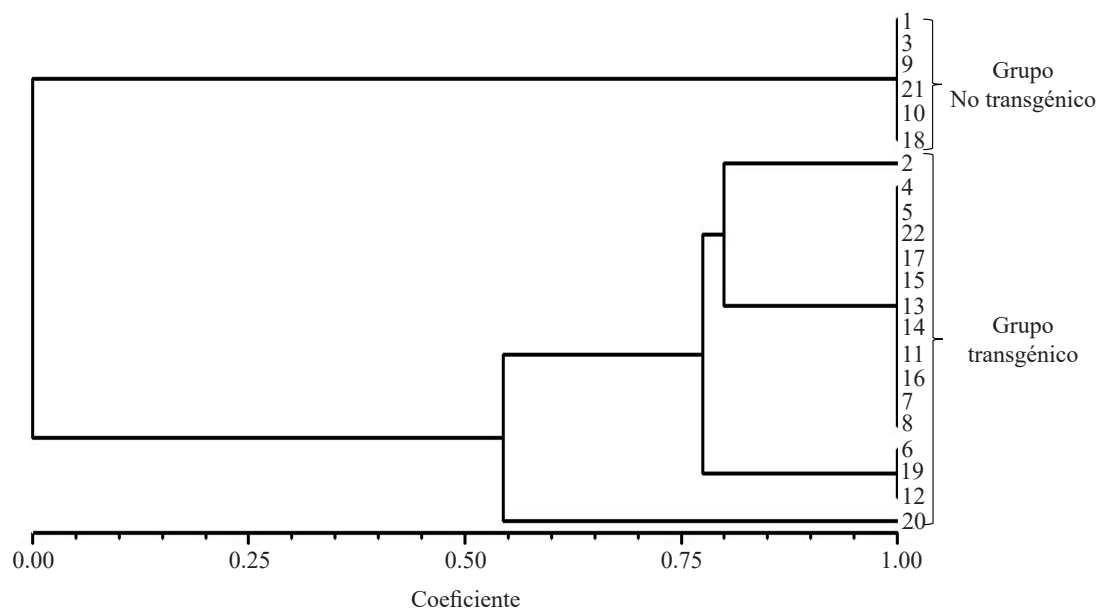


Figura 2. Dendrograma derivado del análisis UPGMA con datos de detección de los elementos genéticos *CaMV35S*, gen *nptII* y *Tnos* en 21 genotipos de algodón (*Gossypium hirsutum*).

Figure 2. Dendrogram derived from UPGMA analysis with detection data of *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* genetic elements in 21 cotton genotypes. (*Gossypium hirsutum*).

de construcciones genéticas, algunas de ellas diferentes a las identificadas en este estudio.

Diferenciación con marcadores ISSR

Los 16 iniciadores ISSR generaron 283 fragmentos totales en 21 muestras de algodón, de los cuales 174 fueron polimórficos (61.4%). El número de fragmentos totales y de fragmentos polimórficos variaron en función del iniciador utilizado. Los fragmentos totales variaron desde 8 para el iniciador IS-16 hasta 48 para el iniciador UBC 872, y los polimórficos variaron desde un fragmento para los iniciadores MicroAnch 2 y UBC 890, hasta 48 para el iniciador UBC 872. Los perfiles de ADN obtenidos con el iniciador UBC 889 también fueron evidentes, para el cual se consideraron 15 fragmentos de ADN claramente visibles y con poco polimorfismo (Figura 3). El porcentaje de bandas polimórficas obtenido en nuestro estudio fue mayor al reportado por Dongre *et al.* (2004) y por Noormohammadi *et al.* (2011) quienes usaron el mismo tipo iniciadores en diferentes materiales de algodón y obtuvieron valores de 54.0 y 54.34%, respectivamente.

MicroAnch 2 and UBC 890, to 48 for primer UBC 872. DNA profiles obtained with primer UBC 889 were also evident, for which 15 clearly visible DNA fragments with little polymorphism were considered (Figure 3). The percentage of polymorphic bands obtained in our study was higher than that reported by Dongre *et al.* (2004) and by Noormohammadi *et al.* (2011) who used the same type of primers on different cotton materials and obtained values of 54.0 and 54.34%, respectively.

The polymorphic index value of the primers ranged from 0.01 for MicroAnch 2 primer to 0.42 for MicroAnch 6 and UBC 872 primers. Ashraf *et al.* (2016) determined similar PIC values, also in cotton (Bt). Primer UBC 872 was the most efficient primer for assessing genetic variability in these genotypes because it presented the highest resolving power value: 20.3 (Table 2). The ISSR primers used in our research were also efficient for separating GM chrysanthemum seedlings according to Cid-Contreras *et al.* (2019), indicating that their genetic structure is repeated in genomes of diverse species, and demonstrating their usefulness for genotyping and differentiating plants of diverse genera and species.

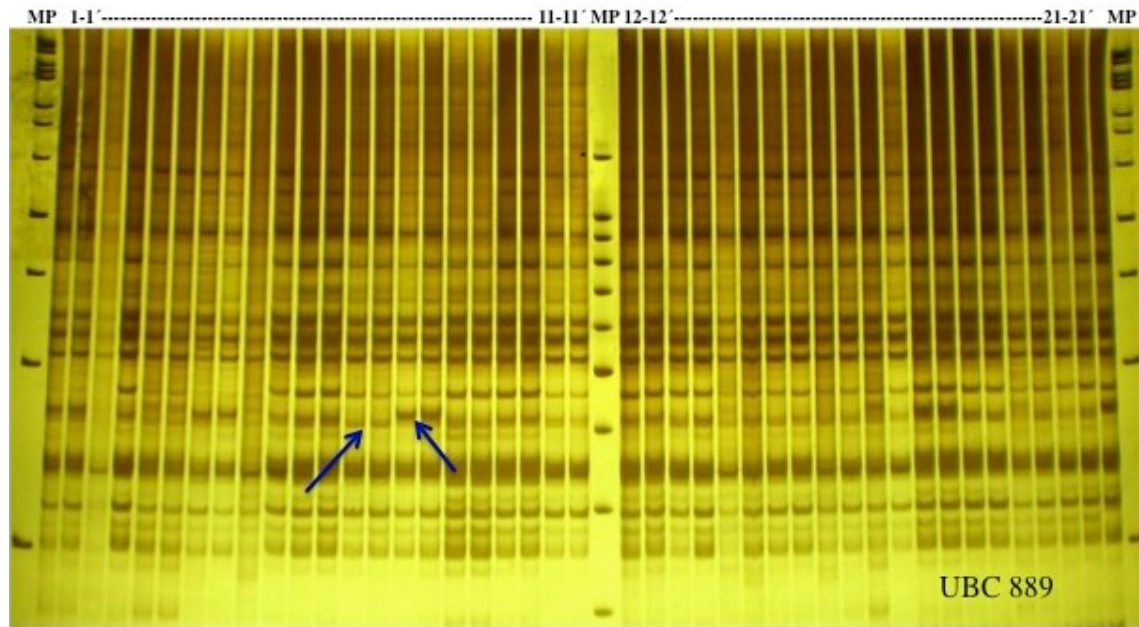


Figura 3. Perfiles ISSR obtenidos con el iniciador UBC 889 de dos repeticiones independientes de 21 genotipos de algodón. Las flechas señalan dos polimorfismos. Los MP son de 100 y 1000 pb.

Figure 3. ISSR profiles obtained with the UBC 889 primer from two independent replications of 21 cotton genotypes. Arrows point to two polymorphisms. The MPs are 100 and 1000 bp.

El valor del índice polimórfico de los iniciadores varió de 0.01 para el iniciador MicroAnch 2 hasta 0.42 para los iniciadores MicroAnch 6 y UBC 872. Ashraf *et al.* (2016) determinaron valores similares de PIC, también en algodón (Bt). El iniciador UBC 872 fue el más eficiente para evaluar la variabilidad genética en estos genotipos porque presentó el valor mayor de poder de resolución, 20.3 (Cuadro 2). Los iniciadores ISSR usados en nuestra investigación también fueron eficientes para separar plántulas de crisantemo GM según Cid-Contreras *et al.* (2019), lo cual indica que su estructura genética está repetida en genomas de diversas especies, y se demuestra su utilidad para genotipar y diferenciar plantas de géneros y especies distintas.

El análisis UPGMA para los marcadores ISSR (Figura 4) mostró una distribución diferente de los genotipos comparada con la agrupación obtenida en la identificación de elementos genéticos (Figura 2). El valor mayor de similitud (0.84) se registró entre los genotipos 16 y 17; mientras que el menor (0.58) fue entre los genotipos 1 y 21 (NT). Con un valor de distancia de 0.715, los 20 genotipos se separaron claramente entre ellos, se conformaron dos grupos, además de la muestra 21 (algodón silvestre) que se

The UPGMA analysis for ISSR markers (Figure 4) showed a different distribution of genotypes compared to the grouping obtained in the identification of genetic elements (Figure 2). The highest similarity value (0.84) was recorded between genotypes 16 and 17; while the lowest (0.58) was between genotypes 1 and 21 (NT). With a distance value of 0.715, the 20 genotypes were clearly separated from each other, two clusters were formed, in addition to sample 21 (wild cotton) which remained as an independent genotype. The first group included genotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 and 10; and among them, genotypes 1, 3, 9 and 10 that did not contain any of the genetic elements analyzed. The second group consisted of genotypes 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20, which correspond to GM plants (except sample 18, which turned out to be conventional).

The formation of these two clusters indicates that the genomic structure of the samples in them is similar, including the respective conventional genotypes. Within each group, the samples were also separated with different similarity coefficients and evidenced the difference between them. The separation of each sample within the clusters is due to the random insertion of the transgenesis assembly.

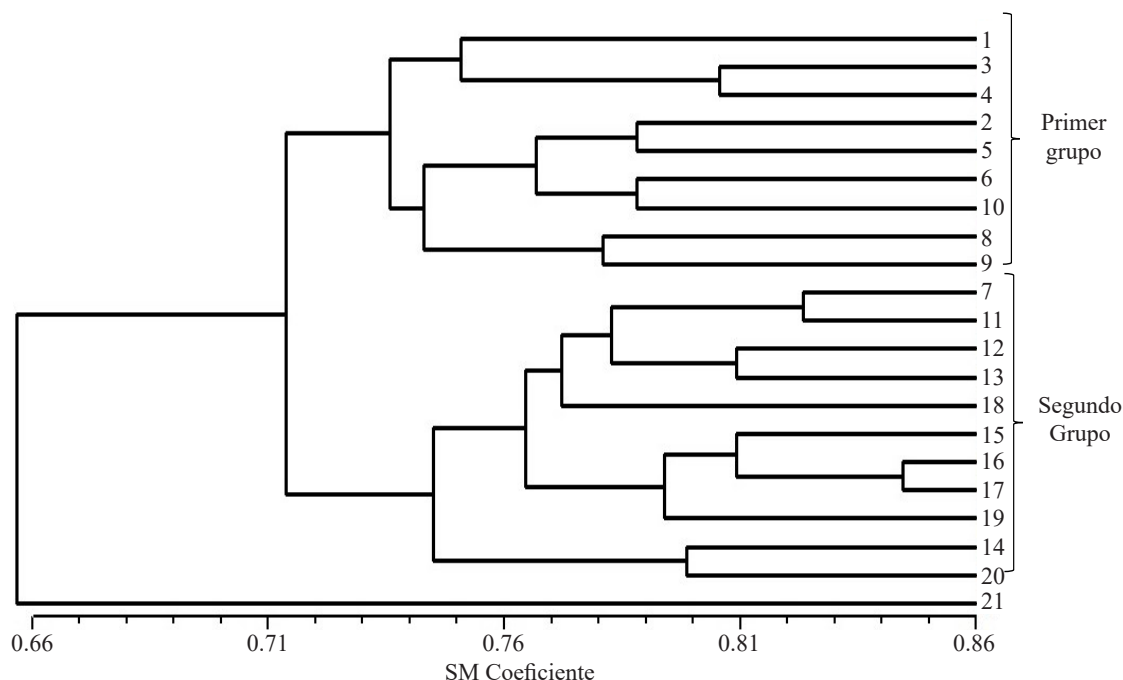


Figura 4. Dendrograma derivado del análisis UPGMA con datos de amplificación de 16 iniciadores tipo ISSR en 21 genotipos de algodón (*Gossypium hirsutum*).

Figure 4. Dendrogram derived from UPGMA analysis with amplification data from 16 ISSR-type primers in 21 cotton genotypes. (*Gossypium hirsutum*).

mantuvo como genotipo independiente. El primer grupo incluyó a los genotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10; y entre ellos, los genotipos 1, 3, 9 y 10 que no contenían a ninguno de los elementos genéticos analizados. El segundo grupo estuvo conformado por los genotipos 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 que corresponden a plantas GM (excepto la muestra 18 que resultó ser convencional).

La conformación de estos dos grupos indica que la estructura genómica de las muestras en ellos es similar, incluyendo los genotipos convencionales respectivos. Dentro de cada grupo las muestras también se separaron con coeficiente de similitud distinto y evidenciaron la diferencia entre ellas. La separación de cada muestra al interior de los grupos se debe a que la inserción del ensamble de transgénesis es aleatoria. Los perfiles reproducidos por los iniciadores cambiaron debido a esto, se expresaron por la longitud o cantidad de fragmentos amplificados. Por otro lado, los grupos que se conforman con el uso de datos de marcadores moleculares hacen referencia a que los individuos que se mantienen agrupados tienen estructuras genómicas similares (Noormohammadi *et al.*, 2011; Ashraf *et al.* 2016).

The profiles reproduced by the primers changed because of this, manifested by the length or number of amplified fragments. On the other hand, clusters that are formed using molecular marker data refer to individuals that remain grouped together are due to similar genomic structures (Noormohammadi *et al.*, 2011; Ashraf *et al.*, 2016).

The AMOVA analysis determined that 15% of the total genetic variability was associated with between-group differentiation, while 85% was attributed to within-group variation. These results point to a similar genomic constitution between both clusters, with a fixation index of 0.154 and partitioning of variation could be attributed to within-group genotypes.

The principal coordinate analysis (Figure 5) generated two clusters, similar to those obtained with the UPGMA analysis (Figure 4). The first and second coordinates contributed respectively 25.6 and 13.1% of the total variation. This indicated genomic differences between genotypes. In this evaluation, genotypes in which no transgenesis elements were identified (genotypes 1, 3, 9, 10, 18 and 21) were scattered in the graph unlike their previous behavior

El análisis AMOVA determinó que 15% de la variabilidad genética total se asoció con la diferenciación entre grupos, mientras que 85% se atribuyó a la variación dentro de los grupos. Estos resultados apuntan a una constitución genómica similar entre ambos grupos, con un índice de fijación de 0.154 y la partición de la variación pudo atribuirse a los genotipos dentro de los grupos.

El análisis de coordenadas principales (Figura 5) generó dos grupos similares a los obtenidos con el análisis UPGMA (Figura 4). La primera y segunda coordenada contribuyeron respectivamente con 25.6 y 13.1% de la variación total. Lo anterior indicó diferencias genómicas entre los genotipos. En esta evaluación, los genotipos en los que no se identificaron elementos de transgénesis (genotipos 1, 3, 9, 10, 18 y 21) quedaron dispersos en la gráfica a diferencia de su comportamiento anterior (Figura 2), cuando se agruparon con base en la ausencia de estos elementos y se separaron de los genotipos GM.

En el análisis PCoA estos genotipos no GM, excepto el genotipo 21, se ubicaron en los grupos correspondientes de acuerdo con sus similitudes

(Figure 2), when they were grouped based on the absence of these elements and separated from the GM genotypes.

In the PCoA analysis these non-GM genotypes, except genotype 21, were placed in the corresponding clusters according to their genomic similarities. This indicates that both GM and non-GM materials corresponding to the same group were found in the sample lots. Sample 21 (NT) was isolated in all analyses since its wild state distinguishes it from the cultivated genotypes.

CONCLUSIONS

Seventy-five percent of the cotton samples collected in La Comarca Lagunera showed evidence of being genetically modified, most of them with the three evaluated transgenesis elements *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos*. The genetically modified cotton analyzed in this study showed different transgenesis constructs.

ISSR-markers separated the collected cotton samples into two clusters. The screening method and

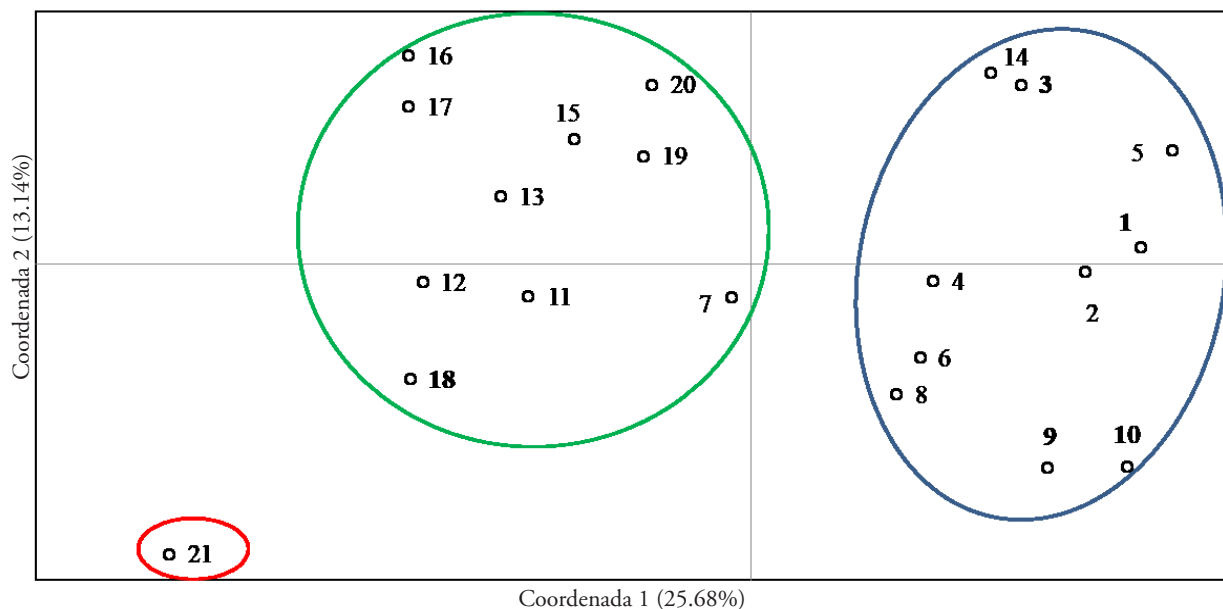


Figura 5. Análisis de coordenadas principales en genotipos de algodón analizados con iniciadores tipo ISSR. Los genotipos contenidos en los círculos hacen referencia a tres grupos conformados; el genotipo 21 es la muestra de algodón silvestre. Los genotipos resaltados en negrita representan a las muestras convencionales.

Figure 5. Principal coordinate analysis of cotton genotypes analyzed with ISSR primers. Genotypes contained in the circles refer to three forming clusters; genotype 21 is the wild cotton sample. Genotypes highlighted in bold represent the conventional samples.

genómicas. Esto indica que en los lotes muestra se encontraban tanto materiales GM como no GM correspondientes al mismo grupo. La muestra 21 (NT) quedó aislada en todos los análisis ya que su estado silvestre la distingue de los genotipos cultivados.

CONCLUSIONES

El 75% de las muestras de algodón recolectadas en la Comarca Lagunera presentaron evidencia de estar genéticamente modificados, la mayoría con los tres elementos de transgénesis *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* evaluados. El algodón genéticamente modificado analizado en este estudio presentó construcciones transgénicas distintas.

Los marcadores ISSR separaron en dos grupos a las muestras de algodón recolectadas. El método de cribado y el análisis con marcadores moleculares ISSR fueron técnicas útiles para identificar tipos de elementos de transgénesis, y permitieron conocer los grupos a los cuales pertenecían las muestras ciegas de algodón.

LITERATURA CITADA

- Ashraf, J., W. Malik, M. Z. Iqbal, A. Ali Khan, A. Qayyum, E. Noor, M. A. Abid, H. M. Naseer Cheema, and M. Q. Ahmad. 2016. Comparative analysis of genetic diversity among Bt cotton genotypes using EST-SSR, ISSR and morphological markers. *J. Agric. Sci. Tech.* 18: 517-531.
- Bajwa, K. S., A. A. Shahid, A. Q. Rao, A. A. Dahab, A. Muzaffar, H. Ur Rehman, M. Ahmad, M. S. Shaukat, A. Gul, A. Ahad, and T. Hussain. 2014. Stable genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using marker genes. *Advanced Crop Sci.* 4: 1-11.
- Breyer, D., L. Kopertekh, and D. Reheul. 2014. Alternatives to antibiotic resistance marker genes for invitro selection of genetically modified plants—scientific developments, current use, operational access and biosafety considerations. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33: 286-330.
- Centro Nacional de Metrología. 2017. Métodos de referencia validados para análisis de organismos genéticamente modificados, por PCR digital, y secuenciación paralela masiva. *Iniciadora Edición.* 49 p
- Chandrashekar, R., B. Prasad, N. Vankudothu, J. Chaitanya P., L. Bhavani N., R. Reddy Y., and K. Rao K. 2015. A comparative genetic diversity study among elite Bt and Non-Bt cotton varieties of Andhra Pradesh by RAPD markers. *Discovery Biotechnol.* 6: 30-37.
- Chen, P.Y., C. K. Wang, S. C. Soong, and K. Y. To. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol. Breed.* 11: 287-293.
- CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados). 2018. Registro Nacional de Bioseguridad de OGMs. <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/sistema-nacional-deinformacion/registro-nacional-bioseguridad-ogms>. (Consulta: enero 2020).
- Cid-Contreras, R. C., J. O. Mascorro-Gallardo, and E. Valadez-Moctezuma. 2019. Genotyping and molecular analysis of transgenic sequences in chrysanthemum (*Chrysanthemum X morifolium* Ramat). *Crop Breed. Applied Biotechnol.* 19: 285-290.
- De Guglielmo, Z., and R. Fernández Da Silva. 2016. Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 18: 119-128.
- Díaz, L., y I. Galindo. 2014. Detección e identificación de eventos asociados a organismos vivos modificados en semillas de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela empleando métodos de inmunoensayo y análisis por PCR. *Rev. Fac. Agron.* 40: 37-49.
- Dongre, A., V. Parkhi, and S. Gahukar. 2004. Characterization of cotton (*Gossypium hirsutum*) germplasm by ISSR, RAPD markers and agronomic values. *Indian J. Biotechnol.* 3: 388-393.
- Fernández, A. H. 2001. Panorama económico del algodón en México - Evolución de la siembra y la problemática del TLC en la comercialización. *Rev. Mex. Agroneg.* V: 189-201.
- Ghanem, S. 2011. Cloning of the *nptII* gene of *Escherichia coli* and construction of a recombinant strain harboring functional *recA* and *nptII* antibiotic resistance. *Gen. Mol. Res.* 10: 1445-1454.
- Lamdoy, W. F. 1994. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *PCR methods Appl.* 4: 31-37.
- Lipp, M., P. Brodmann, K. Pietsch, J. Pauwels, E. Anklam. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybean and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* 82: 923-928.
- Noormohammadi, Z., F. Shojaei-Jesvaghani, M. Sheidai, F. Farahani, and O. Alishah. 2011. Inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of genetic diversity in Mehr cotton cultivar and its crossing progenies. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 11839-11847.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pérez-Urquiza, M., J. Rivera-Mellado, y E. Matus-Cundapi. 2013. Manual de Protocolos de Medición de Organismos Genéticamente Modificados. Centro Nacional de Metrología, México. 78 p.

—End of the English version—



- Purcell, J. P., C. Rubinstein, y T. Vaughn. 2008. El futuro de la biotecnología en Latinoamérica. *In*: Blanco, C. A. (ed). Cultivos transgénicos para la agricultura latinoamericana. Fondo de Cultura Económica. pp: 131–162.
- Rocha-Munive, M. G., M. Soberón, S. Castañeda, E. Niaves, E. Scheinvar, L. E. Eguiarte, D. Mota-Sánchez, E. Rosales-Robles, U. Nava-Camberos, J. L. Martínez-Carrillo, C. A. Blanco, A. Bravo, and V. Souza. 2018. Evaluation of the impact of genetically modified cotton after 20 years of cultivation in Mexico. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6: 82.
- Rohlf, F. J. 2002. NTSYS-PC, numerical taxonomy system for the PC, ExeterSoftware, Ver. 2.2. Exeter Software, Setauket.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker, and M. De Loose. 2000. AFLP Markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed.* 6: 125-135.
- Sambrook, J. E., and D. W. Russell. 2001. Gel electrophoresis of DNA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed., Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. ISBN 978-087969577-4.
- Shao Z., H. Zhao and H. Zhao. 2009. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res.* 37: 2-10. doi:10.1093/nar/gkn991
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil.* 15: 134-154.
- Trejo-Saavedra, D. L., E. A Rodríguez-Negrete, and R. F. Rivera-Bustamante. 2015. Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria.* 25 (NE-3): 24-39. DOI: 10.15174/au.2015.906
- Tyagi, P., M. A. Gore, D. T. Bowman, B. T. Campbell, J. A. Udall, and V. Kuraparthi. 2014. Genetic diversity and population structure in the US Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127: 283-295.
- Ullah, I., A. Iram, M. Z. Iqbal, M. Nawaz, S. M. Hasni, and S. Jamil. 2012. Genetic diversity analysis of Bt cotton genotypes in Pakistan using simple sequence repeat markers. *Genet. Mol. Res.* 11: 597-605.
- Weising, K., H. Nybom, M. Pfenninger, K. Wolff, and G. Kahl. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. Second edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton. 472 p.

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE UNA β -CAROTENO 15,15'-MONOOXIGENASA RECOMBINANTE A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION AND PURIFICATION OF A RECOMBINANT β -CAROTENE 15,15'-MONOOXYGENASE FROM INCLUSION BODIES

Martín Barbosa-Amezcu¹, Luz Vázquez-Moreno², Laura González-Dávalos³, Armando Shimada³, Ofelia Mora^{3*}

¹Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México 04510, México. ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Hermosillo. Hermosillo, Sonora, México. ³Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Secretaría de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Boulevard. B. Quintana 514-D, Colonia Arboledas, 76134, Querétaro, Querétaro. México. (ofemora66@unam.mx).

RESUMEN

Los forrajes utilizados en la producción de ganado bovino en el trópico tienen altos niveles de β -caroteno, que produce canales con grasa de color amarillo y demerita su valor económico. La pigmentación amarilla se debe a la actividad baja de la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) en el intestino delgado e hígado. Un uso biotecnológico de esta enzima podría escindir al β -caroteno en dos moléculas de retinal, eliminar la fuente de coloración y optimizar el valor comercial de la carne del ganado bovino alimentado en pastoreo. El objetivo de este estudio fue obtener una enzima BCMO1 recombinante con actividad similar a las enzimas nativas, a partir de bacterias transformadas con el gen que codifica la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa de *Gallus gallus* (*gBCMO1*). La enzima se obtuvo por sobreexpresión a partir de una *Escherichia coli* XL1-Blue transformada con dicho gen, y se purificó por Cromatografía rápida de proteína líquida (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC); se midió la actividad *in vitro* del proceso por Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) y el producto final se detectó por Cromatografía de líquidos de polaridad alta (High Polarity Liquid Chromatography, HPLC). Una proteína de aproximadamente 63 kDa se obtuvo, la cual presentó una actividad enzimática de 2993 (\pm 108.2) pmol mg⁻¹ de proteína h⁻¹ (n=3). La proteína aislada se puede evaluar como aditivo en estudios *in vitro* con el fin de disminuir la coloración amarilla de las canales de bovinos.

ABSTRACT

Grasses used in the production of bovine livestock in the tropics contain high levels of β -carotene, which produces carcasses that contain yellow-pigmented fat, reducing their economic value. The yellow pigment is due to the low activity of the enzyme β -carotene 15,15'-monooxygenase (BCMO1) in the small intestine and liver. A biotechnological use of this enzyme could split β -carotene in two molecules of retinal, eliminating the source of coloring and optimizing the commercial value of the meat obtained from grazing cattle. The aim of this study was to obtain a recombinant BCMO1 enzyme with a similar activity to native enzymes, from bacteria modified with the gene that codifies the β -carotene 15,15'-monooxygenase in *Gallus gallus* (*gBCMO1*). The enzyme was overexpressed in an *Escherichia coli* XL1-Blue transformed with that gene and purified by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC); measuring the *in vitro* activity of the process by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC); and detecting the final product by High Polarity Liquid Chromatography (HPLC). A protein of approximately 63 kDa was obtained, which showed an enzyme activity of 2993 (\pm 108.2) pmol mg⁻¹ of protein h⁻¹ (n=3). The isolated protein can be evaluated *in vitro* as an additive, in order to reduce the yellow pigmentation of the livestock carcasses.

Key words: grazing livestock, pigmented fat, β -Carotene, meat additives, BCMO1.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7073-7740>

Recibido: abril, 2020. Aprobado: mayo, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 317-329. 2021.

Palabras clave: bovinos en pastoreo, grasa pigmentada, β -Caroteno, aditivos cárnicos, BCMO1.

INTRODUCCIÓN

En México el 72.2% del ganado vacuno se encuentra en sistemas de producción en pastoreo (INEGI, 2014), ya sea extensivo o intensivo, en los cuales la alimentación se basa en el consumo de gramíneas nativas o introducidas (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2011). Estos pastos poseen una alta concentración de carotenoides, principalmente todo-*trans*- β -caroteno, el cual es el precursor mayor de vitamina A (Grune *et al.*, 2010), porque es el único carotenoide capaz de producir dos moléculas de todo-*trans*-retinal después de la escisión oxidativa de su doble enlace central 15,15', catalizada por la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) (Grune *et al.*, 2010).

La BCMO1 es una proteína soluble de 63 kDa que contiene Fe^{2+} . Esta proteína se expresa en el intestino delgado, hígado, riñón, pulmones, piel, testículos, el epitelio pigmentario de la retina ocular y en un gran número de tejidos embrionarios (D'Ambrosio *et al.*, 2011). Además, la actividad de esta enzima varía entre especies, y es cinco veces menor en bovinos que en cabras (García-López y Mora-Izaguirre, 2011). Mora *et al.* (2001) mencionaron que en bovinos un suplemento con hasta 40 mg de β -caroteno por kg de materia seca no afecta la concentración de este compuesto en el tejido adiposo de las canales. Con ese nivel de consumo, la mayoría del β -caroteno absorbido se convierte en todo-*trans*-retinal.

Cruz-Monterrosa *et al.* (2011) estimaron que el contenido de β -caroteno de *Cynodon plectostachyus* producido en el trópico húmedo mexicano es de 627 mg kg^{-1} de materia seca. Estos datos indican que por cada kg de materia seca de forraje que un bovino en pastoreo consume, tiene una ingesta excedente de β -caroteno, el cual se secreta en la grasa de la leche o se deposita en órganos y tejidos, en especial en el adiposo. Entonces, bajo sistemas de producción en pastoreo hay una pigmentación amarilla en la grasa debido al β -caroteno almacenado en este tejido (Daley *et al.*, 2010).

En algunas regiones de México, 12.9% de las canales bovinas muestran esta pigmentación (García-López y Mora-Izaguirre, 2011). A pesar de que el color (tonalidad amarilla) no afecta ni el sabor ni el valor nutritivo de la carne, ésta resulta indeseable

INTRODUCTION

In Mexico, 72.2% of cattle is found under grazing production systems (INEGI, 2014), either extensive or intensive. Feeding is based on the consumption of native or introduced grasses (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2011). These grasses contain high concentrations of carotenoids, mainly all-*trans*- β -carotene, which is the greatest precursor of A-vitamin (Grune *et al.*, 2010). That is the only carotenoid able to produce two molecules of all-*trans*-retinal after the oxidative dissociation of its central double bond 15,15', catalyzed by the β -carotene 15,15'-monooxygenase (BCMO1) (Grune *et al.*, 2010).

BCMO1 is a soluble, 63 kDa protein containing Fe^{2+} . This protein is expressed in the small intestine, liver, kidneys, lungs, skin, testicles, the retinal pigment epithelium of the eye and in many embryonic tissues (D'Ambrosio *et al.*, 2011). Additionally, the activity of this enzyme varies among species; it is five times lower in bovinos than in goats (García-López and Mora-Izaguirre, 2011). Mora *et al.* (2001) reported for bovinos that a supplement of up to 40 mg of β -carotene per kg of dry matter does not affect the concentration of this compound in the adipose tissue of the carcasses. With that level of consumption, most of the absorbed β -carotene becomes all-*trans*-retinal.

Cruz-Monterrosa *et al.* (2011) estimated that the content of β -carotene in *Cynodon plectostachyus*, produced in the humid Mexican tropics, is 627 mg kg^{-1} of dry matter. This data indicates that for every kg of dry forage eaten by grazing livestock, there will be an excess intake of β -carotene, which is then secreted as fat into the milk or is deposited in other tissues and organs, particularly in the adipose tissue. Therefore, under grazing production systems, there is a yellow pigmentation in the meat fat due to the β -carotene stored in that tissue (Daley *et al.*, 2010).

In some of the regions of Mexico, 12.9% of bovine carcasses display this pigment (García-López and Mora-Izaguirre, 2011). Despite the color (a yellow pigmentation) does not affect the flavor or the nutritional value of the meat, it becomes undesirable because the final consumer rejects those pigmented carcasses. This reduces the price of the product because consumers prefer beef with white fat (Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2012; García-López and Mora-Izaguirre, 2011).

porque el consumidor final rechaza las canales pigmentadas. Este hecho baja el precio de la carne, porque las personas prefieren la carne bovina con grasa blanca (Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2012; García-López y Mora-Izaguirre, 2011).

Por lo anterior, con la hipótesis de que la proteína BCMO1 de intestino delgado de *Gallus gallus* se puede purificar a partir de una *Escherichia coli* XL1-Blue y mantener su actividad enzimática para escindir β -caroteno en bovinos; el objetivo de este estudio fue sobre expresar y purificar la enzima BCMO1 a partir de una *E. coli* XL1-Blue transformada con el gen de esa proteína (*gBCMO1*) y probar su actividad *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El gen de la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (*gBCMO1*)

En el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (FESC-UNAM) se desarrolló una *E. coli* XL1-Blue recombinante transformada en el vector inducible por arabinosa pBAD. La recombinante tiene insertado *gBCMO1* aislado del intestino delgado de *G. gallus*. *E. coli* XL-1 Blue ha demostrado que sintetiza a la proteína BCMO1 con actividad *in vitro* (García-López *et al.*, 2012). Por esa razón se decidió utilizar dicha bacteria en este estudio.

Caracterización de la bacteria

Para confirmar la integridad del inserto, se extrajo el ADN plasmídico de la bacteria transformada utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, EUA). La calidad del ADN extraído se evaluó con electroforesis en gel de agarosa al 1% y por la relación de las absorbancias A260/A280 y A230/A260 obtenidas con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Además, el ADN plasmídico obtenido se digirió con la enzima de restricción SacI y se secuenció para confirmar la identidad del inserto.

Expresión de la BCMO1 recombinante

De un cultivo bacteriano que creció durante toda una noche se utilizó 1 mL de para inocular 100 mL de medio LB con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. El cultivo se colocó en incubación a 37 °C y 250 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica de ~ 0.5 a 600 nm (DO_{600}). Luego se indujo la expresión de la enzima BCMO1 con 0.2% de arabinosa (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y se continuó la incubación por 4 h más.

Based on the above, the stated hypothesis was that a recombinant BCMO1 of the small intestine of *Gallus gallus* can be expressed from an *Escherichia coli* XL1-Blue, maintaining its enzyme activity as to disassociate β -carotene in bovines. The aim of this study was to overexpress and purify the enzyme BCMO1 from an *E. coli* XL1-Blue transformed with the gene of that protein (*gBCMO1*) and to test its activity *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

The β -carotene 15,15'-monooxigenase gen (*gBCMO1*)

At Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, (RuMeN) of Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, under Universidad Nacional Autónoma de México (FESC-UNAM), a recombinant *E. coli* XL1-Blue was developed, transformed with the pBAD arabinose-induced vector. The recombinant bacterium contained the *gBCMO1* gene, isolated from the small intestine of *G. gallus*. *E. coli* XL1-Blue has proven to synthesize the BCMO1 protein with *in vitro* activity (García-López *et al.*, 2012). For this reason, that bacterium was used in this study.

Characterization of the bacterium

To confirm the integrity of the insert, the plasmid DNA was extracted from the transformed bacteria, using the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, USA). The quality of the extracted DNA was evaluated with electrophoresis in agarose gel at 1% and by the ratio of A260/A280 and A230/A260 absorbances obtained with a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). In addition, the plasmid DNA obtained was digested with the SacI restriction enzyme and sequenced to confirm the identity of the insert.

Expression of the BCMO1 recombinant

One milliliter of an overnight bacterial culture was used to inoculate 100 mL of LB medium with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ampicillin. The culture was incubated at 37 °C and 250 rpm in a shaking incubator until it reached an optical density of ~ 0.5 at 600 nm (DO_{600}); subsequently. Then, the expression of the BCMO1 enzyme was induced with 0.2% of arabinose (Sigma-Aldrich, USA) and incubation was resumed for another 4 h.

Once induced, the cell pellet was obtained by centrifuging, then resuspended in a lysis buffer [Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, lysozyme (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and protease inhibitors (EDTA-free)]. It was incubated at 4 °C for

Una vez inducida, se obtuvo la pastilla celular por centrifugación, y esta se resuspendió en amortiguador de lisis [Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, lisozima ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) e inhibidores de proteasas (libre de EDTA)]. Durante 30 min se incubó a 4°C y se agregó Tritón X-100 para después colocarla en ultrasonicador SFX150 con una intensidad de 9; se realizaron 10 pulsos con intervalos de 30 s entre cada uno (Branson Ultrasonics Co., EUA).

A la muestra sonicada, se le agregó DNase I ($100 \text{ U Kunitz mL}^{-1}$ de muestra) y 10 mM de MgCl_2 ; se colocó en agitación a 60 rpm por 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó para separar las proteínas solubles e insolubles. Las proteínas se cargaron en un SDS-PAGE al 8% y se analizaron por Western Blot en una membrana de nitrocelulosa. El gel se tiñó con nitrato de plata con la metodología propuesta por Kavran y Leahy (2014). Las imágenes de los geles y las membranas se capturaron en un equipo Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, EUA) con Image Lab® (Bio-Rad).

Solubilización de la BCMO1 a partir de cuerpos de inclusión

La *E. coli* utilizada en este estudio expresó la enzima en cuerpos de inclusión por lo que la proteína se solubilizó en condiciones desnaturizantes. Para esto, se siguió el método propuesto por Singh *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Una vez obtenida la fracción proteica insoluble, se resuspendió en un amortiguador (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, guanidina 6 M, DTT 5 mM e imidazol 15 mM) en proporción de 3 mL g^{-1} de bacteria utilizada. La incubación fue a 25°C y 60 rpm por 1 h, y se centrifugó a 4°C para remover los remanentes insolubles.

Purificación de la enzima por IMAC

Para la purificación de la enzima se utilizó una columna HisTrap FF de 5 mL (GE Healthcare Bio-Sciences, UK) acoplada a un equipo FPLC AKTA (GE Healthcare, UK) con recolector de fracciones. Las recomendaciones del fabricante se siguieron y se mantuvieron las condiciones desnaturizantes durante la purificación.

La columna se equilibró con el mismo amortiguador con el que se desnaturizó la proteína. Una vez equilibrada se inyectó la muestra a un flujo de 1 mL min^{-1} y se lavó la fracción no unida con el mismo amortiguador. La enzima se eluyó con incremento en la concentración de imidazol a 150 mM. Las proteínas se monitorearon a una absorbancia de 280 nm.

30 min and Triton X-100 was added to the mixture. Then, it was sonicated in an SFX150 sonifier (Branson Ultrasonics Co., USA) at 9-intensity; 10 pulses were performed with 30 s intervals between each.

The sonicated sample was added with DNase I ($100 \text{ U Kunitz mL}^{-1}$ of sample) and 10 mM of MgCl_2 ; it was stirred at 60 rpm for 15 min at room temperature and centrifuged to separate soluble and insoluble protein fractions. The proteins were loaded onto an SDS-PAGE (8%) and analyzed by Western Blot on a nitrocellulose membrane. The gel was dyed with silver nitrate using the methodology proposed by Kavran and Leahy (2014). The images of gels and membranes were taken with a Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA) using Image Lab® (Bio-Rad, USA).

Solubilization of BCMO1 from inclusion bodies

The *E. coli* used in this study expressed the enzyme in inclusion bodies, therefore the protein was solubilized in denaturalizing conditions. The method proposed by Singh *et al.* (2015) was followed, with some modifications. Once the insoluble protein fraction was obtained, it was resuspended in a denaturalization buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, guanidine 6 M, DTT 5 mM and imidazole 15 mM) with a proportion of 3 mL g^{-1} of bacteria used. Incubation was at 25°C and 60 rpm for 1 h; then it was centrifuged at 4°C to remove the insoluble remains.

Purifying the enzyme by IMAC

To purify the enzyme, a 5 mL HisTrap FF column (GE Healthcare Bio-Sciences, UK) was attached to an FPLC AKTA (GE Healthcare, UK) with a fraction collector. The manufacturer recommendations were followed, and the denaturalizing conditions were maintained during purification.

The column was equilibrated with the same buffer used to denaturalize the protein. Once it was equilibrated, the sample was injected into a flow of 1 mL min^{-1} and the unattached fraction was washed with the same buffer. The enzyme was eluted with an increase in the concentration of imidazole to 150 mM. The proteins were monitored to an absorbance of 280 nm.

Renaturation of BCMO1

Once the protein was purified, it was renatured with the method proposed by Gutiérrez-González *et al.* (2019) with some

Renaturalización de la BCMO1

Una vez purificada la proteína, se renaturalizó con la metodología propuesta por Gutiérrez-González *et al.* (2019) con algunas modificaciones. La cantidad de enzima eluída se cuantificó por medio de la técnica de Bradford y se calculó la cantidad de amortiguador necesario (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, glutatona oxidada 0.5 mM, glutatona reducida 5 mM y L-arginina 200 mM) para diluir la muestra y que ésta no excediera los 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La cantidad de amortiguador necesario se colocó en agitación a 60 rpm, se añadió la proteína gota a gota y se mantuvo en agitación por 2 h a 4 °C. La solución se filtró (0.2 μm) y se concentró por centrifugación en tubos centricones de 10 kDa (Sigma-Aldrich, EE. UU.) La proteína obtenida se utilizó para medir su actividad *in vitro*.

Actividad enzimática

Una vez renaturalizada la proteína, se midió su actividad con la metodología propuesta por During *et al.* (1996) con algunas modificaciones. Un mM de β -caroteno altamente hidrofóbico se diluyó en 10 mL de acetona con Tween 40 al 4.5 %. La mezcla se homogeneizó con un homogeneizador Ultraturax T25, (IKA Labortechnik, Alemania) a 10 000 rpm por 10 s. Después se evaporó la acetona bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se diluyó con agua destilada para llevarla a un volumen final de 10 mL. Este β -caroteno fue el que se utilizó como sustrato para el ensayo enzimático.

Para el ensayo enzimático, en 2 mL de amortiguador (para 100 mL: fosfato de potasio 1.37 g, pH 7.7, cloruro de magnesio 0.0193 g, nicotinamida 0.211 g, glutatona 0.312 g, duodesil fosfato de sodio 0.049 g, ácido taurocólico 0.322 g, L- β fosfatidilcolina 0.02 g y β -tocoferol 0.012 g) se añadió tanto el β -caroteno soluble como la proteína renaturalizada y se incubó la reacción a 37 °C durante 1 h sin agitación.

La reacción se detuvo con la adición de 500 μL de formaldehído al 37%; se incubó por 10 min y se adicionaron 2 volúmenes de acetonitrilo, se agitó con un vórtex y se incubó por 5 min en hielo, y luego se centrifugó 18 000 x g durante 10 min.

Las muestras obtenidas de los ensayos enzimáticos se analizaron por HPLC para detectar los retinoides formados, con base en lo reportado por During *et al.* (1996). Después se inyectaron por duplicado (100 μL) en el HPLC 1100 Series, con un detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies, Alemania). Para separar el retinal se usó una columna TSK gel ODS-80Ts C18 de fase reversa (Tosoh, Tokyo, Japón) con una fase móvil de solución de 90% de acetonitrilo, 10% de agua y 0.1% de acetato de amonio. El flujo fue de 1 mL min^{-1} , monitoreando el todo-*trans*-retinal a 380 nm (la absorbancia máxima del retinal).

modifications. The amount of eluted enzyme was quantified with the Bradford technique, and it was calculated the amount of (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, oxidized glutathione 0.5 mM, reduced glutathione 5 mM and L-arginine 200 mM) buffer required to thin the sample without surpassing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The required amount of buffer was stirred at 60 rpm, the protein was added dropwise, and stirring continued for 2 h at 4 °C. The solution was filtered (0.2 μm) and concentrated by centrifuge in 10 kDa centricon tubes (Sigma-Aldrich, USA). The protein obtained was used to measure *in vitro* activity.

Enzyme activity

Once the protein was renatured, its activity was measured using the method proposed by During *et al.* (1996) with some modifications. One mM of highly hydrophobic β -carotene was diluted in 10 mL of acetone with Tween 40 at 4.5 %. The mixture was homogenized using an Ultra-Turrax T25 homogenizer (IKA Labortechnik, Germany) at 10 000 rpm for 10 s. The acetone was evaporated under a nitrogen atmosphere. The mixture was diluted with distilled water until it reached a final volume of 10 mL. This β -carotene was used as a substrate for the enzyme test.

For the enzyme test, in 2 mL of buffer (for 100 mL: potassium phosphate 1.37 g, pH 7.7, magnesium chloride 0.0193 g, nicotinamide 0.211 g, glutathione 0.312 g, sodium duodesyl phosphate 0.049 g, taurocholic acid 0.322 g, L- β phosphatidylcholine 0.02 g and β -tocopherol 0.012 g), both the soluble β -carotene and the renatured protein were added, and the reaction was incubated at 37 °C for 1 h without stirring.

The reaction was ended by adding 500 μL of formaldehyde at 37%; it was incubated for 10 min and 2 volumes of acetonitrile were added. It was stirred using a vortex and incubated for 5 min in ice, then centrifuged 18 000 x g for 10 min.

The samples obtained from the enzyme tests were analyzed using HPLC to find the retinoids formed, based on During *et al.* (1996). Samples were injected in duplicate (100 μL) in the HPLC 1100 Series with diode array detector (Agilent Technologies, Germany). To separate the retinal, a TSK gel ODS-80Ts C18 reverse phase column (Tosoh, Tokyo, Japan) was used, with a 90% acetonitrile, 10% water and 0.1% ammonium acetate solution as the mobile phase. The flow was 1 mL min^{-1} , monitoring the all -*trans*-retinal at 380 nm (the maximum absorbance of retinal).

The retinal formed during the reaction was quantified by calculating the area of the elution peak in relation to an all-*trans*-retinal standard curve. All procedures involving carotenoids were carried out under soft red light and at 4 °C.

El retinal formado durante la reacción se cuantificó al calcular el área del pico de elución respecto a una curva estándar obtenida con todo-*trans*-retinal. Todos los procedimientos donde se trabajó con los carotenoides se realizaron bajo luz roja suave y a 4 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la bacteria

La banda de entre 5 y 6 kb que se observa en la electroforesis en gel de agarosa al 1%, coincide con el peso estimado de 5.7 kb (4.1 kb del vector y 1.58 kb del inserto) (Figura 1A, Carril 2). Además, se observa en Carril 3 una banda de entre 4 y 5 kb; y otra de entre 1.5 y 2 kb que coinciden con los pesos del vector vacío (4.1 kb) y del inserto (1581 pb). Estos resultados coinciden con García-López *et al.* (2012), quienes utilizaron esta misma construcción y encontraron bandas con pesos similares.

El ADN plasmídico de la *E. coli* XL1-Blue transformada con *gBCMO1* se secuenció. El resultado se analizó por medio del algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con el cual se obtuvo una identidad del 99% con el ARNm reportado para *gBCMO1* de *G. gallus* con el cambio de un nucleótido en el gen heterólogo. La secuencia de nucleótidos obtenida de la secuenciación se tradujo y el resultado obtenido se analizó con el mismo algoritmo. La identidad obtenida fue del 100% cuando se alineó con la secuencia de la proteína heteróloga de *G. gallus*.

Aunque en la secuencia de nucleótidos hubo cambio en una base, la proteína tuvo 100% de homología con la reportada para la BCMO1 de *G. gallus*. Esto se debe a que, si bien en el marco de lectura se observó el cambio de la base, esto no afectó la traducción del gen debido a que el código genético es degenerado (Laguna *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2014). Con estos resultados se concluyó que la bacteria conservó el vector y que este aún tenía el inserto, el gen que codifica para la BCMO1.

Expresión y solubilización de los cuerpos de inclusión

Una *E. coli* XL1-Blue transformada con *gBCMO1* de *G. gallus* insertado en pBAD se utilizó. Por medio del uso de esta construcción, se observó que la proteína de interés se expresó en cuerpos de inclusión.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of bacterium

A 5 to 6 kb band can be observed in the 1% agarose gel electrophoresis, which coincides with the estimated weight of 5.7 kb (4.1 kb of the vector and 1.58 kb of the insert) (Figure 1A, Lane 2). Additionally, Lane 3 shows a band between 4 and 5 kb, and another of 1.5 to 2 kb that match the weights of the empty vector (4.1 kb) and the insert (1581 pb). These results coincide with García-López *et al.* (2012), who used the same construction and found bands with similar weights.

The plasmid DNA of the *E. coli* XL1-Blue transformed with *gBCMO1* was sequenced. The result was analyzed using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algorithm. The nucleotide sequence had a 99% identity with the mRNA reported for *gBCMO1* from *G. gallus*, with the change of one nucleotide in the heterologous gene. The nucleotide sequence was translated, and the result was analyzed with the same algorithm. The identity obtained was 100% when aligned with the protein sequence in *G. gallus*.

Although there was a change of one base in the nucleotide sequence, the protein had 100% homology with that reported for the BCMO1 from *G. gallus*. This is, although the change of the base was observed in the reading frame, this did not affect the translation of the gene, since the genetic code was degenerated (Laguna *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2014). With these results, it was concluded that the bacterium kept the vector, which still included the insert, the gene that codifies for *gBCMO1*.

Expression and solubilization of the inclusion bodies

One *E. coli* XL1-Blue transformed with *gBCMO1* from *G. gallus* inserted in pBAD was used. By using this construction, the protein of interest was expressed in inclusion bodies.

Electrophoresis in 12% acrylamide gel under denaturing conditions (Figure 1B) in which the soluble protein fractions from different bacteria (transformed with pBAD-BCMO1 construct and induced with 0.2% arabinose for 4 h) were charged, showed no difference in the band pattern among the

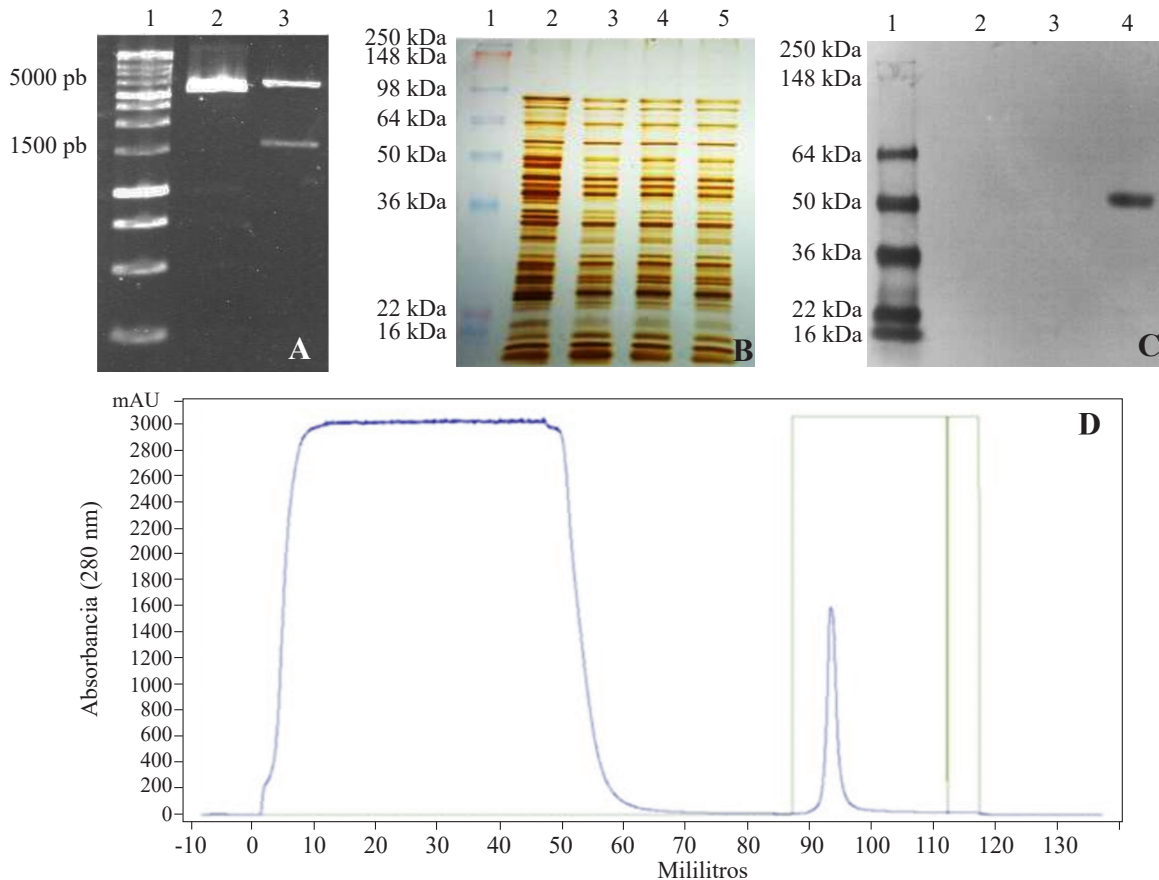


Figura 1. A. Análisis de restricción del plásmido obtenido de la *E. coli* XL1-Blue recombinante transformada con el vector pBAD inducido por arabinosa. Carril 1. Marcador de peso; Carril 2. Plásmido sin digerir; Carril 3. Plásmido digerido con *Sac*I. B. SDS-Page de las fracciones proteicas solubles de bacterias transformadas con pBAD-BCMO1. Carril 1. Marcador de peso molecular; Carril 2. Proteínas solubles de bacterias no inducidas; Carriles 3-5. Proteínas solubles de colonias inducidas. C. Identificación de las fracciones proteicas de la bacteria transformada por Western Blot. Carril 1. Marcador de peso molecular; Carril 2. Fracción proteica soluble; Carril 3. Fracción proteica insoluble de bacterias no inducidas; Carril 4. Fracción proteica insoluble de bacterias transformadas. D. Cromatograma de purificación de la BCMO1 por IMAC. La elución de la enzima se registró en el mL 93.

Figure 1. A. Restriction analysis of the plasmid obtained from the recombinant *E. coli* XL1-Blue transformed with the pBAD arabinose-induced vector. Lane 1. Weight marker; Lane 2. Undigested plasmid; Lane 3. Plasmid digested with *Sac*I. B. SDS-Page of the soluble protein fractions of bacteria transformed with pBAD-BCMO1. Lane 1. Molecular weight marker; Lane 2. Soluble proteins of non-induced bacteria; Lanes 3-5. Soluble proteins from induced colonies. C. Western Blot identification of the protein fractions of transformed bacteria. Lane 1. Molecular weight marker; Lane 2. Soluble protein fraction; Lane 3. Insoluble protein fraction from non-induced bacteria; Lane 4. Insoluble protein fraction from induced bacteria. D. Purification chromatogram of BCMO1 by IMAC. Enzyme elution was registered at the 93 mL.

La electroforesis en gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (Figura 1B) en la cual se cargaron las fracciones proteicas solubles de diferentes colonias de bacterias transformadas con la construcción pBAD-BCMO1, e inducidas en arabinosa al 0.2% por 4 h, no mostró diferencias en el patrón de bandeo entre el tratamiento control (Carril 2) y los tratados (Carril 3-5).

control treatment (Lane 2) and the others (Lanes 3-5).

Overexpression of heterologous proteins in bacterial host frequently results in the formation of insoluble protein aggregates named inclusion bodies. Despite the progress in the understanding of the structure of that proteins, their solubilization and renaturing are carried out empirically, leading to a

La sobre expresión de proteínas heterólogas con frecuencia da como resultado la formación de agregados insolubles de proteínas conocidos como cuerpos de inclusión. A pesar del avance en el entendimiento de la estructura de estas proteínas, solubilización y renaturalización se efectúan de manera empírica; lo cual conduce a una recuperación deficiente de la proteína funcional (Singh *et al.*, 2015).

El procedimiento Western Blot (Figura 1C) de los cuerpos de inclusión de las bacterias transformada sin inducir (Carril 3) e inducida (Carril 4), permitió observar que toda la enzima de interés se encontraba en la fracción proteica insoluble, mientras que el anticuerpo (anti c-Myc) no reconoció banda en la fracción proteica soluble (Carril 2).

Para la solubilización de los cuerpos de inclusión se probaron diferentes agentes desnaturalizantes, los cuales fueron guanidina (6 M), urea (8 M) y sarkosyl (0.3 % p/v), con los métodos propuestos por Singh *et al.* (2015) y Schlager *et al.* (2012). El agente desnaturalizante más eficiente fue la guanidina, la cual extrajo el 93.5% de los cuerpos de inclusión. En contraste con urea y sarkosyl, los cuales solubilizaron respectivamente el 55.6 y 42.9% de la proteína.

Purificación de la BCMO1 de *G. gallus*

Los cuerpos de inclusión obtenidos de las bacterias inducidas se solubilizaron con guanidina y se purificaron por IMAC. Al adicionar 150 mM de imidazol al amortiguador, la elución de la proteína de interés se registró en el mL 93 (Figura 1D). El porcentaje de recuperación de la proteína fue de hasta 43.1% en relación con el extracto crudo en la columna de purificación.

Las proteínas así obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot. La enzima purificada mostró una banda de aproximadamente 63 kDa, que corresponde al peso estimado de la BCMO1 de *G. gallus*, basado en los 526 aminoácidos de la estructura primaria, con la marca de hexa-histidinas en el extremo carboxilo terminal (Figura 2A).

En el procedimiento Western Blot de la Figura 2B, puede observarse a las fracciones proteicas separadas por medio de un SDS-PAGE en gel al 8% que después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal conjugado anti-Myc; en el Carril 3 y 4 se observó una banda que correspondía aproximadamente a 63 kDa.

deficient recovery of the protein function (Singh *et al.*, 2015).

The Western Blot of the inclusion bodies (Figure 1C) of non-induced (Lane 3) and induced (Lane 4) transformed bacteria, allowed to observe that the entire enzyme of interest was found in the insoluble protein fraction. Whereas the antibody (anti c-Myc) did not recognize a band in the soluble protein fraction (Lane 2).

Different protein denaturing agents were tested for the solubilization of the inclusion bodies. Guanidine (6 M), urea (8 M) and sarkosyl (0.3 % p/v), following the method proposed by Singh *et al.* (2015) and Schlager *et al.* (2012). The most efficient denaturalizing agent was guanidine, which extracted 93.5% of the inclusion bodies. In contrast with urea and sarkosyl, which respectively solubilized 55.6 and 42.9% of the protein.

Purifying the BCMO1 of *G. gallus*

The inclusion bodies obtained from the induced bacteria were solubilized with guanidine and were purified by IMAC. After adding the buffer with 150 mM of imidazole, the elution of the protein of interest was registered at the 93 mL (Figure 1D). The percentage of protein recovery was as high as 43.1% compared to the raw extract injected in the purification column.

The obtained proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot. The purified enzyme displayed a band of approximately 63 kDa, which is the estimated weight of the BCMO1 from *G. gallus*, based on the 526 amino acids of its primary structure, including the tag of hexa-histidine in the terminal carboxyl end (Figure 2A).

The Western Blot in Figure 2B shows the protein fractions separated by an 8% SDS-PAGE, which then were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with an anti-Myc conjugated monoclonal antibody; Lanes 3 and 4 displayed a band corresponding to approximately 63 kDa.

Regarding the purification procedure, three contaminating bands were observed in the purified fraction; only one was recognized by the anti-Myc antibody. When an anti-histidine antibody was used, it recognized those three bands. Due to this, it was not concluded whether they were products of degradation of the same enzyme or endogenous

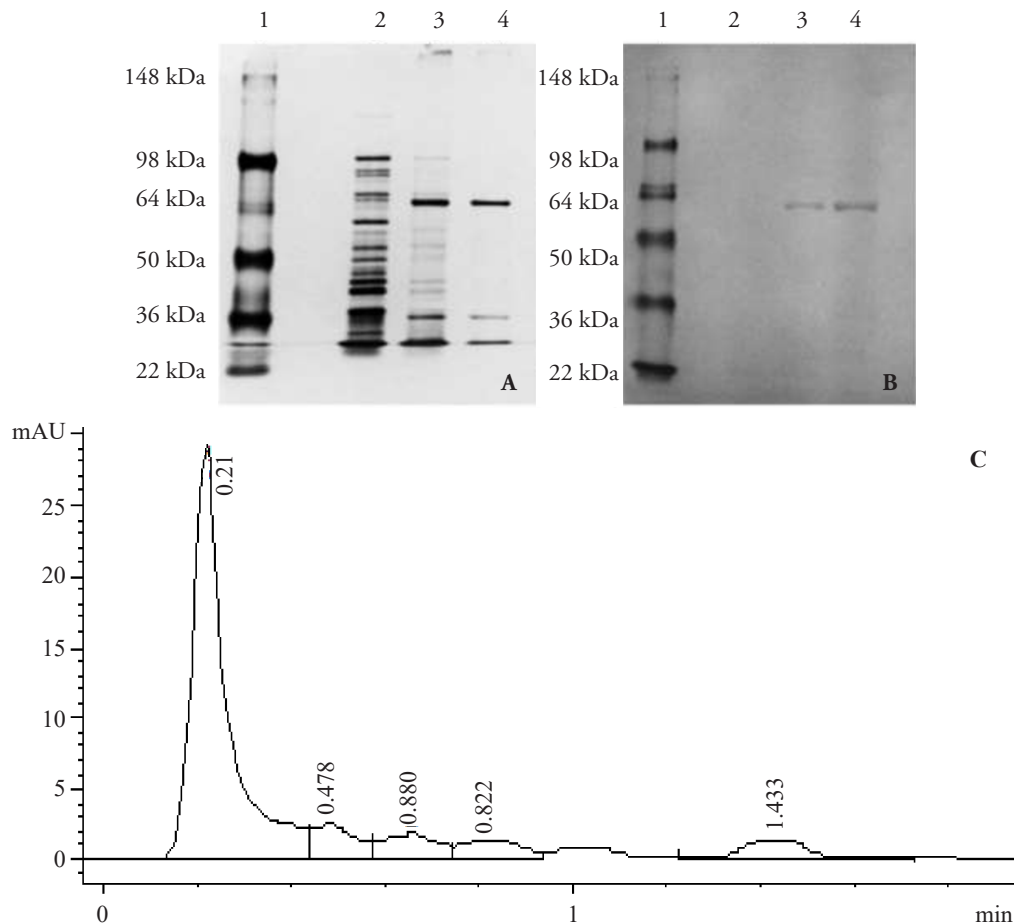


Figura 2. A. SDS-PAGE. B. Western Blot de la BCMO1 purificada; Carril 1. Marcador de Peso; Carril 2. Proteína soluble; Carril 3. Fracción insoluble de proteína (cuerpos de inclusión); Carril 4. Proteína purificada. C. Cromatograma de la elución del retinal por HPLC en fase reversa, el tiempo de retención fue de 1:43 min.

Figure 2. A. SDS-PAGE. B. Western Blot of the purified BCMO1; Lane 1. Weight marker; Lane 2. Soluble protein fraction; Lane 3. Insoluble protein fractions (inclusion bodies); Lane 4. Purified protein. C. Chromatogram of the elution of retinal by HPLC in reverse phase; retention time was 1:43 min.

En cuanto a la purificación se observaron tres bandas contaminantes en la fracción purificada, de las cuales el anticuerpo anti-Myc solo reconoció una. Cuando se utilizó un anticuerpo anti-histidinas, éste reconoció las tres bandas. Debido a esto, no se concluyó si fueron productos de degradación de la propia enzima o proteínas endógenas de la bacteria con regiones altas en histidinas; las cuales mostraron afinidad alta con la matriz de la columna de purificación.

Estos resultados son similares a los encontrados por Kim y Oh (2010), quienes utilizaron enzima de pollo insertada en el plásmido pET-24a (+) y obtuvieron una enzima pura al utilizar IMAC como primer

proteins from bacteria with high-histidine regions that displayed a high affinity with the matrix of the purification column.

These results coincide with those obtained by Kim and Oh (2010), who used chicken enzyme inserted in plasmid pET-24a (+) and obtained a pure enzyme when using IMAC as the first step and Ionic Exchange Chromatography as final step.

Renaturing the BCMO1

In this stage, with the dropwise addition of the denatured protein to the renaturing buffer at 4 °C during a slow stir (60 rpm), the concentration of the

paso y un cromatográfico de intercambio iónico como paso final.

Renaturalización de la BCMO1

En esta etapa, con la adición gota a gota de la proteína desnaturalizada al amortiguador de naturalización a 4 °C en agitación lenta (60 rpm), tanto disminuyó la concentración del agente desnaturalizante, como se mantuvo una concentración baja de proteína en solución (menor a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Cuando se añadía toda la muestra de una sola vez se formaban agregados insolubles proteicos en la solución. Por lo tanto, la mejor estrategia en la renaturalización es hacerla con la menor concentración de proteína posible. Esto para evitar la interacción de las regiones hidrofóbicas de los diferentes péptidos en solución y con ello, su agregación.

El método más eficiente para la renaturalización de la proteína se observó al utilizar L-arginina como aditivo en el amortiguador, porque disminuyó las interacciones proteína-proteína. Además, al usar glutatona oxidada y reducida se crearon las condiciones óxido reductoras adecuadas para la unión correcta de los enlaces disulfuro (Burgess y Deutscher, 2009).

Análisis por HPLC en fase reversa de la bioconversión de β -caroteno en retinal

El retinal se separó del resto de los compuestos presentes en la muestra con el uso de acetonitrilo:agua (90:10, v/v), con 0.1 % de acetato de amonio como fase móvil. El tiempo de retención fue de 1.43 min (Figura 2C). Bajo estas condiciones el β -caroteno no se co-eluyó. El límite de detección del estándar de retinal se estimó en 1 pmol 100 μL^{-1} . El tiempo del perfil de elución obtenido de la muestra de la reacción enzimática correspondió con lo observado en el estándar de todo-*trans*-retinal. Además, el pico del espectro de absorción fue similar al del estándar.

In vivo, el β -caroteno forma parte de las micelas junto con los lípidos en emulsión por acción de las sales biliares. Este β -caroteno se convierte después en retinal por la BCMO1 y esta reacción requiere agua (Mora *et al.*, 2001). Sin embargo, en condiciones *in vitro*, la naturaleza del β -caroteno es altamente hidrofóbica, y se obtienen niveles bajos de producto. Por lo tanto, la bioconversión de este compuesto en retinal se ha incrementado, en particular en mamíferos, por medio de la inclusión del sustrato en micelas

denaturation agent decreased, as a low concentration of protein in the solution was maintained (below 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). When the entire sample was added at once, insoluble protein aggregates were formed in the solution. Therefore, the best strategy in protein renaturing is to perform it with the lowest possible protein concentration. In order to avoid the interaction of the hydrophobic regions of different peptides in the solution, and thus, their accumulation. The most efficient method to protein renaturing was observed when using L-arginine as an additive in the buffer, since it reduced protein-protein interaction. Additionally, the use of oxidized and reduced glutathione created the appropriate oxidation-reduction conditions for the appropriate disulfide bonds formation (Burgess and Deutscher, 2009).

Analysis by HPLC in reverse phase of the bioconversion of μ -carotene into retinal

The retinal was separated from the rest of the compounds in the sample using acetonitrile:water (90:10, v/v), with 0.1% ammonium acetate as a mobile phase. Retention time was 1:43 min (Figure 2C). Under these conditions, the β -carotene was not co-eluted. The standard detection limit for the retinal was estimated in 1 pmol 100 μL^{-1} . The time of the elution profile obtained from the enzyme reaction sample matched the observations in the all-*trans*-retinal standard. In addition, the absorption spectrum peak was similar to that of the standard.

In vivo, the β -carotene is part of the micelles, along with the lipids in the emulsion due to the action of the bile salts. This β -carotene is then converted into retinal by the BCMO1 and this reaction requires water (Mora *et al.*, 2001). Under *in vitro* conditions, however, β -carotene is highly hydrophobic, and low product levels are obtained. Therefore, in mammals, the bioconversion of β -carotene into retinal is increased through the inclusion of the substrate in micelles to increase hydro-solubility and accessibility in aqueous solutions (Kim and Oh, 2010). In our study, the increase in the production of retinal was probably a result of increasing the solubility of β -carotene, even though a renatured protein was in other studies, in which the hydrophobicity of the β -carotene also decreased with the use of detergents, the activity reported was significantly higher compared to that obtained in our study. This probably due to the higher amount of hydrophobic amino acids in

para incrementar su hidrosolubilidad y hacerlo más accesible en soluciones acuosas (Kim y Oh, 2010). En nuestro estudio, el aumento de la producción de retinal fue un resultado probable del incremento en la solubilidad del β -caroteno, aun cuando se utilizó una proteína renaturalizada.

En otros estudios donde también disminuyó la hidrofobicidad del β -caroteno con el uso de detergentes, la actividad reportada fue significativamente mayor en comparación con la obtenida en nuestro estudio. Probablemente debido a la cantidad mayor de aminoácidos hidrofóbicos en la estructura primaria de las enzimas estudiadas (Kim *et al.*, 2010). Aquéllos corresponden al 32.8% en el caso de la BCMO1 de pollo, mientras que en las bacterias pueden formar hasta el 56.3 %. Esa actividad también puede atribuirse a que la proteína de interés no se desnaturizó al inicio del estudio mencionado (Kim *et al.*, 2010). Los métodos de renaturalización raramente son 100% efectivos en cuanto a la cantidad recuperada de proteína, así como en la recuperación de la actividad enzimática (Singh *et al.*, 2015).

En el nuestro estudio, los valores óptimos de masa molecular, secuencia de aminoácidos y de nucleótidos, pH y temperatura de catálisis de la BCMO1 de *G. gallus* fueron similares a los de otros estudios. La actividad enzimática fue 2993 (\pm 108.2) pmol mg⁻¹ de proteína por hora (n=3). Valor similar al obtenido por Wyss *et al.* (2000) sobre la misma enzima de *G. gallus*, pero inferior a los registros de Kim y Oh (2009) y Kim *et al.* (2010) (Cuadro 1).

De acuerdo con la actividad enzimática obtenida y con los cálculos realizados por el autor en un trabajo previo, un novillo en pastoreo requeriría 2.5 g de la BCMO1 purificada y renaturalizada en este estudio para degradar los 1.06 g de β -caroteno que la bacteria transformada no fue capaz de convertir en

the primary structure of the enzymes studied (Kim *et al.*, 2010). Those amino acids are 32.8% in the case of the BCMO1 in chicken, whereas they can be as high as 56.3% in bacteria. Such activity may also be due to the protein of interest was not denatured at the beginning of that mentioned study (Kim *et al.*, 2010). Renaturing methods are not totally effective regarding the recovered amount of protein, as well as in the recovery of the enzyme activity (Singh *et al.*, 2015).

In our study, optimum values of molecular weight, amino acid and nucleotide sequences, pH and catalysis temperature for the BCMO1 from *G. gallus* were similar to those found in other studies. Enzyme activity was 2993 (\pm 108.2) pmol mg⁻¹ of protein per hour (n=3). A similar value to that reported by Wyss *et al.* (2000) on the same *G. gallus* enzyme, yet lower to those recorded by Kim and Oh (2009) and Kim *et al.* (2010) (Table 1).

According to the enzyme activity obtained and to the calculations performed by the author in an earlier work, a grazing calf would require 2.5 g of the purified and renatured BCMO1 protein found in this study to degrade 1.06 g of β -carotene (the excess that was consumed and the transformed bacterium did not convert into retinal) in order to reduce the yellow pigmentation in beef fat.

CONCLUSIONS

Escherichia coli XL1-Blue transformed with the *Gallus gallus* gene for β -carotene 15,15'-monooxygenase was able to express the heterologous protein and displayed enzymatic activity *in vitro*.

By solubilizing, purifying and renaturing the β -carotene 15,15'-monooxygenase from the protein extract obtained from the *E. coli* XL1-Blue, a 63 kDa band was observed, with an enzyme activity of 2993 pmol of retinal per milligram of protein per hour.

Despite the enzyme activity found, wider validations would be required in live subjects. The activity observed is still considered insufficient to transform all the β -carotene into retinal and to reduce the yellow pigmented fat in cattle carcasses.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the funds provided through the project Num. 132088 and the

Cuadro 1. Actividad *in vitro* de la β -caroteno 15,15'-monooxygenasa (BCMO1) purificada con métodos diferentes.

Table 1. *In vitro* activity of β -carotene 15,15'-monooxygenase (BCMO1) purified by different methods.

Estudio	Actividad BCMO1
Este estudio	2993 pmol
Wyss <i>et al.</i> (2000)	2500 pmol
Kim y Oh (2009)	320 nmol
Kim <i>et al.</i> (2010)	244 nmol

retinal y disminuir así la pigmentación amarilla de la grasa de la carne.

CONCLUSIONES

La bacteria *Escherichia coli* XL1-Blue transformada con el gen de *Gallus gallus* para la β -caroteno 15,15'-monooxygenasa tuvo la capacidad de expresar la proteína heteróloga y mostró actividad enzimática *in vitro*.

Al solubilizar, purificar y renaturalizar la β -caroteno 15,15'-monooxygenasa a partir del extracto proteico obtenido de la *E. coli* XL1-Blue, se observó una banda de 63 kDa, con actividad enzimática de 2993 pmol de retinal por miligramo de proteína por hora. A pesar de la actividad enzimática detectada se requerirán validaciones más amplias en sujetos vivos. La actividad observada aún se considera insuficiente para transformar todo el β -caroteno en retinal y reducir así la pigmentación amarilla de la grasa en las canales de bovinos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado a través del proyecto No. 132088; y por la beca de postgrado otorgada a Martín Barbosa Amezcua en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

LITERATURA CITADA

- Barrón-Gutiérrez, S., C. García-Bojalil, O. Mora-Izaguirre, y A. Shimada-Miyasaka. 2012. Impacto económico de la pigmentación amarilla del tejido adiposo de bovinos en pastoreo en el trópico. *Agrociencia*. 38: 173-179.
- Burgess, R. R. and M. P. Deutscher. 2009. *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*. 2nd. Ed. Academic Press. New York, USA. 835 p.
- Cruz-Monterrosa, R. G., J. E. Ramírez-Bribiesca, M. I. Guerrero-Legarreta, and O. Hernández-Mendo. 2011. Carotenoids digestion in African Stargrass (*Cynodon plectostachyus*) determined with *in situ* techniques in cattle. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14: 1011-1017.
- D'Ambrosio, D. N., R. D. Clugston, and W. S. Blaner. 2011. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients*. 3: 63-103. <https://doi.org/10.3390/nu3010063>.
- Daley, C. A., A. Abbott, P. S. Doyle, G. A. Nader, and S. Larson. 2010. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-feed beef. *Nutr. J.* 9: 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-10>.
- During, A., A. Nagao, C. Hoshino, and J. Terao. 1996. Assay of beta-Carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase

postgraduate scholarship granted to Martín Barbosa Amezcua at Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, under Universidad Nacional Autónoma de México.

—End of the English version—

-----*-----

- high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 241: 199-205.
- García-López, E., y M. O. Mora-Izaguirre. 2011. Importancia de la expresión y actividad de la β -caroteno 15,15' monooxygenasa y la vitamina A. Su papel en la producción animal. Revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 20: 105-120.
- García-López, E., A. González-Gallardo, A. Antaramián, M. L. González-Dávalos, A. Shimada, A. Varela-Echavarría, and O. Mora. 2012. *In vitro* conversion of β -carotene to retinal in bovine rumen fluid by a recombinant b-carotene-15, 15'-monooxygenase. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 82: 94-103. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000098>.
- Grune, T., G. Lietz, A. Palou, A. C. Ross, W. Stahl, G. Tang, D. Thurnham, S. Yin, S. and H. Biesalski. 2010. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. *J. Nutr.* 140: 2268S-2285S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024>.
- Gutiérrez-González, M., C. Farías, S. Tello, D. Pérez-Etcheverry, A. Romero, R. Zúñiga, C. H. Ribeiro, C. Lorenzo-Ferreiro, and M. C. Molina. 2019. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 9: 16850. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53200-7>.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2014. Sistema de Consulta de Información Geoestadística Agropecuaria. México. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ena/2014/doc/minimonografia/prodbovena14.pdf> (Consulta: junio 2019).
- Kavran, J. M., and D. J. Leahy. 2014. Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel. *In: Methods Enzymol.* 541: 169-176. <https://doi.org/10-1016/B978-0-12-420119-4.00014-8>.
- Kim, Y. S., and D. K. Oh. 2009. Substrate specificity of a recombinant chicken b-carotene 15,15'-monooxygenase that converts b-carotene into retinal. *Biotechnol. Lett.* 31: 403-408. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9873-4>.
- Kim, Y. S. and D. K. Oh. 2010. Biotransformation of carotenoids to retinal by carotenoid 15,15'-oxygenase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:807-816. <https://doi:10.1007/s00253-010-2823-9>.
- Kim, Y. S., C. S. Park, and D. K. Oh. 2010. Hydrophobicity of residue 108 specifically affects the affinity of human beta-carotene 15,15'-monooxygenase for substrates with two ionone rings. *Biotechnol. Lett.* 32: 847-853. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0234-8>.
- Laguna, J., E. Piña, F. Martínez, J. Pardo, y H. Riveros. 2013. *Bioquímica de Laguna*. 7^a ed. Manual Moderno. México. pp: 487-513.

- Mora, O., J. L. Romano, E. Gonzalez, F. J. Ruíz, R. Gomez, and A. Shimada. 2001. Presence of fed β -carotene in digesta, excreta, blood and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. *Can. J. Anim. Sci.* 81: 133-139.
- Schlager, B., A. Straessle, and E. Hafen. 2012. Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. *BMC Biotechnol.* 95. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-95>.
- Singh, A., V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh, and A. K. Panda. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Fact.* 14: 41 <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>.
- Wyss, A., G. Wirtz, W. D. Woggon, R. Brugger, M. Wyss, A. Friedlein, H. Bachmann, and W. Hunziker. 2000. Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 334-336. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2619>.
- Yamaguchi, N., A. Sunto, T. Goda, and K. Suruga. 2014. Competitive regulation of human intestinal β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1) gene expression by hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 β and HNF-4 β . *Life Sci.* 119: 34-39. <https://doi:10.1016/j.lfs.2014.10.009>.

CYTOKININ, GIBBERELIC ACID AND DEFOLIATION ON DENSITY AND MORPHOLOGY OF TRICHOME OF *Pelargonium graveolens* L'Her FOR ESSENTIAL OIL BIOSYNTHESIS

CITOQUININA, ÁCIDO GIBERÉLICO Y DEFOLIACIÓN SOBRE DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE TRICOMAS DE *Pelargonium graveolens* L'Her PARA BIOSÍNTESIS DE ACEITE ESENCIAL

Zenzile Peter **Khetsha**¹, Moosa Mahmood **Sedibe**¹, Rudolph Johannes **Pretorius**¹, Elmarie **van der Watt**²

¹Central University of Technology, Free State. Department of Agriculture, 20 President Brand Street, Bloemfontein. South Africa. 9300. (zkhetsha@cut.ac.za). ²University of the Free State. Department of Soil, Crop and Climate Sciences, 205 Nelson Mandela Dr, Bloemfontein. South Africa. 9300.

ABSTRACT

The density and morphology of glandular trichomes in rose geranium (*Pelargonium graveolens* L'Her.) are often correlated to the essential oil biosynthesis. However, whether the different organs in the same rose geranium plant are affected by hail damage, or if they recover similarly following hail damage is still unknown concerning the essential oil biosynthesis. The objective of this study was to evaluate the effects of split-applying cytokinin (CK), gibberellic acid (GA) and defoliation on rose geranium trichome morphology and density, and essential oil biosynthesis. The experiment was carried out in a hail-net covered tunnel structure during 2017-2018 growing season. The experimental design was a complete randomized blocks with a 3x3 factorial arrangement of treatments: three defoliation levels (0, 50, and 100%), two levels of split-application of CK and GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA; and 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA), and a control. The attenuate, peltate, and capitate trichome groups were identified in the leaf. Morphologically, the attenuate trichome group was less dense on both recovered and new plant leaves, despite split-applied CK and GA treatment. With the peltate group, brevicollate trichome density declined in all plant leaves treated with 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA on both leaf surfaces. Application of 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA led to high density of the elongated-capitate type on leaves recovered from 50 and 100% defoliation. The essential oil yield was not affected by density and morphological changes of the trichomes. However, the application of 0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA increased the citronellol content where plants endured 100%

RESUMEN

La densidad y morfología de los tricomas glandulares en el geranio rosa (*Pelargonium graveolens* L'Her.) se correlacionan a menudo con la biosíntesis del aceite esencial. Sin embargo, aún se desconoce si órganos distintos de la misma planta de geranio rosa se ven afectados por el daño del granizo o si se recuperan de manera similar después del daño del granizo en relación con la biosíntesis del aceite esencial. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de citoquinina (CK) y ácido giberélico (GA) en soluciones de aplicación por separado, más la defoliación sobre morfología y densidad del tricoma del geranio rosa, y biosíntesis del aceite esencial. El experimento se llevó a cabo en una estructura de tipo túnel cubierta con una red para granizo durante la temporada de crecimiento 2017-2018. El diseño experimental fueron bloques completo al azar con un arreglo factorial de tratamientos 3x3: tres niveles de defoliación (0, 50 y 100%) y dos niveles de aplicaciones separadas de CK y GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA; y 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) y un control. Grupos de tricomas atenuados, peltados y capitados se identificaron en la hoja. Respecto a morfología, el grupo de tricomas atenuados fue menos denso, tanto en las hojas de plantas recuperadas como en las nuevas a pesar del tratamiento de aplicaciones por separado con CK y GA. Con el grupo peltado, la densidad de tricomas brevicolados disminuyó en todas las hojas de las plantas tratadas con 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA en ambas superficies de las hojas. La aplicación de 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA condujo a una densidad alta del tipo de capitado alargado en hojas recuperadas de 50 y 100% de defoliación. El rendimiento del aceite esencial no se vio afectado por la densidad y los cambios morfológicos de los tricomas. Sin embargo, la aplicación de 0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA aumentó el contenido de citronelol cuando las plantas toleraron un 100% de defoliación. Los resultados demostraron que los efectos del estrés causado por

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6133-9938>.

Received: April, 2020. Approved: May, 2021.

Published in *Agrociencia* 55: 331-346. 2021.

defoliation. Results demonstrated that the effects of hail damage stress and subsequent split-applied CK and GA could transform the morphology of trichomes, subsequently increasing the density.

Key words: Rose geranium, *Pelargonium graveolens*, hail damage, trichome, citronellol content, split-applying phytohormones.

INTRODUCTION

The environment and its changes can influence the biochemical pathways, the physiological processes that alter plant metabolism and also the glandular trichome development, and, therefore, the essential oil biosynthesis (Gâlea *et al.*, 2017; Parađiković *et al.*, 2019). Hail damage is one of the environmental stress factors which can affect the accumulation of rose geranium (*Pelargonium graveolens* L'Her.) essential oil yield and biosynthesis through defoliation (Yue *et al.*, 2019). However, whether the different organs in the same rose geranium plant recover similarly from hail damage concerning the essential oil biosynthesis is still unknown.

The recovery response mechanism of plants to hail damage, defoliation, wounding or grafting is complex, starting from upregulation of plant-stress hormones at the wound site, and later plant growth regulators to recover the lost organs (Ikeuchi *et al.*, 2017; Nanda and Melnyk, 2018). Therefore, the recovery of leaves following hail damage stress or related climate change affect the essential oil biosynthesis through the specialised structures called glandular trichomes, located on both surfaces of the leaf, and on tender stems and buds (Wang *et al.*, 2019). Rose geranium leaves are essential because of higher trichome density compared to other plant organs; thus, wounding or leaf defoliation might significantly affect the essential oil yield (Sedibe *et al.*, 2013).

Oosthuizen and Coetzee (1984) claimed that the densification of trichomes occurs as early as during leaf differentiation and continues throughout leaf development of *Pelargonium scabrum*; thus, directly affecting the essential oil yield and content. Since leaves of rose geranium are exhaustively exploited by the global perfumery, food and medicinal industries, knowledge on the recovery of essential oil yield and changes in essential oil quality to hail damage

el granizo, seguida de soluciones con CK y GA aplicadas por separado podrían transformar la morfología de los tricomas, y en consecuencia, incrementar la densidad.

Palabras clave: geranio rosa, *Pelargonium graveolens*, daño por granizo, tricoma, contenido de citronelol, fitohormonas en aplicación por separado.

INTRODUCCIÓN

El ambiente y sus cambios pueden influir en las vías bioquímicas, los procesos fisiológicos que alteran el metabolismo de las plantas y también el desarrollo del tricoma glandular y, por lo tanto, la biosíntesis de aceite esencial (Gâlea *et al.*, 2017; Parađiković *et al.*, 2019). El daño por granizo es uno de los factores de estrés ambiental que puede afectar el rendimiento del aceite esencial acumulado del geranio rosa (*Pelargonium graveolens* L'Her.) y su biosíntesis a través de la defoliación (Yue *et al.*, 2019). Sin embargo, aún se desconoce si órganos diferentes de la misma planta de geranio rosa se recuperan de manera similar del daño del granizo respecto a la biosíntesis del aceite esencial.

El mecanismo de recuperación de las plantas como respuesta al daño por granizo, defoliación, heridas o injertos es complejo. Este inicia por regular al alza las hormonas del estrés en el sitio de la herida, y luego los reguladores del crecimiento para recuperar los órganos perdidos de las plantas (Ikeuchi *et al.*, 2017; Nanda y Melnyk, 2018). Por lo tanto, la recuperación de las hojas después de daños por granizo u otros relacionados con el cambio climático, afecta la biosíntesis del aceite esencial a través de estructuras especializadas llamadas tricomas glandulares, ubicadas en ambas superficies de la hoja, en yemas y en tallos jóvenes (Wang *et al.*, 2019). Las hojas del geranio rosa son esenciales debido a su densidad de tricomas mayor en comparación con otros órganos de plantas. Por lo tanto, las heridas o la defoliación podrían afectar significativamente el rendimiento del aceite esencial (Sedibe *et al.*, 2013).

Oosthuizen y Coetzee (1984) afirmaron que la densificación de los tricomas ocurre tan pronto como se da la diferenciación foliar y continúa durante todo el desarrollo foliar de *Pelargonium scabrum*; lo cual afecta directamente el rendimiento y el contenido del aceite esencial. Dado que las hojas de geranio rosa se cosechan de manera exhaustiva para las industrias

followed by phytohormones can be important to growers and the aforementioned industries.

Cytokinin (CK) and gibberellins (GA) are some of the primary phytohormones released by plants to regulate plant recovery processes after defoliation or wounding stress (Jiao, 2016). CK is a plant growth regulator, which primarily occurs as free compounds, glucosides, or as ribosides in the plant root system, particularly in the root apex (Koprna *et al.* 2016). High CK concentrations occur during early shoot initiation, and controls meristem activity (Egamberdieva *et al.*, 2017). GA is also a plant growth regulator; it is biosynthesised in shoot apices and young leaves, acting at a later stage of plant growth and development to regulate plant cell division and shoot elongation (Sharma *et al.* 2018).

Several studies have revealed a reciprocal developmental dependence between the two hormones, where the ratio between GA and CK affects the developmental processes of the plant (Cato *et al.*, 2013; Koprna *et al.*, 2016). High CK and low GA signals are required for normal shoot apical meristem functioning (Sakamoto *et al.* 2001). On the other hand, Nanda and Melnyk (2018) observed that split-applying CK and GA directly affect the interplay between naturally activated CK and GA signals, which determines the recovery response mechanisms of the plant following wounding and defoliation.

Jiao (2016) also reported that *TEMPRANILLO* (*TEM*) 1 and 2 genes regulated signalling of CK and GA, directly affecting the trichome formation in the epidermis; however, this occurs at different times, and sequence. According to Barnes (2013), split-applying CK and GA on plants following hail damage, mechanical cutting back, and severe browsing may cause alterations on morphological features, such as increased trichome density, extensive shoot proliferation, extra-large leaves or elongated stems, and this could directly affect the essential oil yield and composition.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the response of rose geranium leaf trichome morphology and density, and the essential oil biosynthesis to defoliation and subsequent split-application of CK and GA. The hypothesis was that the application of a high concentration of split-applied CK and GA would increase the density of the trichomes and subsequently affect the essential oil biosynthesis.

alimentaria, de medicina y perfumería a nivel mundial, el conocimiento sobre la recuperación del rendimiento del aceite esencial y los cambios en su calidad debido al daño causado por el granizo seguido de fitohormonas resulta importante para productores y para las industrias mencionadas.

Las citoquininas (CK) y las giberelinas (GA) son algunas de las fitohormonas primarias liberadas por las plantas para regular los procesos de recuperación después de defoliación o estrés causado por heridas (Jiao, 2016). Las CK son reguladores del crecimiento vegetal que se presentan principalmente como compuestos libres, glucósidos o ribósidos en el sistema radical de las plantas, particularmente en el ápice de las raíces (Koprna *et al.*, 2016). Las concentraciones de CK altas ocurren durante el inicio temprano de las yemas y controlan la actividad meristemática (Egamberdieva *et al.*, 2017). GA también es un regulador del crecimiento de las plantas; se biosintetiza en los ápices de las yemas y las hojas jóvenes, actúan en una etapa posterior del crecimiento y desarrollo de las plantas para regular su división celular y el alargamiento de brotes aéreos (Sharma *et al.*, 2018).

Algunos estudios han mostrado una dependencia recíproca del desarrollo entre las dos hormonas. La relación entre GA y CK afecta los procesos del desarrollo vegetal (Cato *et al.*, 2013; Koprna *et al.*, 2016). Señales de CK altas y de GA bajas se requieren para el funcionamiento normal del meristemo apical (Sakamoto *et al.*, 2001). Por otro lado, Nanda y Melnyk (2018) observaron que la aplicación por separado de CK y GA afecta directamente la interacción entre las señales de CK y GA activadas en forma natural; esto determina los mecanismos de respuesta para la recuperación de la planta después de heridas y defoliación.

Jiao (2016) también informó que los genes *TEMPRANILLO* (*TEM*) 1 y 2 regulaban la señalización de CK y GA y afectaban directamente la formación de tricomas en la epidermis; sin embargo, esto ocurría en momentos y secuencias diferentes. De acuerdo con Barnes (2013), la aplicación por separado de combinaciones de CK y GA en plantas después de daños causados por granizo, corte mecánico y pérdida de ramas severa puede causar alteraciones en las características morfológicas, como un aumento en la densidad de tricomas, amplia proliferación de brotes, hojas extragrandes o tallos alargados; y esto podría afectar en forma directa el rendimiento y la composición del aceite esencial.

MATERIALS AND METHODS

The experimental site was located at Thitapoho farm (28° 56' S; 26° 19' E, 1307 m), situated in the Free State Province of the Republic of South Africa (RSA). This experiment was conducted in a 120 m² tunnel structure, covered with a 30% Knittex® hail net (RSA) during the 2017-2018 growing season.

Plant material and agronomic practices

Rooted rose geranium ('North Africa type') cuttings (\pm 10 cm high) were obtained from the Agricultural Research Council (Pretoria, RSA) and transplanted on September 1, 2017. Morphologically, the soil at this site is classified as a Klapmuts soil form consisting of a clay loam. Recycled tyres were used to construct elevated planting beds, each measuring 20 x 1200 x 150 cm (h x l x w). Planting beds were fertilized with 100 kg ha⁻¹ of 2:3:2 (26) NPK before transplanting. A green DPC plastic sheet (Archies Hardware, RSA) was used as mulch to suppress weed germination and to prevent possible soil contamination with the solutions. Plants were irrigated three times per week for 2 h at a time (12 mm water per plant) using a Netafim (RSA) dripper lines (300 mm spacing and a 2 L h⁻¹ delivery rate).

Experimental design and treatments

The experiment was a 3x3 factorial, arranged in a complete randomized blocks design with three replications. Treatments were three hail damage simulation levels (0, 50, and 100% manual defoliation); two levels of split-applied CK and GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA; 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) and control with distilled water, applied following the simulated defoliation treatments. Each (1 m²) experimental plot contained six plants. The row spacing was 50 cm, and 30 cm between plants.

Hail damage simulations (by manual defoliation) were executed at 14:00 on 29 December 2017, 116 d following the transplanting of the rooted cuttings. Hail was mechanically simulated according to the recommendations of the hail insurance on vegetables and commercial crops by defoliation and decapitation of all terminal buds with a pair of garden secateurs as described by Irigoyen *et al.* (2010). Fifty per cent hail damage simulation was achieved by defoliating the top half (average plant height per experimental unit) of each experimental plant. The 100% hail damage simulation treatment was achieved by total removal of rose geranium leaves. After defoliation treatments, removal of the terminal buds of stems and random bruising of the main stem and lateral branches followed, using a pair of hand secateurs at the same date. Following the hail simulation, plants

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de la morfología y densidad del tricoma de la hoja del geranio rosa y la biosíntesis del aceite esencial, a la defoliación seguida de aplicación por separado de soluciones combinadas de CK y GA. La hipótesis fue que la aplicación por separado de soluciones con concentraciones altas de CK y GA aumentaría la densidad de los tricomas y en consecuencia afectaría la biosíntesis del aceite esencial.

MATERIALES Y MÉTODOS

El sitio experimental estuvo ubicado en la finca Thitapoho (28° 56' S; 26° 19' E, 1307 m), situado en la provincia Free State de la República de Sudáfrica (RSA). Este experimento se llevó a cabo en una estructura de túnel de 120 m², cubierto con una red antigranizo Knittex® (RSA), apertura 30%, durante el ciclo de cultivo 2017-2018.

Materia vegetal y prácticas agronómicas

Esquejes de geranio rosa enraizado ('tipo del norte de África', \pm 10 cm de altura) se obtuvieron del Consejo de Investigación Agrícola (Pretoria, RSA) y se trasplantaron el 1 de septiembre de 2017. En su morfología, el suelo de este sitio está clasificado como una forma de suelo Klapmuts, que consiste en una margarcillosa. Neumáticos reciclados se utilizaron para construir camas de plantación elevadas, cada una de 20 x 1200 x 150 cm (alto x largo x ancho). Las camas de siembra se fertilizaron con 100 kg ha⁻¹ de NPK 2:3:2 (26) antes del trasplante. Una hoja de plástico DPC verde (Archies Hardware, RSA) se usó como mantillo para suprimir la germinación de malezas y evitar una posible contaminación del suelo con las soluciones. Las plantas se regaron tres veces por semana durante 2 h cada vez (12 mm de agua por planta) con líneas de goteros Netafim (RSA) (300 mm de espaciado y tasa de suministro de 2 L h⁻¹).

Diseño experimental y tratamientos

El experimento fue un factorial de 3x3, organizado en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Los tratamientos fueron tres niveles de simulación de daños por granizo (0, 50 y 100% de defoliación manual); dos niveles de aplicación por separado de soluciones con CK y GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA; 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA); y el control con agua destilada, aplicados después de los tratamientos de defoliación simulada. Cada parcela experimental (1 m²) contenía seis plantas. El espacio entre hileras fue de 50 cm y 30 cm entre plantas.

were treated with 50 mL of split-applied CK and GA from 18 to 21 January 2018.

All reagents, CK and GA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The application of CK and GA was split-applied within this period. CK treatment was applied first for 7 d (8 - 14 January 2018, at 6:00 am) and followed by GA on 14 to 21 January 2018, also for 7 d at 6:00 am. CK treatment solutions were prepared by diluting 323 and 646 μL of the stock solution into 1 L distilled water to obtain 0.32 and 0.64 mg L^{-1} , respectively. GA treatment solutions were prepared by diluting 150, and 300 μL of the stock solution into 1 L distilled water to obtain 150 and 300 mg L^{-1} concentrations, respectively. Triton x100 at 0.1% (v/v) was added to the stock solution as a wetting agent. The same irrigation procedure was repeated at the control treatment, but the CK and GA solutions were omitted.

Data collection

Seventy-five days after the phytohormonal treatments, pieces of leaf samples (1 cm^2) were collected from the eighth middle-most leaf (from the bottom) to examine the trichome morphology and density per cm^2 , following methods described by Sedibe *et al.* (2013). Data was collected on a cloudless day, between 10:00 am and 11:00 am. The samples were examined using a Shimadzu SSX-550 (Kyoto, Japan) scanning electron microscope set at 400X μm magnification. Morphology and density of trichome groups were characterised and counted from digital photos obtained from a computer connected to the scanning electron microscope, by opening the saved photo files in Photoshop 7 Savvy (Sybex San Francisco, USA).

Rose geranium essential oil was extracted from three mature plants using a custom-built steam distillation unit at 98 °C for 1 h. The extracted essential oil was analysed using gas chromatography (GC) (Agilent 7890B), equipped with a 30 x 0.25 mm x 0.25 μm column (Agilent 19091S 433 UI, HP5-MS UI) and a mass selective detector (Agilent 5977A). The oven temperature program was maintained at 60 °C for 10 minutes (min). The temperature was increased to 100 °C at a rate of 2°C per min, and then to 145 °C at a rate of 1 °C per min. Finally, the temperature was increased to 300 °C at a rate of 20 °C per min and then run for 2 min. Helium was used as carrier gas at a constant flow of 0.67 mL per min.

Spectra were obtained by electron impact at 70 eV, scanning from 35 m/z to 550 m/z. The peak areas of the selected GC constituents were individually expressed as percentages of all the Total Ion Chromatogram (TIC) peak areas, as determined by mass spectrometry detection (MSD at 250 °C) without using correction factors. The compounds were identified using the NIST11 mass spectral library. The extracted essential oil was

Las simulaciones de daños por granizo por medio de defoliaciones manuales iniciaron a las 14:00 h del 29 de diciembre de 2017, 116 d después del trasplante de los esquejes enraizados. El granizo se simuló mecánicamente de acuerdo con las recomendaciones del seguro contra granizo en hortalizas y cultivos comerciales mediante la defoliación y decapitación de todas las yemas foliares terminales, con tijeras de podar de jardín, como lo describen Irigoyen *et al.* (2010). Una simulación del 50% de los daños causados por el granizo se obtuvo por medio de defoliación de la mitad superior (altura promedio de la planta por unidad experimental) de cada planta experimental. El tratamiento de simulación de daños por granizo al 100% se logró con la eliminación total de las hojas de geranio rosa. Luego de los tratamientos de defoliación, se procedió a la extracción de los brotes terminales de los tallos y a la rotura aleatoria del tallo principal y las ramas laterales, con un par de tijeras de podar manuales en la misma fecha. Después de la simulación de daño por granizo, las plantas se trataron con aplicaciones separadas de 50 mL de las soluciones de CK y GA, del 18 al 21 de enero de 2018.

Todos los reactivos CK y GA se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). La aplicación de CK y GA fue por separado dentro de este período. El tratamiento con CK se aplicó primero durante 7 días (8 - 14 de enero de 2018, a las 6:00 am), seguido de GA del 14 al 21 de enero de 2018, también durante 7 d a las 6:00 am. Las soluciones de tratamiento de CK se prepararon diluyendo respectivamente 323 y 646 μL de la solución madre en 1 L de agua destilada para obtener 0.32 y 0.64 mg L^{-1} . Las soluciones de tratamiento de GA se prepararon diluyendo 150 y 300 μL de la solución madre en 1 L de agua destilada para obtener concentraciones de 150 y 300 mg L^{-1} , respectivamente. Como agente humectante se agregó Triton x100 al 0.1% (v/v) a la solución madre. El mismo procedimiento de riego se efectuó en el tratamiento control, pero se omitieron las soluciones de CK y GA.

Recopilación de datos

Setenta y cinco días después de los tratamientos con fitoreguladores se recolectaron trozos de muestras de hojas (1 cm^2) de la octava hoja ubicada más al medio (desde la parte inferior) para examinar la morfología y densidad de tricomas por cm^2 , siguiendo los métodos descritos por Sedibe *et al.* (2013). Los datos se registraron en un día despejado, entre las 10:00 am y las 11:00 am. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de barrido Shimadzu SSX-550 (Kyoto, Japón), con un aumento en micrómetros (μm) de 400X. La morfología y densidad de los grupos de tricomas se caracterizaron y contaron a partir de fotografías digitales obtenidas de una computadora conectada al microscopio electrónico de barrido, los archivos de microfotografías

quantified using an Agilent 7890B gas chromatograph, and the characterisation of rose geranium ('North Africa type') essential oil quality variables followed the ISO 47312012 [E] standard.

For commercial purpose, only six compounds are determined: linalool, citronellol, geraniol, citronellyl formate, geranyl formate, and guaia-6,9-diene. The relative proportion of these compounds determines the odour quality of the oil. However, the citronellol: geraniol (C:G ratio) is used by the perfumery industry to determine the oil quality. Oil mass (yield) was determined by weighing the oil volume using a PGL 2002 Adam scale (USA) immediately following extraction.

All variables were statistically analysed and compared using PROC GLIMMIX, SAS version 9.4 (PROC GLIMMIX, SAS Institute Inc., 2013). Treatments were compared with Tukey test ($p \geq 0.05$). The Shapiro-Wilks test was performed to test for any deviations of data from the normal distribution.

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf samples were collected from recovered rose geranium to study the density and morphology of the trichome relationship with the essential oil biosynthesis following treatment with split-applied CK and GA. Regardless of any split-applied CK and GA after defoliation, two groups of trichomes were observed on the rose geranium leaves. One group consisted of one type of non-glandular trichome, which is regarded as an attenuated kind (Figure 1A). The attenuated trichome is characterised by the long and gradual taper (Payne, 1978).

The second group consisted of three types of glandular trichomes, of which one type belonged to the peltate kind. The peltate kind was characterised by a short neck with bigger round tips and regarded as the brevicollate trichome (Figure 1B) (Payne, 1978). The other two types belong to the capitate kind. One capitate kind consisted of a smaller trichome type, characterised by a short segmented capitate with a columnar hatchet-shaped tip that has a slightly bent apical cell pointing at the leaf apex, known as the asciiform trichome type (Figure 1C) (Payne, 1978). The second capitate kind consisted of elongated segment flask-shaped bodies that incorporated a round head, having similar characteristics as the asciiform and was regarded as the elongated-capitate type (Figure 1D).

Variation in trichome types may play a different role in plant physiology and ecology with variable morphological, mechanical and phytochemical

se guardaron en formato de archivos Photoshop 7 Savvy (Sybex San Francisco, EE.UU.).

El aceite esencial de geranio rosa se extrajo de tres plantas maduras con el uso de una unidad de destilación de vapor hecha a medida, a 98 °C durante 1 h. El aceite esencial extraído se analizó por cromatografía de gases (GC) (Agilent 7890B), equipada con una columna de 30 x 0.25 mm x 0.25 μ m (Agilent 19091S 433 UI, HP5-MS UI) y un detector selectivo de masas (Agilent 5977A). El programa de temperatura del horno se mantuvo a 60 °C durante 10 minutos. La temperatura se aumentó a 100 °C en tasa de incremento de 2 °C por minuto, y luego a 145 °C a una tasa de 1 °C por minuto. Por último, la temperatura se incrementó a 300 °C a una tasa de 20 °C por minuto que se mantuvo durante 2 min; se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 0.67 mL por minuto.

Los espectros lumínicos se obtuvieron por el impacto de electrones a 70 eV, con barridos desde 35 m/z hasta 550 m/z. Las áreas de los picos de los constituyentes GC seleccionados se expresaron como porcentajes individuales de los picos de las áreas del Cromatograma Total de Iones (TIC), según lo determinado por la detección por espectrometría de masas (MSD a 250 °C) sin utilizar factores de corrección. Los compuestos se identificaron al usar la biblioteca espectral de masas NIST11. El aceite esencial extraído se cuantificó con un cromatógrafo de gases Agilent 7890B, y la caracterización de las variables de calidad del aceite esencial de geranio rosa (tipo "Norte de África") siguió la norma ISO 47312012 [E].

Para usos comerciales solo se determinan seis compuestos: linalol, citronelol, geraniol, formiato de citronelilo, formiato de geraniol y guaya-6,9-dieno. La proporción relativa de estos compuestos determina la calidad del aroma del aceite. Sin embargo, la industria de la perfumería solo utiliza la relación citronelol: geraniol (proporción C:G) para determinar la calidad del aceite. El rendimiento del aceite (en unidades de masa) se determinó con el peso del volumen de aceite en una báscula PGL 2002 Adam (EE. UU.) de inmediato después de la extracción.

Todas las variables se analizaron y se compararon estadísticamente con el PROC GLIMMIX, SAS versión 9.4 (PROC GLIMMIX, SAS Institute Inc., 2013). Los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La prueba de Shapiro-Wilks se realizó para probar cualquier desviación de los datos de la distribución normal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestras de hojas del geranio rosa recuperado se colectaron para estudiar la densidad y morfología de la relación de los tricomas con la biosíntesis del aceite esencial después de los tratamientos con CK y GA

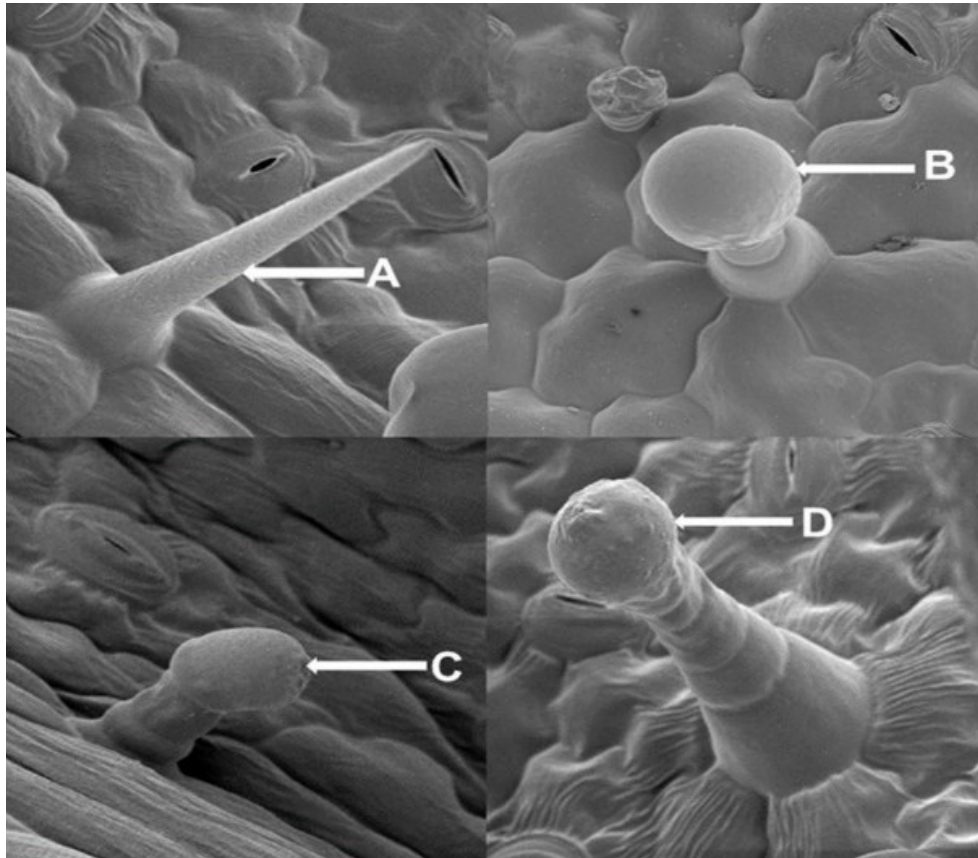


Figure 1. The four different types of trichomes found on the leaves of rose geranium as observed under a scanning electron microscope (400X magnifications) (Thitapoho farm, Tweespruit). A: non-glandular trichome; B: Brevicollate trichome; C: Asciform trichome; D: Elongated-capitate trichome.

Figura 1. Los cuatro tipos diferentes de tricomas que se encontraron en las hojas del geranio rosa, observados bajo un microscopio electrónico de barrido (aumento 400X) (área productora Thitapoho, Tweespruit). A: tricoma no glandular; B: tricoma brevicollado; C: tricoma asciiforme; D: tricoma capitado alargado.

characteristics (Ma *et al.*, 2016). Thus, as evidenced in Figure 2 (micrograph 1, 2 and 3), all trichome group types were densely spaced on the abaxial leaf surface and scattered on the adaxial leaf surface. However, the attenuated trichome group tended to occur more densely near the midrib on the abaxial leaf surface, as shown in Figure 2 (micrograph 1, 2 and 3 on B, D and F). The hemispherical peltate trichome group tended to occur evenly spaced on the abaxial leaf blade surface but was mostly absent from the epidermis above the midrib vein.

Dense populations of trichomes on the abaxial leaf surface could be associated with the promotion of photosynthetic competence and establishment of phytochemical defence of leaves when mature (Ma *et al.*, 2016). Interestingly, the developmental pattern

aplicados por separado. Con independencia de cualquiera de las dosis CK y GA aplicadas por separado después de la defoliación, se observaron dos grupos de tricomas en las hojas de geranio rosa. Un grupo consistió en un tipo de tricoma no glandular que se considera de tipo atenuado (Figura 1A). El tricoma atenuado se caracteriza por un ahusamiento prolongado y gradual (Payne, 1978).

El segundo grupo consistió de tres tipos de tricomas glandulares, de los cuales un tipo pertenecía al tipo peltado. El tipo peltado se caracterizaba por un cuello corto con puntas redondas más grandes y se consideró como tricoma brevicollado (Figura 1B) (Payne, 1978). Los otros dos tipos pertenecen al grupo de los capitados. Un tipo de capitado consistió en un tipo de tricoma más pequeño, caracterizado por

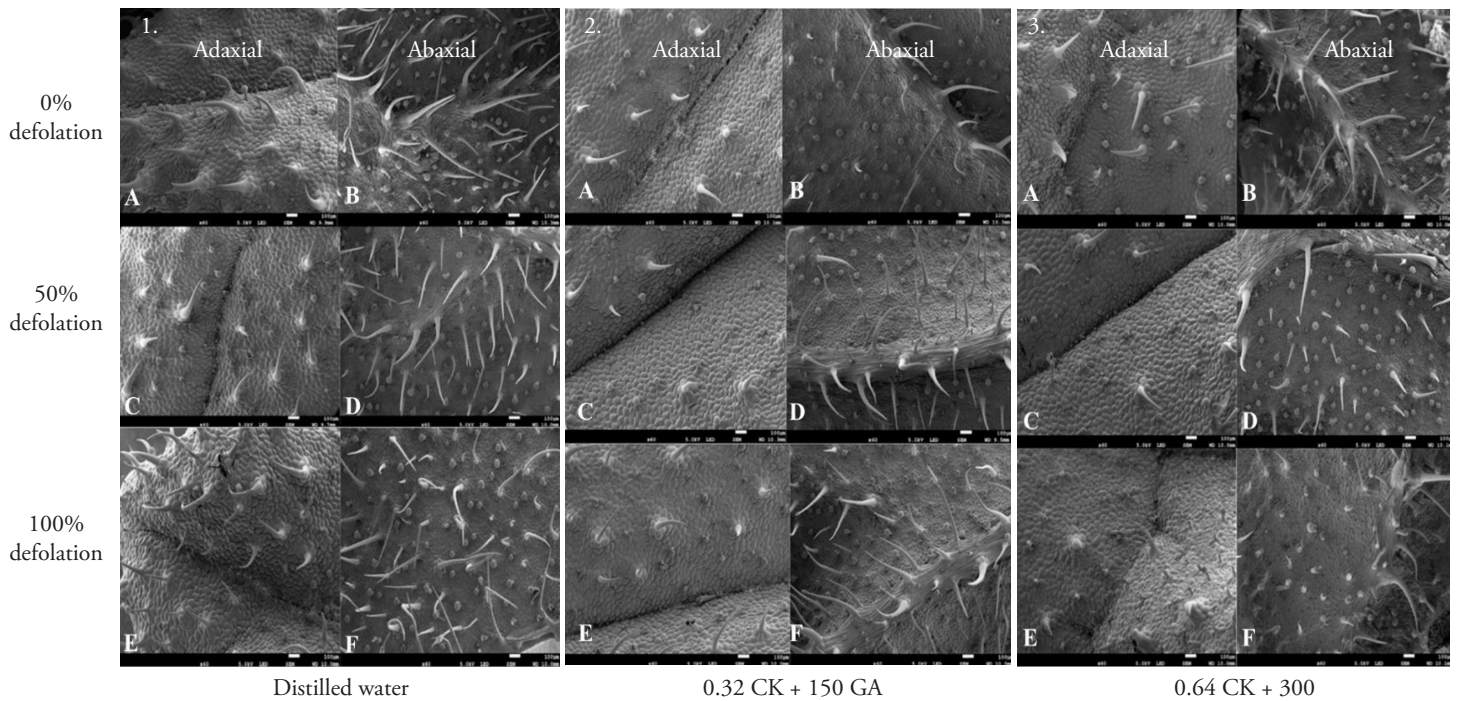


Figure 2. Newly developed leaf from the 0% defoliation (A and B), 50% (C and D) and 100% (E and F) defoliated rose geranium plants treated with distilled water (1.), split-applied $0.32 \text{ mg L}^{-1} \text{ CK} + 150 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}$ (2.), and split-applied $0.64 \text{ mg L}^{-1} \text{ CK} + 300 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}$ (3.) as observed under a scanning electron microscope (60X; $100 \mu\text{m}$).

Figura 2. Hoja recién desarrollada de las plantas de geranio rosa defoliadas al 0% (A y B), al 50% (C y D) y al 100% (E y F) defoliadas, tratadas con agua destilada (1.), aplicación por separado de $0.32 \text{ mg L}^{-1} \text{ CK} + 150 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}$ (2.), y aplicación por separado de $0.64 \text{ mg L}^{-1} \text{ CK} + 300 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}$ (3.), según se observó en un microscopio electrónico de barrido (60X; $100 \mu\text{m}$).

differed between the leaf surfaces of rose geranium. Similar heteroblastic series of trichomes patterns were observed on a rose geranium leaf, and this was claimed to be a genetic control by Romitelli and Martins (2013).

The density of trichomes may vary with variations in the environmental conditions, indicating the trade-offs between trichome traits, mainly to increase the resistance and the cost of trichome production (Ma *et al.*, 2016). In our study, the non-glandular trichomes were not considered since they are not associated with essential oil biosynthesis.

The density of brevicollate trichome on both leaf surfaces significantly declined with high concentrations of split-applied CK and GA (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA), as shown in Tables 1 and 2. No studies could be found in the literature about the effects of split-applying CK and GA on the brevicollate trichome density. However, Liu *et al.* (2017) reported that the unspecified glandular trichome density per cm² on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves decreased with up to 50 trichomes when plants were treated with 17.3 mg L⁻¹ GA. Thus, the decline in the brevicollate trichome density in this study could be due to the GA application at the later stage.

The interaction between the defoliation and split-applying CK and GA concentrations affected the asciform trichome density on both leaf surfaces (Tables 1 and 2). A difference of nine asciform trichomes less on the adaxial leaf surface was recorded when a lower concentration of CK + GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA) was split-applied where plants endured 50% defoliation (Table 1). On the abaxial leaf surface, the asciform trichome density varied because of defoliation and split-applying CK and GA; however, these effects were not statistically different when compared to the control (Table 2). In this study, the density of the asciform trichome group differed between the leaf surfaces, as the abaxial leaf position had significantly ($p \leq 0.02$) higher asciform trichome density.

Reduced density of asciform trichome group on the adaxial leaf surface resulted from the transformation of the asciform trichome into elongated-capitate trichome, of which the increase in density is illustrated in Table 1. The combination of endogenous developmental programmes and the external signals regulates the developmental

un segmento capitado corto con una punta columnar en forma de hacha que tiene una célula apical ligeramente doblada que apunta al ápice de la hoja, conocido como tricoma asciforme (Figura 1C) (Payne, 1978). El segundo tipo de capitado consistió en cuerpos con segmentos alargados en forma de matraz que culminan en una cabeza redonda, con características similares al asciforme y se consideró como tipo capitado alargado (Figura 1D).

La variación en los tipos de tricomas puede desempeñar un papel diferente en la fisiología y ecología de las plantas con características morfológicas, mecánicas y fitoquímicas variables (Ma *et al.*, 2016). Por lo tanto, como se evidencia en la Figura 2 (microfotografía 1, 2 y 3), todos los tipos de grupos de tricomas estaban densamente espaciados en la superficie abaxial de la hoja y dispersos en la superficie adaxial. Sin embargo, el grupo de tricomas atenuados tendió a ocurrir más densamente cerca de la nervadura central en la superficie abaxial de la hoja, como se muestra en la Figura 2 (B, D y F en las microfotografías 1, 2 y 3). El grupo de tricomas peltados hemisféricos tendió a aparecer con espaciamiento uniforme espaciado en la superficie abaxial de la lámina de la hoja, pero en su mayoría estuvo ausente de la epidermis superior de la nervadura central.

Poblaciones densas de tricomas en la superficie abaxial de la hoja podrían estar relacionadas con la promoción de la competencia fotosintética y el establecimiento de la defensa fitoquímica en la madurez de las hojas (Ma *et al.*, 2016). El patrón de desarrollo difirió entre las superficies de las hojas del geranio rosa, lo cual es interesante. Series heteroblásticas similares a patrones de tricomas se observaron en las hojas de geranio rosa; Romitelli y Martins (2013) afirmaron que esto se debía un control genético.

La densidad de los tricomas puede variar con los cambios en las condiciones ambientales, esto indica que hay compensaciones entre los rasgos de los tricomas, principalmente para aumentar la resistencia en relación con el costo de producción de los tricomas (Ma *et al.*, 2016). En nuestro estudio, los tricomas no glandulares no se consideraron ya que no están relacionados con la biosíntesis del aceite esencial.

La densidad del tricoma brevicollado en ambas superficies de las hojas disminuyó significativamente con las altas concentraciones de CK y GA (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) aplicadas por separado, tal como se muestra en los Cuadros 1 y 2. No se

Table 1. Effects of defoliation and split-application of combined solutions CK and GA on density of glandular trichome observed on the adaxial leaf surface of rose geranium plant leaf (Thitapoho farm, Tweespruit).

Cuadro 1. Efectos de la defoliación y la aplicación por separado de soluciones combinadas de CK y GA sobre la densidad de los tricomas glandulares observados en la superficie adaxial de la hoja de plantas de geranio rosa (área productora Thitapoho, Tweespruit).

Treatments	Elongated Capitata	Asciiform	Brevicollate
Defoliation			
0% defoliation	17.77 ± 1.05 b	5.55 ± 2.24 c	41.88 ± 15.16 a
50% defoliation	24.00 ± 1.49 b	9.88 ± 4.53 a	47.66 ± 12.45 a
100% defoliation	38.66 ± 1.15 a	7.66 ± 2.00 b	34.44 ± 11.59 a
F-value	12.97	10.50	2.72
P-value	0.01	0.01	0.09
CK + GA			
Distilled water	18.88 ± 0.62 b	10.22 ± 3.39 a	47.11 ± 16.35 a
CK 0.32 + GA 150	24.77 ± 1.17 b	5.77 ± 1.71 b	45.22 ± 13.18 a
CK 0.64 + GA 300	36.77 ± 1.23 a	7.11 ± 3.21 b	31.66 ± 11.15 b
F-value	9.37	11.64	4.39
P-value	0.01	0.01	0.02
Defoliation x CK + GA			
F-value	10.49	3.74	0.45
P-value	0.02	0.02	0.77

Means with different letter in a column are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Letras diferentes en medias por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

Table 2. Effects of defoliation and split-application of CK and GA on density of glandular trichome observed on the abaxial leaf surface of rose geranium plant leaf (Thitapoho farm, Tweespruit).

Cuadro 2. Efectos de la defoliación y las aplicaciones separadas de CK y GA sobre la densidad de los tricomas glandulares observados en la superficie abaxial de las hojas de plantas de geranio rosa (área productora Thitapoho, Tweespruit).

Treatments	Elongated Capitata	Asciiform	Brevicollate
Defoliation			
0% defoliation	1.33 ± 3.22 a	13.55 ± 5.63 b	17.88 ± 4.91 a
50% defoliation	2.11 ± 2.08 a	25.88 ± 6.64 a	18.55 ± 4.97 a
100% defoliation	2.88 ± 1.40 a	17.00 ± 7.33 b	16.77 ± 9.20 a
F-value	3.44	12.40	0.35
P-value	0.06	0.01	0.71
CK + GA			
Distilled water	0.66 ± 0.51 b	18.11 ± 5.15 a	21.00 ± 6.85 a
CK 0.32 + GA 150	1.77 ± 0.76 b	16.88 ± 9.70 a	19.88 ± 5.23 a
CK 0.64 + GA 300	3.88 ± 1.11 a	21.44 ± 9.35 a	12.33 ± 3.31 b
F-value	15.23	1.70	9.53
P-value	0.01	0.21	0.01
Defoliation x CK + GA			
F-value	9.51	3.42	2.09
P-value	0.01	0.03	0.12

Means with different letter in a column are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Letras diferentes en medias por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

distribution of trichomes on plant leaves (Xue *et al.*, 2019). Thus, under extreme external stimuli such as complete defoliation (100%), the endogenous phytohormones are only synchronised to regenerate the lost material, and directly affect leaf expansion and the trichome developmental rate.

GA is the first phytohormone molecule that regulates the initiation and morphogenesis of trichome development, followed by CK. Thus, activities associated with asciform trichome development could also be attributed to a high concentration of 300 mg L⁻¹ GA applied in the later stage than the 0.64 mg L⁻¹ CK applied earlier following the wounding and defoliation stimuli.

According to Zhou *et al.* (2013), this could be associated with the activities of *ZFP6* and *ZFP5* transcription factors from GA and CK, respectively. GA could have activated the transcription of the *ZFP6* gene earlier, being a member of the large *C2H2* regulatory gene family; then followed by CKs promotion of the *ZP6*, *ZFP8*, and *GIS2* expression later. Therefore, CK could have been involved with auxin in the restoration of the plant material rather than development of trichome at an early stage; while GA could have initiated trichome development (Ma *et al.*, 2016; Fambrini and Pugliesi, 2019). Jiao (2016) reported the accumulation of GA through *TEM 1* and *2* genes in the mesophyll cells, but not in the epidermis, suggesting that the homeostasis and distribution of GA in the mesophyll cells affect the trichome formation in the epidermis. *TEMs* also regulate signalling of CK at the later stage through *MYB/bHLH/WD* activator complex, phytohormones that also promote trichome formation (Zhou *et al.*, 2013; Fambrini and Pugliesi, 2019).

The interaction between the defoliation and split-applying CK and GA concentrations affected the elongated-capitate trichome density on both leaf surfaces (Table 1 and 2). On the adaxial leaf surface, the density of the elongated-capitate trichome was increased ($f=2.66$; $p\leq 0.002$) by 25.6 trichomes where lower concentrations of split-applied CK and GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA) were applied (Table 1). This occurred where plants endured 50% defoliation; however, this was not statistically different compared to higher concentrations (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) of split-applied CK and GA. This interaction was not observed where plants endured extreme defoliation extent (100%).

encontraron estudios en la literatura sobre los efectos de la aplicación por separado de CK y GA sobre la densidad de tricomas brevicolados. Sin embargo, Liu *et al.* (2017) informaron sobre la densidad de tricomas glandulares no especificados por cm² en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) disminuyó hasta en 50 tricomas cuando las plantas se trataron con 17.3 mg L⁻¹ GA. Por lo tanto, la disminución en la densidad de tricomas brevicolados en este estudio podría deberse a la aplicación de GA en la etapa más tardía.

La interacción entre la defoliación y las concentraciones de CK y GA aplicadas por separado afectó la densidad de tricomas asciformes en las dos superficies de las hojas (Cuadros 1 y 2).

Una diferencia de nueve tricomas asciformes menos en la superficie adaxial de la hoja se registró cuando se aplicó por separado la concentración más baja de CK + GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA), con ella las plantas toleraron una defoliación del 50% (Cuadro 1). En la superficie abaxial de la hoja, la densidad del tricoma asciforme varió debido a la defoliación y la aplicación de CK y GA por separado; sin embargo, estos efectos no mostraron diferencia estadística en comparación con el control (Cuadro 2). En nuestro estudio, la densidad del grupo de tricomas asciformes difirió entre las superficies de las hojas, ya que la posición abaxial de la hoja tuvo una densidad de tricomas asciformes significativamente ($p\leq 0.02$) mayor.

La reducción en la densidad del grupo de tricomas asciformes en la superficie adaxial de la hoja resultó de la transformación de tricomas asciformes en tricomas capitados alargados, cuyo aumento de densidad se incluyó en el Cuadro 1. La combinación del programa endógeno para el desarrollo y las señales externas regulan la distribución de los tricomas de las hojas durante el desarrollo de la plantas (Xue *et al.*, 2019). Así, bajo estímulos externos extremos como una defoliación completa (100%), los fitorreguladores endógenos solo se sincronizan para regenerar el material perdido y afectan directamente la expansión foliar y la tasa de desarrollo de los tricomas.

La molécula GA es el fitorregulador principal que regula el inicio y la morfogénesis del desarrollo de tricomas, seguido de CK. Por lo tanto, las actividades relacionadas con el desarrollo de tricomas asciformes también podrían atribuirse a una concentración alta de 300 mg L⁻¹ de GA aplicada en una etapa posterior a los 0.64 mg L⁻¹ de CK aplicados antes, luego del estímulo de daños por cortes y defoliación.

On the abaxial leaf surface, the elongated-capitate trichome density was significantly increased by 4 ($p \leq 0.01$) and 6.6 trichomes ($p \leq 0.001$) on plants that endured 50 and 100% defoliation compared to the control, respectively (Table 2).

The increase in elongated-capitate trichome density occurred when plants were treated with a high concentration of split-applied CK and GA (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA). From this study, the density of the elongated-capitate trichome significantly ($p \leq 0.02$) differed between the leaf surfaces, for which the adaxial leaf surface had a higher density of elongated-capitate trichome group compared to the abaxial surface occurring at any level of defoliation (50 or 100%).

Although the developmental stages of capitate trichome type were not observed in this study, split-applied CK and GA regardless application level stimulated the elongation of the asciiform trichome stalk to form the elongated-capitate trichome, mostly where plants endured defoliation (50 and 100%). Therefore, this could indicate that split-applied CK and GA on newly developed rose geranium leaves stimulate the transformation of the asciiform trichomes into the elongated-capitate trichomes. Barnes (2013) reported that changes in the endogenous ratios of split-applying CK and GA often cause alterations on morphological features such as extra-large leaves or elongated stems, and extensive shoot proliferation where plants endured biotic and abiotic stresses. In our study, this could have been the case, where the asciiform trichome could have traded-off its morphology to respond to defoliation and split-applied CK and GA.

The glandular cell at the tip of the trichome, the head cell, displays many ultrastructural features for which is their ability to synthesise and secrete large amounts, relative to their size, of a limited number of specialized metabolites (Hulchemann *et al.*, 2017). In our study, elongated-capitate trichome is a stretched out asciiform trichome, containing a shrivelled head, which could indicate a lack of stored essential oil in their sub-cuticular spaces. Also, Eiasu *et al.* (2009) reported that the capitate group lack stored essential oil in their sub-cuticular spaces compared to the brevicollate trichome. Thus, the non-significant results on the essential oil yield traits were attributed to the declined peltate and increased capitate trichome results (Table 3).

Según Zhou *et al.* (2013), esto podría estar relacionado con las actividades de los factores de transcripción *ZFP6* y *ZFP5* del GA y CK, respectivamente. GA podría haber activado la transcripción del gen *ZFP6* antes, por ser un miembro de la gran familia de genes reguladores *C2H2*; seguida más tarde por la promoción de la expresión de los transcritos *ZP6*, *ZFP8* y *GIS2* del CK. Por lo tanto, la CK pudo haber estado involucrada con la auxina en la restauración del material vegetal más que con el desarrollo de tricomas en una etapa temprana; mientras que GA pudo haber iniciado el desarrollo de los tricomas (Ma *et al.*, 2016; Fambrini y Pugliesi, 2019). Jiao (2016) observó la acumulación de GA a través de los genes *TEM 1* y *2* en las células del mesófilo, pero no en la epidermis; esto sugiere que la homeostasis y la distribución de GA en las células del mesófilo afectan la formación de tricomas en la epidermis. Los TEMs también regulan la señalización de la CK en la etapa tardía a través del complejo activador *MYB/bHLH/WD*, fitorreguladores que también promueven la formación de tricomas (Zhou *et al.*, 2013; Fambrini y Pugliesi, 2019).

La interacción entre la defoliación y las concentraciones de CK y GA en aplicación por separado afectó la densidad de tricomas capitados alargados en ambas superficies de las hojas (Cuadros 1 y 2). En la superficie adaxial de la hoja, la densidad de los tricomas capitados alargados aumentó ($f=2.66$; $p \leq 0.002$) en 25.6 tricomas, cuando se aplicaron por separado las concentraciones más bajas de CK y GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA) (Cuadro 1). Esto ocurrió cuando las plantas sufrieron una defoliación del 50%; sin embargo, esto no mostró diferencia estadística en comparación con las concentraciones más altas de CK y GA (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) aplicadas por separado. Esta interacción no se observó cuando las plantas sufrieron una defoliación extrema (100%).

En la superficie de la hoja abaxial, la densidad de tricomas capitados alargados aumentó significativamente en 4 ($p \leq 0.01$) y 6.6 tricomas ($p \leq 0.001$) en plantas que soportaron 50 y 100% de defoliación en comparación con el control, respectivamente (Cuadro 2).

El aumento en la densidad de tricomas capitados alargados se produjo cuando las plantas se trataron con una concentración alta de CK y GA en aplicaciones separadas (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA). De acuerdo con nuestro estudio, la densidad

Table 3. Effects of defoliation and split-application of CK and GA on essential oil yield attributes of rose geranium (Thitapoho farm, Tweespruit).**Cuadro 3. Efectos de la defoliación y la aplicación por separado de CK y GA sobre los atributos del rendimiento de aceite esencial de geranio rosa (área productora Thitapoho, Tweespruit).**

Treatments	Oil mass (g)	Oil content (%)
Defoliation		
0% defoliation	0.14 ± 0.04 a	0.10 ± 0.03 a
50% defoliation	0.15 ± 0.07 a	0.13 ± 0.06 a
100% defoliation	0.11 ± 0.05 a	0.14 ± 0.08 a
F-value	1.58	0.98
P-value	0.23	0.39
CK + GA		
Distilled water	0.15 ± 0.07 a	0.14 ± 0.05 a
CK 0.32 + GA 150	0.13 ± 0.04 a	0.12 ± 0.04 a
CK 0.64 + GA 300	0.12 ± 0.06 a	0.12 ± 0.09 a
F-value	0.82	0.16
P-value	0.45	0.85
Defoliation x CK + GA		
F-value	0.57	0.26
P-value	0.69	0.89

Means with different letter in a column are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Letras diferentes en medias por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

In this study, only the relative proportion of citronellol and geraniol were discussed to determine the essential oil quality. Linalool, citronellyl formate, geranyl formate, and guaia-6,9-diene were not affected by the defoliation treatments (data not showed). Moreover, geraniol content and the citronellol and geraniol ratio (C:G ratio) were also not affected by the treatments (Table 4).

A significant interaction was observed between defoliation levels and the different concentrations of split-applied CK and GA on the citronellol content (Table 4). Citronellol content ($p \leq 0.0002$) also tended to increase by 4.6% compared to the control when plants endured 100% defoliation and subsequently treated with a low concentration of split-applied CK and GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA). Findings in this study indicate that when plants endured hail damage, citronellol accumulated in response to physiological stress. However, subsequently split-applying CK and GA on plants would have led to further increase in citronellol content.

del tricoma capitados alargados mostró diferencia estadística ($p \leq 0.02$) entre las superficies de las hojas; por lo tanto, la superficie adaxial de la hoja tuvo una densidad más alta del tipo de tricomas capitados alargados en comparación con la superficie abaxial, lo cual ocurrió en cualquiera de los niveles de defoliación (50 o 100%).

Aunque en este estudio no se observaron las etapas de desarrollo de los tricomas de tipo capitado, las aplicaciones por separado de CK y GA, con independencia del nivel de aplicación, estimularon el alargamiento del tallo de los tricomas asciformes para formar tricomas capitados alargados, en especial cuando las plantas sufrieron defoliación (50 y 100%). Por lo tanto, esto podría indicar que las aplicaciones por separado de CK y GA en hojas de geranio rosa recién desarrolladas estimulan la transformación de los tricomas asciformes en tricomas capitados alargados. Barnes (2013) informó que los cambios en las proporciones endógenas de CK y GA debidas a su aplicación por separado con frecuencia causan

Table 4. Effects of defoliation and split-application of CK and GA on selected essential oil quality compounds of rose geranium (Thitapoho farm, Tweespruit).
Cuadro 4. Efectos de la defoliación y la aplicación por separado de CK y GA en compuestos selectos de calidad del aceite esencial de geranio rosa (área productora Thitapoho, Tweespruit).

Treatments	Citronellol	Geraniol	[†] C:G
Defoliation			
0% defoliation	4.81 ± 1.52 b	0.90 ± 0.50 a	5.34 ± 1.51 a
50% defoliation	2.90 ± 1.13 c	0.93 ± 0.01 a	3.11 ± 1.28 a
100% defoliation	6.48 ± 2.99 a	1.21 ± 0.05 a	5.35 ± 1.26 a
F-value	27.06	0.55	2.60
P-value	0.01	0.61	0.16
CK + GA			
Distilled water	4.37 ± 2.33 b	0.93 ± 0.57 a	4.69 ± 1.33 a
CK 0.32 + GA 150	5.78 ± 3.45 a	0.74 ± 0.01 a	7.81 ± 1.55 a
CK 0.64 + GA 300	4.04 ± 1.32 b	0.71 ± 0.02 a	5.64 ± 1.47 a
F-value	6.93	1.01	3.75
P-value	0.01	0.42	0.09
Defoliation x CK + GA			
F-value	9.20	0.89	1.37
P-value	0.01	0.46	0.35

Means with different letter in a column are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$). [†]C:G = C:G ratio. ♦ Letras diferentes en medias por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey; $p \leq 0.05$). [†]C:G = proporción C:G.

CONCLUSIONS

Results from this study demonstrated that recovered rose geranium leaves developed higher density of the elongated-capitate trichome on the adaxial leaf surface following hail damage simulation and subsequent split-application of cytokinin (CK) and gibberellic acid (GA) compared to control. This is ascribed to elongation of the asciiform trichome to form the elongated-capitate trichome, mainly caused by the antagonistic cross-signalling effects between these growth regulators.

Split-application of cytokinin and gibberellic acid decreased the density of the brevicollate trichome; causing counter-productive results on essential oil yield. The application of low concentration of split-applied CK and GA improved the citronellol content, especially where plants endured 100% defoliation. The split-application of CK and GA phytohormones did affect the transformation of trichome morphology and density per leaf area; and consequently, affected citronellol, the key essential oil compound, when rose geranium plants endured simulated hail damage.

alteraciones en las características morfológicas, como hojas extragrandes o tallos alargados, y una proliferación extensa de brotes cuando las plantas han tolerado estrés biótico y abiótico. En nuestro estudio, éste pudo ser el caso, ya que el tricoma asciiforme pudo haber cambiado su morfología en respuesta a la defoliación y a CK y GA aplicados por separado.

La célula glandular en la punta del tricoma, que es la célula capital, muestra muchas características ultraestructurales que explican su capacidad para sintetizar y secretar grandes cantidades, en relación con su tamaño, de un número limitado de metabolitos especializados (Hulchemann *et al.*, 2017). En nuestro estudio, el tricoma capitado alargado es un tricoma asciiforme estirado con una cabeza arrugada, lo cual podría indicar una falta de aceite esencial almacenado en sus espacios subcuticulares. Además, Eiasu *et al.* (2009) informaron que el grupo de capitados carecía de aceite esencial almacenado en sus espacios subcuticulares en comparación con los tricomas brevicollados. Por lo tanto, los resultados no significativos en el rendimiento de aceite esencial se atribuyeron a los resultados de disminución de peltados y al aumento de los tricomas capitados (Cuadro 3).

ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Research Foundation of South Africa for the whole funding (Grant No: 107020 and 116757) of this research. To Ms. Hanlie Grobler (University of the Free State, RSA), our special gratitude for her technical contributions in scanning electronic microscopy techniques; and to Mr. Calvin Mabuso for data collection.

LITERATURE CITED

- Barnes, H. W. 2013. Gibberellins and cytokinins: A review. *ISHS Acta Hort.* 1055: 323-336.
- Cato, S., C. Macedo, W. R. Peres, L. E. P. and P. R. de Castro. 2013. Synergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. micro-tom. *Hortic. Bras.* 31: 549-553.
- Egamberdieva, D., S. J. Wirth, A. A. Alqarawi, E. F. Abd_Allah, and A. Hashem. 2017. Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol.* 8: 2104.
- Eiasu, B. K., J. M. Steyn, and P. Soundy. 2009. Rose-scented geranium (*Pelargonium capitatum* x *P. radens*) growth and essential oil yield response to different soil water depletion regimes. *Agric. Water Manage.* 96: 991-1000.
- Fambrini, M., and C. Pugliesi. 2019. The dynamic genetic-hormonal regulatory network controlling the trichome development in leaves. *Plants* 8: 253.
- Gálea, I. C., I. Ielciu, G. Crişan, and M. Tămaş. 2017. Histological studies on the vegetative and reproductive organs of *Pelargonium roseum* Willd. (Geraniaceae). *Hop and Med. Plants* 1-2.
- Hulchemann, A., M. Boutry, and C. Hachez. 2017. Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest. *Plant Physiol.* 175: 6-22.
- Ikeuchi, M., A. Iwase, B. Rymen, A. Lambalez, M. Kojima, Y. Takebayashi, J. Heyman, S. Watanabe, M. Seo, L. De Veylder, H. Sakakibara, and K. Sugimoto. 2017. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiol.* 175: 1158-1174.
- Irigoyen, I., I. Domeno, and J. Muro. 2010. Effect of defoliation by simulated hail damage on yield of potato cultivars with different maturity performed in Spain. *Am. J. Potato Res.* 88: 82-90.
- Jiao, Y. 2016. Trichome formation: Gibberellins on the move. *Plant Physiol.* 170: 1174-1175.
- Koprna, R., N. De Diego, N. Dundálková, L. and L. Spíchal. 2016. Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorg. Med. Chem.* 24: 484-492.
- Liu, Y., D. Liu, R. Hu, C. Hua, I. Ali, A. Zhang, B. Liu, M. Wu, L. Huang, and Y. Gan. 2017. AtGIS, a C2H2 zinc-finger transcription factor from Arabidopsis regulates glandular trichome development through GA signalling in tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483: 209-215.
- Ma, D., Y. Hu, C. Yang, B. Liu, L. Fang, Q. Wan, W. Liang, G. Mei, L. Wang, H. Wang, L. Ding, C. Dong, M. Pan, J. Chen, S. Wang, S. Chen, C. Cai, X. Zhu, X. Guan, B. Zhou, S. Zhu, J. Wang, W. Guo, X. Chen, and T. Zhang. 2016. Genetic basis for glandular trichome formation in cotton.

En nuestro estudio sólo se discutió la proporción relativa de citronelol y geraniol para determinar la calidad del aceite esencial. Linalol, formiato de citronelilo, formiato de geraniol y guaya-6,9-dieno no se vieron afectados por los tratamientos de defoliación (datos no mostrados). Además, los tratamientos tampoco afectaron el contenido de geraniol y la relación citronelol:geraniol (proporción C:G) (Cuadro 4).

Una interacción significativa se observó entre los niveles de defoliación y las concentraciones diferentes de CK y GA aplicadas por separado sobre el contenido de citronelol (Cuadro 4). El contenido de citronelol ($p \leq 0.0002$) también tendió a aumentar en un 4.6% en comparación con el control cuando las plantas sufrieron una defoliación del 100%, y después se trataron con concentraciones bajas de CK y GA aplicadas por separado (0.32 mg L^{-1} CK + 150 mg L^{-1} GA). Los hallazgos de este estudio indican que cuando las plantas sufrieron daños por granizo, el citronelol se acumuló en respuesta al estrés fisiológico. Sin embargo, la subsecuente aplicación por separado de CK y GA en las plantas habría generado un incremento adicional en el contenido de citronelol.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron que las hojas de geranio rosa recuperadas desarrollaron una densidad mayor de tricomas capitados alargados en la superficie adaxial de la hoja después de la simulación de daños por granizo y las subsecuentes aplicaciones por separado de soluciones de citoquinina (CK) y ácido giberélico (GA) en comparación con el control. Esto se atribuye al alargamiento de los tricomas esciiformes para formar tricomas capitados alargados, causado principalmente por los efectos antagonistas de señalización cruzada entre estos reguladores del crecimiento.

La aplicación en dosis separadas de soluciones de citoquinina y ácido giberélico disminuyó la densidad del tricoma breviculado, lo cual causó resultados contraproducentes en el rendimiento del aceite esencial. La aplicación de concentraciones bajas de CK y GA aplicadas por separado mejoró el contenido de citronelol, en especial cuando las plantas toleraron una defoliación del 100%. La aplicación por separado de los fitoreguladores CK y GA afectó la transformación de la morfología de los tricomas y de su densidad por área foliar. En consecuencia afectó

- Nat. Commun. 7: 10456.
- Nanda, A.K., and C.W. Melnyk. 2018. The role of plant hormone during grafting. *J. Plant Res.* 131: 49-58.
- Oosthuizen, L., and J. Coetzee. 1984. Morphogenesis of trichomes of *Perlagonium scabrum*. *S. Afr. J. Bot.* 2: 305-310.
- Paradiković, N., T. Teklić, S. Zeljković, M. Lisjak, and M. Špoljarević. 2019. Biostimulants research in some horticultural plant species-A review. *Food Energy Secur.* 8: e00162.
- Payne, W. 1978. A glossary of plant hair terminology. *Brittonia* 30: 239-255.
- Romitelli, I., and M. B. G. Martins. 2013. Comparison of leaf morphology and anatomy among *Malva sylvestris* ("gerânio-aromático"), *Pelargonium graveolens* ("falsa-malva") and *Pelargonium odoratissimum* ("gerânio-de-cheiro"). *Rev. Bras. Plantas Med.* 15:91-97.
- Sakamoto, T., N. Kamiya, Ueguchi-Tanaka, M. Iwahori, S. and M. Matsuoka. 2001. KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev.* 15: 581-590.
- Sedibe, M. M., Z. P. Khetsha, and N. Malebo. 2013. Salinity effects on external and internal morphology of rose geranium (*Pelargonium graveolens* L.) leaf. *Life Sci.* 10: 99-103.
- Sharma, A., A. Khanal, and B. Dhital. 2018. Effect of gibberellic acid on post-harvest shelf-life and quality of tomato. *J. Post Harvest Technol.* 06: 82-90.
- Wang, M. H., J. R. Wang, X. W. Zhang, A. P. Zhang, S. Sun, and C. M. Zhao. 2019. Phenotypic plasticity of stomatal and photosynthetic features of four *Picea* species in two contrasting common gardens. *AoB Plants* 1-10.

al citronelol, el compuesto clave del aceite esencial, cuando las plantas de geranio rosa toleraron la simulación de daños por granizo.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Nacional de Investigación de Sudáfrica por el financiamiento (Beca No: 107020 y 116757) de esta investigación en su totalidad. A la Sra. Hanlie Grobler (University of the Free State, RSA), nuestro agradecimiento especial por su contribución en las técnicas de microscopía electrónica de barrido, y al Sr. Calvin Mabuso por el registro de datos.

—Fin de la versión en Español—



- Xue, S., M. Dong, L. Xingwang, S. Xu, J. Pang, W. Zhang, Y. Weng, and H. Ren. 2019. Classification of fruit trichomes in cucumber and effects of plant hormones on type II fruit trichome development. *Planta* 249: 407-416.
- Yue, Y., L. Zhou, A. Zhu, and X. Ye. 2019. Vulnerability of cotton subjected to hail damage. *PLoS ONE* 14: e0210787.
- Zhou, Z., L. Sun, Y. Zhao, L. An, A. Yan, X. Meng, and Y. Gan. 2013. Zinc Finger Protein 6 (ZFP6) regulates trichome initiation by integrating gibberellin and cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 198: 699-708.

MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO SOBRE EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE NOGAL PECANERO CULTIVADO EN EL VALLE DEL YAQUI, SONORA, MÉXICO

GROWTH PROMOTING MICROORGANISMS ON YIELD AND QUALITY OF PECAN GROWN IN THE YAQUI VALLEY, SONORA, MEXICO

Paola Carolina Cantú-Nava¹, Marco Antonio Gutiérrez-Coronado^{1*}, Luciano Castro-Espinoza¹, Juan Manuel Soto-Parra², Juan Manuel Cortez-Jiménez³, Humberto Núñez-Moreno³

¹Instituto Tecnológico de Sonora. 85000. Calle 5 de febrero 818 sur, Colonia Centro, Cajeme Sonora. (marco.gutierrez@itson.edu.mx). ²Universidad de Chihuahua. ³Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria. 85000. Calle Dr. Norman E. Borlaug km 12, Colonia Valle del Yaqui, Cajeme, Sonora.

RESUMEN

El nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch) es una especie hortofrutícola de rentabilidad alta, por lo que en México ha aumentado el área dedicada a este frutal. Dentro de los métodos nuevos utilizados para mejorar cultivos está la incorporación de organismos seleccionados por sus beneficios en el metabolismo vegetal, aplicados al sistema de la planta receptora como productos biológicos. Entre estos productos biológicos están los microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Con la hipótesis de que al menos uno de estos productos biológicos favorecería el cultivo y rendimiento del nogal, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento para mejorar la productividad y calidad del nogal pecanero. La aplicación se realizó durante tres ciclos de 2017 a 2019; se utilizaron *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum*, en una concentración de 10^8 UFC mL⁻¹ m⁻². El diseño fue en bloques al azar, con dos tratamientos; y se utilizó ANDEVA para la comparación de datos. Un conteo microbiológico en suelo se realizó y se evaluaron el rendimiento y la calidad del nogal. El conteo microbiológico dio como resultado de 10^5 a 10^7 poblaciones en el suelo inoculado. Los tratamientos mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) e incrementaron la productividad del nogal un 27.7% al utilizar el consorcio microbiano en el ciclo 2019, y además una calidad mejor se obtuvo en la nuez durante los tres ciclos consecutivos.

ABSTRACT

Pecan (*Carya illinoensis* Koch) is a highly profitable horticultural species, which is why the area dedicated to this fruit tree has increased in Mexico. Among the new methods used to improve crops there is the incorporation of organisms selected for their benefits in plant metabolism, applied to the host plant system as biological products. Among these biological products are plant growth promoting microorganisms. With the hypothesis that at least one of these biological products would favor pecan crop and yield, the objective of this study was to analyze the effect of the application of growth promoting microorganisms to improve pecan productivity and quality. The application was carried out during three cycles since 2017 to 2019; *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* were used, at a concentration of 10^8 UFC mL⁻¹ m⁻². The experimental design was complete randomized blocks, with two treatments; ANOVA was used for data comparison. A microbiological count was performed in the soil, and pecan yield and quality were evaluated. The microbiological count resulted in 10^5 to 10^7 populations in the inoculated soil. The treatments showed significant differences ($p \leq 0.05$) and increased pecan productivity by 27.7% when using the microbial consortium in the 2019 cycle, and better pecan quality was obtained during the three consecutive cycles.

Key words: *Carya illinoensis*, growth promoting microorganisms, microbial consortium, yield, nut percentage.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5956-9945>

Recibido: marzo, 2020. Aprobado: junio, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 347-355. 2021.

Palabras clave: *Carya illinoensis*, microorganismos promotores del crecimiento, consorcio microbiano, rendimiento, porcentaje nuez.

INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch) es una especie hortofrutícola de rentabilidad alta, por lo que en el país ha aumentado el área dedicada a este frutal (Zaragoza-Lira *et al.*, 2011). México se ha posicionado como un productor importante de nuez pecana y Sonora es el segundo estado con mayor volumen de producción. Ya que ha aumentado el área de siembra de este cultivo, por lo que se espera que esta tendencia se mantenga (Coronado *et al.*, 2015). En el Valle del Yaqui, Sonora, las plantaciones de nogal aumentaron; la superficie total llegó a 2516 ha (SIAP, 2017). Sin embargo, existen limitantes para la producción, como los desequilibrios ecológicos del suelo provocados por el uso indiscriminado de agroquímicos que han afectado su fertilidad y causan degradación (Creus, 2017).

Además, hay deficiencias nutrimentales derivadas de las características edáficas de las regiones productivas, en las cuales la acumulación de nutrimentos se debe reconocer con el propósito de favorecer la composición nutrimental. Dentro de las nuevas estrategias amigables con el ambiente utilizadas para plantar cultivos, se encuentran los productos biológicos que consisten en incorporar al sistema organismos seleccionados por sus beneficios en el metabolismo vegetal. Entre estos productos están los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (Bashan *et al.*, 2013), cuya aplicación permite reducir el uso de productos químicos (Hassen *et al.*, 2016).

Entre los géneros que destacan, están las especies del género *Bacillus* que promueven el crecimiento vegetal y ejercen control biológico de patógenos en los cultivos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). También se encuentra *Pseudomonas fluorescens*, bacteria que estimula el desarrollo por medio de la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal que ha demostrado una gran capacidad para solubilizar fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo presentes en el suelo (Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014). Además, especies de *Trichoderma* se utilizan como bioestimulantes del crecimiento y biocontroles de enfermedades (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009).

INTRODUCTION

Pecan (*Carya illinoensis* Koch) is a highly profitable fruit tree species, which is why the area dedicated to their cultivation has increased in the country (Zaragoza *et al.*, 2011). Mexico is positioned as an important pecan nut producer; and Sonora is the second state with the second largest production volume. The planting area of this crop has increased, so it is expected that this trend shall continue (Coronado *et al.*, 2015). In the Yaqui Valley, Sonora, pecan plantations increased; the total area reached 2516 ha (SIAP, 2017). However, there are production constraints, such as soil ecological imbalances caused by the indiscriminate use of agrochemicals that have affected fertility and have caused soil degradation (Creus, 2017).

In addition, there are nutritional deficiencies derived from the edaphic characteristics of the productive regions, in which the accumulation of nutrients must be recognized with the purpose of favoring the nutrient composition. Some contemporary and environmentally friendly strategies used for planting crops include biological products which incorporate into the agricultural system, organisms selected for enhancing plant metabolism. Plant growth promoting microorganisms are among these products (Bashan *et al.*, 2013), whose application allows reducing the use of chemicals (Hassen *et al.*, 2016).

Among the outstanding genera there are species of the *Bacillus* genus that promote plant growth and exert biological control of pathogens in crops (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). There is also *Pseudomonas fluorescens*, a bacterium that stimulates development through the synthesis of plant growth regulators. *P. fluorescens* has demonstrated a great capacity to solubilize organic and inorganic fractions of phosphorus present in the soil (Patiño-Torres and Sanclemente-Reyes, 2014). Also, some *Trichoderma* species are used as growth bio-stimulants and disease bio-controls (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009).

The search for technologies to optimize production, such as the use of biological inoculants together with the balance of nutrition in pecan, derives from their contribution to the yield and quality of the crop, as well as helping to preserve the environment. It is possible that greater efficiency

La búsqueda de tecnologías para la optimización de la producción, como el uso de inoculantes biológicos junto con el balance de la nutrición en nogal, se debe a su contribución en el rendimiento y la calidad del cultivo, además de ayudar a preservar el ambiente. Es posible que se logre una eficiencia mayor al utilizar este tipo de recursos; sin embargo, no existe información suficiente acerca de las interacciones de microorganismos benéficos en el cultivo de nogal pecanero. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum*), para mejorar la producción y calidad del cultivo del nogal. Con la hipótesis de que al menos una de las bacterias o la acción conjunta de ellas, promoverá las mejoras esperadas en producción o calidad de la nuez pecan.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en una huerta comercial de nogal pecanero de 13 años, localizada en el Valle del Yaqui, Sonora, bloque 1010, en los 27° 20' 23.26" N y 109° 55' 42.83" O. La plantación fue en marco real de 6 x 12 m con las variedades Western Schley y Wichita. El sistema de riego es por goteo, y drenaje parcelario de 1.40 m. El suelo del cultivo se determinó como franco arcilloso, con 0.86% de materia orgánica, un pH de 7.7, conductividad eléctrica de 0.345 dS m⁻¹, con densidad aparente de 1.71 g cm⁻³ y CIC de 33.21 mEq 100 g⁻¹; y concentración nutrimental de 0.3, 9.2 y 2 g kg⁻¹ N:P:K. Respecto al manejo del cultivo, la fertilización anual de la huerta completa fue en proporción 150-50-100 N: P: K, distribuida de manera semanal desde el inicio de cada ciclo con UAN 28, fosfato monoamónico y nitrato de potasio.

El experimento se realizó durante los ciclos 2017, 2018 y 2019. El diseño experimental fue en bloques completos al azar con dos tratamientos. En el área del huerto, se tomó una fracción de superficie de 5000 m² para la aplicación del consorcio de microorganismos promotores de crecimiento (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum*), y otra área de 5000 m² se dejó como control sin inóculo. En cada sección se seleccionaron 13 repeticiones (unidades experimentales) de la variedad Wichita. La dosis fue 10⁸ UFC mL⁻¹ m² para cada microorganismo, los cuales se aplicaron en los tres ciclos (años) cada 15 d desde la brotación (abril) hasta el estado acuoso-lechoso del fruto (agosto); por medio del sistema de riego entre las 8:00 y 10:00 h del día, para un total de 10 aplicaciones por cada ciclo.

can be achieved by using this type of resources; however, there is not enough information about the interactions of beneficial microorganisms in pecan. For this reason, With the hypothesis that at least one of the bacteria or their joint action, will promote the expected improvements in production or quality of pecan nut, the objective of this study was to evaluate the effect of the application of growth promoting microorganisms (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum*) to improve the production and quality of pecan.

MATERIALS AND METHODS

The research was carried out in a 13-year-old commercial pecan orchard, located in the Yaqui Valley, Sonora, block 1010, at coordinates 27° 20' 23.26" N and 109° 55' 42.83" W. The plantation was made in a 6 x 12 m frame with the Western Schley and Wichita varieties. The irrigation system was drip irrigation and at 1.40 m plot drainage. The crop soil was determined as clay loam, with 0.86% organic matter, 7.7 pH, electrical conductivity of 0.345 dS m⁻¹, bulk density of 1.71 g cm⁻³ and CIC of 33.21 mEq 100 g⁻¹; and nutrient concentrations of 0.3, 9.2 and 2 g kg⁻¹ N:P:K. Regarding crop management, the annual fertilization of the entire orchard was in the ratio of 150-50-100 N: P: K, distributed weekly from the beginning of each cycle with UAN 28, monoammonium phosphate and potassium nitrate.

The experiment was conducted during 2017, 2018 and 2019 harvest cycles. The experimental design was set in randomized complete blocks with two treatments. In the orchard area, a section of 5000 m² was used for the application of the consortium of growth promoting microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum*), and another area of 5000 m² was used as a control without inoculum. In each section, 13 replicates (experimental units) of the Wichita variety were selected. The dose was 10⁸ CFU mL⁻¹ m² for each microorganism, which were applied in the three cycles (years) every 15 d from sprouting (April) to the watery-milky stage of the fruit (August) by means of the irrigation system between 08:00 and 10:00 am, for a total of 10 applications in each cycle.

Measurement variables

Quantification of CFU per g of soil

Microbiological viability analyses were performed on soil microorganisms to monitor their population density. Samples were taken according to NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002) 7 d after the fifth application in June in

Variables de medición

Cuantificación de UFC por g de suelo

Análisis microbiológicos de viabilidad se realizaron en los microorganismos del suelo para monitorear la densidad de las poblaciones de cada uno. Las muestras se tomaron según la NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002) a los 7 d después de la quinta aplicación en el mes de junio de cada ciclo de cultivo. Después se utilizó la técnica de diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} para vaciado en placa, por triplicado en medio agar manitol-yema de huevo-polimixina (agar MYP), para la identificación de *B. subtilis* y *B. cereus*; agar dextrosa de papa, para *T. harzianum*; y para *P. fluorescens* se usó agar aislamiento de *Pseudomonas F*. Las bacterias se mantuvieron a 30 °C y los hongos a 25 °C. El conteo microbiológico se realizó a las 24, 48 y 120 h con un contador manual de colonias; los resultados se registraron como UFC g⁻¹ de suelo (Pepper y Gerba, 2004).

Análisis nutrimental en hoja

La concentración de macro- (N, P, K, Ca, Mg) y micronutrientes (Fe, Cu, Zn) se determinó en una muestra compuesta de tejido vegetal, colectada el mes de junio de cada ciclo. Los dos folíolos centrales de una hoja ubicada en la parte media de la rama se tomaron de las secciones baja y alta de la copa del árbol. El análisis se realizó con un espectrofotómetro (DR3900 HACH®, EUA) y los métodos de Alcántar y Sandoval (1999) (manual HACH®), con modificaciones ajustadas a la naturaleza de las muestras.

Rendimiento y calidad

La estimación del rendimiento se realizó por secciones alrededor de cada árbol, según la metodología descrita por Worley y Smith (1984). Por árbol se tomaron cuatro muestras, las cuales se limpiaron para eliminar ruzno y residuos, y se secaron al aire. Después se pesaron y los valores se extrapolaron a Mg ha⁻¹ con base al área total de cada árbol. La calidad se obtuvo al descascarar 1 kg de nueces de cada árbol, para determinar el porcentaje de nuez comestible en relación con el porcentaje de cáscara.

Análisis estadístico

Con los datos de tres años de las unidades experimentales en los bloques completos al azar se realizó un ANDEVA y comparación de medias de Tukey con ($p \leq 0.05$) en el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc., 2000).

each year. Then, the technique of 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} dilutions was used for pouring on mannitol-egg yolk-polymyxin agar (MYP agar) in plates in triplicate, for the identification of *B. subtilis* and *B. cereus*; in potato dextrose agar, for *T. harzianum*; and for *P. fluorescens* agar isolation of *Pseudomonas F* was used. Bacteria were kept at 30 °C and fungi at 25 °C. Microbiological counts were performed at 24, 48 and 120 h with a manual colony counter; the results were recorded as CFU g⁻¹ soil (Pepper and Gerba, 2004).

Leaf nutritional analysis

The concentration of macro (N, P, K, Ca, Mg) and micronutrients (Fe, Cu, Zn) was determined in a composite sample of plant tissue, collected in June of each cycle. The two central leaflets of a leaf located in the middle section of a branch were taken from the lower and upper sections of the tree canopy. The analysis was performed with a spectrophotometer (DR3900 HACH®, USA) and according to the methods of Alcántar and Sandoval (1999) (HACH® manual), with modifications adjusted to the nature of the samples.

Yield and quality

Yield estimation was done by sections around each tree, according to the methodology described by Worley and Smith (1984). Four samples were taken per tree, which were cleaned to remove debris and residues and then air-dried. Afterwards, they were weighed, and the values extrapolated to Mg ha⁻¹ based on the total area of each tree. Quality was obtained by shelling-off 1 kg of nuts from each tree to determine the percentage of edible nut in relation to the percentage of shell.

Statistical analysis

Data from the experimental units at the complete randomized blocks for three years were assembled into a single data base. An ANOVA and a mean comparison test (Tukey, $p \leq 0.05$) were performed in Statgraphics Plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc, 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological soil analysis

Microflora count was carried out in each crop cycle and the number of microorganisms of each species per gram of soil was determined. The results showed the prevalence and population increase of

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológico de suelo

El conteo de microflora se realizó en cada ciclo del cultivo y se determinó el número de microorganismos de cada especie por gramo de suelo. Los resultados demuestran la prevalencia y el aumento de la población en la rizósfera de cada especie, en comparación con el control (Cuadro 1). Condiciones buenas de humedad son importantes para promover a las poblaciones presentes en el suelo, de un estado latente de células microbianas a un estado metabólicamente activo. Los periodos de inoculación de las cepas permiten que las poblaciones no se vean limitadas (Buysens *et al.*, 2016).

El mantenimiento de densidades adecuadas de microorganismos benéficos en la rizósfera es de suma importancia debido a los aportes que brinda a la planta; por tanto, la viabilidad de la cepa es clave (Keswani *et al.*, 2014). Las condiciones de fertilidad del suelo dependen de la actividad microbiana que ocurre en él. Además, la mejora posible del equilibrio microbiológico del suelo para favorecer el desarrollo y la productividad de un cultivo es mayor al utilizar microorganismos benéficos y efectivos que sean compatibles unos con otros (Higa y Parr, 2013); esto se evidenció en las poblaciones obtenidas en este estudio. Leal-Almanza *et al.* (2018) cuantificaron densidades de microorganismos similares en rizósfera, los cuales tuvieron un efecto positivo en la productividad en el cultivo de papa.

Análisis nutrimental de hoja

Valores inferiores a los recomendados para producción comercial se encontraron en la concentración

each species in the rhizosphere, compared to the control plots (Table 1). Good moisture conditions are important to promote the populations present in the soil, from a dormant state of microbial cells to a metabolically active state. The inoculation periods of the strains allow the populations not to be limited (Buysens *et al.*, 2016).

Maintaining adequate densities of beneficial microorganisms in the rhizosphere is of utmost importance due to the contributions it provides to the plant; therefore, strain viability is key (Keswani *et al.*, 2014). Soil fertility conditions depend on the microbial activity occurring in the soil. Moreover, the possible improvement of the microbiological balance of the soil to favor the development and productivity of a crop is greater when using beneficial and effective microorganisms that are compatible with each other (Higa and Parr, 2013); this was evidenced in the populations obtained in this study. Leal-Almanza *et al.* (2018) quantified densities of similar microorganisms in the rhizosphere, which had a positive effect on productivity in potato crop.

Leaf nutritional analysis

Values lower than those recommended for commercial production were found in the N concentration due to the time of sampling, during almond filling (Table 2). At this stage there is a high demand for this nutrient to supply the fruit (Smith *et al.*, 2012). This author also indicated the sufficiency ranges for both native and producing trees; specifying which values were high and which were low, and explained the reasons why, depending on the stage, N values may drop.

The solubilizing action of the microorganisms allows an improvement in the availability, and further,

Cuadro 1. Microorganismos viables en suelo de nogal pecanero (UFC g⁻¹ de suelo seco).
Table 1. Viable microorganisms in pecan soil (UFC g⁻¹ of dry soil).

Tratamiento	Conteo de microorganismos viables (UFC g ⁻¹ de suelo)					
	Control			Consorcio microbiano		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019
<i>Bacillus subtilis</i>	3.1 x 10 ²	2.2 x 10 ³	2.2 x 10 ³	1.2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁶	9.2 x 10 ⁷
<i>Bacillus cereus</i>	ND [†]	ND [†]	ND [†]	2.5 x 10 ³	4 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 x 10 ³	3 x 10 ⁴	4.1 x 10 ⁴	6 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁵	3 x 10 ⁷
<i>Trichoderma harzianum</i>	ND [†]	ND [†]	ND [†]	1.5 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵

[†]ND: No detectado. ♦ [†]ND: Not detected.

de N debido al momento del muestreo, durante el llenado de almendra (Cuadro 2). En dicha etapa existe demanda alta de este nutrimento para abastecer el fruto (Smith *et al.*, 2012). Este autor indicó los intervalos de suficiencia tanto de árboles nativos como en producción; además especificó cuáles valores son altos y bajos, y explicó las razones por las cuales, dependiendo la etapa, los valores de N pueden bajar.

La acción solubilizadora de los microorganismos permite una mejora en la disponibilidad, y por tanto en la absorción y transporte de N y otros nutrimentos en la hoja. Todo lo cual produce un llenado mejor de fruto. Al utilizar el consorcio microbiano la concentración de P fue superior a los valores estándar, debido a que *P. fluorescens* y *B. subtilis* activaron el fósforo insoluble en el suelo, y lo convirtieron en formas disponibles para las plantas (Ávila *et al.*, 2015). Los valores del resto de los macro y micro nutrimentos en hoja se cuantificaron dentro del intervalo de referencia.

Rendimiento y porcentaje de nuez

El rendimiento mayor, 27.7% de incremento respecto al control se obtuvo con el tratamiento del consorcio microbiano durante el ciclo 2019 (Cuadro 3). Este valor representa una mejora, comparado con la productividad esperada para dicho ciclo (año OFF), un año de producción menor y calidad de fruto baja

En el estado de Sonora se alcanza una producción media en toneladas de 2.03 Mg ha⁻¹ (Orona *et al.*,

in the absorption and transport of N and other nutrients in the leaf. All of which produces a better fruit filling. When using the microbial consortium, P concentration was higher than standard values, because *P. fluorescens* and *B. subtilis* activated insoluble phosphorus in the soil and converted it into plant-available chemical forms (Ávila *et al.*, 2015). The values of the rest of the macro and micro-nutrients in leaf were quantified within the reference range.

Yield and nut percentage

The highest yield, 27.7% increase over the control was obtained with the microbial consortium treatment during the 2019 cycle (Table 3). This value represents an improvement compared to the expected productivity for that cycle (an OFF-year), which is a year of lower production and low fruit quality.

In the state of Sonora, an average production in tons of 2.03 Mg ha⁻¹ is reached (Orona *et al.*, 2019); however, in this study the treatment with microbial inoculation exceeded these values ($p \leq 0.05$) consecutively in the 2018 and 2019 cycles (Table 3). These data are evidence of the action of the microorganisms used for their growth promotion function based on phytohormone production and nutrient solubilization (Santos *et al.*, 2020). In addition, by degrading materials present in soil to be better utilized by plants, and increasing productivity and quality in crops (Feijoo, 2016).

Cuadro 2. Efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento en la concentración nutrimental de hoja de nogal pecanero.

Table 2. Effect of the application of growth promoting microorganisms on the nutrient concentration of pecan leaves.

Treatment	Cycle	N	P	K g kg ⁻¹	Ca	Mg	Fe	Cu mg kg ⁻¹	Zn
Consortio microbiano	2017	21.4 bc ± 2.5	41.1 b ± 2.5	13.1 e ± 0.3	11.2 b ± 0.5	3.8 b ± 0.4	201 b ± 5.8	20 b ± 1.2	65 ab ± 1.8
	2018	26.0 ab ± 1.2	55.5 a ± 2.2	26.3 a ± 0.6	12.4 ab ± 1.1	4.1 a ± 0.2	223 a ± 4.6	25 a ± 0.9	76 a ± 1.5
	2019	26.3 a ± 0.8	58.0 a ± 2.1	23.5 b ± 0.5	13.5 a ± 0.6	3.7 b ± 0.6	214 b ± 5.1	24 a ± 1.1	67 ab ± 0.9
Control	2017	21.1 c ± 2.1	28.0 c ± 0.5	12.1 e ± 1.06	10.8 c ± 0.6	3.0 c ± 0.5	162 c ± 6.5	18 c ± 1.3	54 c ± 0.8
	2018	23.9 abc ± 1.2	33.0 c ± 1.6	18.4 c ± 0.6	11.4 b ± 0.5	3.2 bc ± 0.5	184 bc ± 4.3	20 b ± 0.8	62 b ± 1.2
	2019	23.7 abc ± 0.8	33.0 c ± 2.0	16.3 d ± 0.4	11.3 b ± 0.4	3.1 bc ± 0.6	176 c ± 5.2	21 ab ± 1.1	64 ab ± 1.3
Referencia [†]		24-30	14-30	10-25	7-17.5	3-6	50-300	6.0-30	60-150

a,b Letras distintas en una columna indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ a,b Different letters in columns indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

[†]Smith *et al.*, (2012).

Cuadro 3. Efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento en la productividad de nogal pecanero.

Table 3. Effect of the application of growth promoting microorganisms on pecan productivity.

Tratamiento	2017	Rendimiento	
		2018	2019
		Mg ha ⁻¹	
Consortio microbiano	0.544 ± 0.14 a	3.393 ± 0.24 a	2.260 ± 0.48 a
Control	0.524 ± 0.18 a	3.204 ± 0.37 a	1.881 ± 0.34 b

a,b Letras distintas en una columna indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ a,b Different letters in columns indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

2019); sin embargo, en este estudio el tratamiento con la inoculación microbiana superó dichos valores ($p \leq 0.05$) de forma consecutiva en los ciclos 2018 y 2019 (Cuadro 3). Estos datos son evidencia de la acción de los microorganismos utilizados por su función de promoción de crecimiento basada en la producción de fitohormonas y en la solubilización de nutrientes (Santos *et al.*, 2020). Además, por degradar materiales presentes en suelo para ser mejor aprovechados por las plantas y aumentar la productividad y calidad en los cultivos (Feijoo, 2016).

La utilización de cantidades grandes de fertilizantes químicos para asegurar rendimientos altos en los cultivos es una práctica no deseable desde el punto de vista ambiental, debido al tiempo que permanecen en el suelo. Por eso que el utilizar este tipo de microorganismos favorece una agricultura sustentable y mejora los rendimientos de los cultivos (Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014). La mejora de las condiciones del suelo y la productividad del cultivo de nogal se han buscado con base en productos orgánicos como compostas, humus, etc., con los cuales se han obtenido resultados favorables, tanto en condiciones de suelo como en productividad (Soto-Parra *et al.*, 2016).

Para evaluar la calidad de nuez, uno de los principales factores a considerar es el porcentaje de nuez comestible (Zaragoza-Lira *et al.*, 2011). En esta variable se presentaron diferencias ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 4).

Los rendimientos obtenidos en el estudio cumplieron o excedieron el porcentaje de nuez establecido (53-55%) en los requerimientos comerciales

The use of large amounts of chemical fertilizers to ensure high crop yields is an undesirable practice from an environmental point of view, due to the time they remain in the soil. That is why using this type of microorganisms favors sustainable agriculture and improves crop yields (Patiño-Torres and Sanclemente-Reyes, 2014). The improvement of soil conditions and pecan crop productivity have been searched based on organic products such as composts, humus, etc., with which favorable results have been obtained, both in soil conditions and productivity (Soto-Parra *et al.*, 2016).

To evaluate nut quality, one of the main factors to consider is the percentage of edible nut (Zaragoza *et al.*, 2011). In this variable, there were differences ($p \leq 0.05$) among treatments (Table 4).

The yields obtained in the study met or exceeded the established nut percentage (53-55%) in the traditional commercial requirements (Godoy and López, 2000). The orchard section with application of the microorganism consortium showed higher quality during the three consecutive growing cycles. Nutrient deficiencies that cause poor fruit filling (Acevedo-Barrera *et al.*, 2013), are reasons why nut quality is affected in pecan cultivation. Consequently, it is important to use this type of microorganisms because they facilitate the solubilization of organic compounds and the production of secondary metabolites, thus influencing the availability of nutrients (Cano, 2011). In addition, in fruit trees they favor integrated plant development, crop nutrition and consequently increase the quality of production (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009).

Cuadro 4. Efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento en la calidad de nuez en nogal pecanero.**Table 4. Effect of the application of growth promoting microorganisms on nut quality in pecan trees.**

Tratamiento	Porcentaje de nuez comestible (%)		
	2017	2018	2019
Consortio microbiano	54.3 ± 3.5 a	53.1 ± 3.1 a	56.6 ± 1.6 a
Testigo	53.2 ± 3.9 a	50.5 ± 2.4 b	55.0 ± 1.9 b

a,b Letras distintas en una columna indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

❖ a,b Different letters in columns indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

tradicionales (Godoy y López, 2000). La sección de la huerta con aplicación del consorcio de microorganismos mostró calidad mayor durante los tres ciclos de cultivo consecutivos.

Las deficiencias nutrimentales que causan un mal llenado del fruto (Acevedo-Barrera *et al.*, 2013), son razones por las cuales se afecta la calidad de nuez en el cultivo del nogal. En consecuencia, es importante utilizar este tipo de microorganismos porque facilitan la solubilización de compuestos orgánicos y la producción de metabolitos secundarios, e influyen en la disponibilidad de nutrimentos (Cano, 2011). Además, en frutales favorecen el desarrollo vegetal integrado, la nutrición de los cultivos y en consecuencia incrementan la calidad de la producción (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

Con la aplicación de microorganismos como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum* se obtuvieron diferencias en el rendimiento de nogal durante el ciclo 2018-2019. Así mismo, favoreció la absorción de nutrientes, lo cual se vio reflejado en el aumento del porcentaje de nuez.

Este tipo productos biológicos, denominados consorcios de bacterias promotoras del crecimiento, tienen potencial para utilizarse durante más ciclos e incrementar la productividad del cultivo.

LITERATURA CITADA

Acevedo-Barrera, A. A., J. Soto-Parra, y R. M. Yáñez-Muñoz. 2013. Impacto de la fertilización nutricional en la calidad de la nuez pecanera. *Juyyaania* 1:105-113.

CONCLUSIONS

With the application of microorganisms such as *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum*, differences in pecan yield were obtained during the 2018-2019 cycle. Likewise, it favored the absorption of nutrients, which was expressed through increasing the nut percentage. This type of biological products, called consortia of growth promoting bacteria, have the potential to be used during more cycles and to increase crop productivity.

—End of the English version—

-----*-----

Ávila, E., L. Lizarazo, y F. Cortés. 2015. Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociados a su rizósfera. *Acta Biol. Colombiana* 20: 121-131.

Bashan, Y., E. E. de-Bashan, and J. Hernández. 2013. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998- 2013). *Plant Soil* 378:1-33.

Buysens, C., V. César, F. Ferrais, H. Boulois y S. Declerck. 2016. Inoculation of *Medicago sativa* cover crop with *Rhizophagus irregularis* and *Trichoderma harzianum* increases the yield of subsequently-grown potato under low nutrient conditions. *Appl. Soil Ecol.* 105:137-143.

Cano, M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Rev. UDCA Actual. Divulg. Cient.* 14:15-31.

Creus, C. M. 2017. Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. *Rev. Argentina Microbiol.* 49: 207-209.

- Coronado, M. A., J. Meza, M. García P., V. Santiago, y A. Córdova Y. 2015. Análisis de la inversión bajo distintos escenarios productivos del nogal pecanero en la Sierra de Sonora. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6: 407-415.
- Cubillos-Hinojosa, J., N. Valero, y L. Mejía. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agron. Colombiana* 27: 81 - 86.
- Feijoo, M. A. L. 2016. Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Rev. Cient. Agroecos.* 4: 31-40.
- Godoy, C., e I. López. 2000. Desarrollo de la almendra y germinación del fruto del nogal pecanero bajo cuatro calendarios de riego. *Terra Latinoam.* 18: 305 - 311.
- Hassen, A. I., F. L. Bopape, and L. K. Sanger. 2016. Microbial Inoculants as Agents of Growth Promotion and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *In: Singh D., H. Singh, and R. Prabha.* (eds). *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity.* Springer, New Delhi. pp: 23 - 36.
- Higa, T., y J. F. Parr. 2013. Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenibles. Maryland (USA): Centro internacional de Investigación de Agricultura Natural, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. 13 p.
- Keswani, C., S. Mishra, B. Sarma, S. Singh, and H. Singh. 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 533-544.
- Leal-Almanza, J., M. A. Gutiérrez-Coronado, L. Castro-Espinoza, F. Lares-Villa, J. M. Cortes-Jiménez, y S. de los Santos-Villalobos. 2018. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo casa sombra. *Agrociencia* 52: 1149 - 1159.
- Orona, I., D. Sangerman, M. G. Cervantes, J. Espinoza, y J. H. Nuñez. 2019. La producción y comercialización de nuez pecanera en México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 10: 1797-1808.
- Patíño-Torres, C., y O. Sanclemente-Reyes. 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado.* 10: 288-297.
- Pepper, I. L. and C. P. Gerba. 2004. *Environmental Microbiology a Laboratory Manual.* 2nd. ed. Elsevier Academic Press. USA. 197 p.
- Santos, C. H. B., F. C. do Nascimento, L. L. Lobo, A. B. Martins, G. H. de Almeida Teixeira, and E. C. Rigobelo. 2020. Effect of encapsulated plant growth promoting microorganisms on soil biochemical parameters and development of fruit tree seedlings. *Australian J. Crop Sci.* 14: 3006-3014.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) 2002. NOM-021-RECNAT-2000. NORMA Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. SEMARNAT. Diario Oficial de la Federación (Segunda sección) México, D. F. pp: 1 - 85.
- SIAP (Sistema de Información Agrícola y Pesquera). 2017. Avance de Siembras y Cosechas Resumen Nacional por cultivo. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do (Consulta: abril 2019).
- Smith, M. W., C. T. Rohla, C. T. and W. D. Goff. 2012. Pecan leaf elemental sufficiency ranges and fertilizer recommendations. *HortTechnology* 22: 594-599.
- Soto-Parra, J. M., F. Piña, E. Sánchez, R. Pérez, y M. Basurto. 2016. Alternativas orgánicas para disminuir la aplicación de nitrógeno en nogal pecanero. *Nova Scientia* 8:140-161.
- Statpoint Technologies Inc. 2000. Statgraphics Plus, version 5.1. Reference Manual, Manugistics. Rockville. 305 p.
- Tejera-Hernández, B., M. Rojas-Badía, y M. Heydrich-Pérez. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Rev. CENIC Cienc. Biol.* 42: 131-138.
- Worley, E., and M. Smith. 1984. Estimating Pecan Yield. *Hort. Science* 19: 664.
- Zaragoza-Lira, M. M., P. Preciado-Rangel, U. Figueroa-Viramontes, J. L. García-Hernández, M. Fortis-Hernández, M. A. Segura-Castruita, A. Lagarda-Murrieta, and E. Madero-Tamargo. 2011. Application of compost and pecan yield. *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 17: 33 - 37.

RENDIMIENTO, CONTENIDO MINERAL Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FRIJOL CAUPÍ BIOFORTIFICADO CON COMBINACIONES DE SULFATOS DE HIERRO Y ZINC

YIELD, MINERAL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COWPEA BEANS BIOFORTIFIED WITH COMBINATIONS OF FERROUS AND ZINC SULFATES

Moisés Guillén-Molina¹, Efraín de la Cruz-Lázaro¹, Esteban Sánchez-Chávez², José Rodolfo Velázquez-Martínez¹, Rodolfo Osorio-Osorio¹, César Márquez-Quiroz^{1*}

¹División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, km 25. Carretera Villahermosa-Teapa, Villahermosa, Tabasco, México. C.P. 86280. (cesar_quiroz23@hotmail.com). ²Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, AC. Delicias, Chihuahua, México. C.P. 33088.

RESUMEN

La deficiencia de microelementos puede disminuir el rendimiento de las leguminosas, segundo alimento más importante para el consumo humano. Para contrarrestar deficiencias de hierro (Fe) y zinc (Zn) en los cultivos básicos se aplican técnicas agronómicas de fertilización, las cuales son importantes en los cultivos tradicionales. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en combinación con sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) sobre el rendimiento, contenido mineral y actividad antioxidante de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) biofortificado. La hipótesis fue que al menos una combinación de estos compuestos mejora el rendimiento y la calidad nutricional del frijol. El diseño experimental fue completamente al azar en arreglo factorial con tres repeticiones. El primer factor fue dosis de aplicación de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe1-Fe4: 0, 25, 50, 100 $\mu\text{M L}^{-1}$), y el segundo factor fue la dosis de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zn1-4: 0, 25, 50, 100 $\mu\text{M L}^{-1}$). Dieciséis tratamientos resultaron, correspondientes a la combinación de niveles de los factores. La aplicación de los tratamientos aumentó el rendimiento ($p \leq 0.05$) de 15.6 a 51.0%; también el contenido de Fe de 21.1 a 36.8%, el contenido de Zn de 1.1 a 12.7%. El contenido fenólico total de 1.8 a 30.5% y la actividad antioxidante de 1.5 a 35.2%. El estudio mostró que la biofortificación con sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc puede ser una alternativa para incrementar el rendimiento, contenido mineral y actividad antioxidante en el grano de frijol caupí.

ABSTRACT

Deficiencies in micronutrients can reduce the yield of legumes, the second more important food for human consumption. To counteract iron (Fe) and zinc (Zn) deficiencies in staple crops, agronomic fertilization techniques are applied, which are important in traditional crops. The objective of this study was to evaluate the effect of the application of ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in combination with zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) on yield, mineral content and antioxidant activity of biofortified cowpea beans (*Vigna unguiculata*). The hypothesis was that at least one combination of these compounds would improve bean yield and nutritional quality. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement with three replications. The first factor was $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ application rate (Fe1-Fe4: 0, 25, 50, 100 $\mu\text{M L}^{-1}$), and the second factor was $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rate (Zn1-4: 0, 25, 50, 100 $\mu\text{M L}^{-1}$). Sixteen treatments were the result, which corresponded to the combination of levels of the factors. The application of the treatments increased yield ($p \leq 0.05$) from 15.6 to 51.0%; also, Fe content from 21.1 to 36.8%, Zn content from 1.1 to 12.7%. Total phenolic content from 1.8 to 30.5% and antioxidant activity from 1.5 to 35.2%. The study showed that biofortification with ferrous sulfate in combination with zinc sulfate can be an alternative to increase yield, mineral content and antioxidant activity in cowpea bean.

Key words: total phenolic content, malnutrition, DPPH radical, *Vigna unguiculata*, zinc.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6220-5309>.

Recibido: octubre, 2020. Aprobado: junio, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 357-367. 2021.

Palabras clave: contenido fenólico total, malnutrición, radical DPPH, *Vigna unguiculata*, zinc.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son el segundo alimento más importante para el consumo humano, aportan el doble de proteína que los cereales y proveen elementos minerales, ácidos grasos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y fitoquímicos (Awika y Duodu, 2017). El frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) es una fabácea de grano producida en las regiones tropicales y subtropicales, se consumen los granos secos, vainas, hojas y granos verdes. En México, el frijol caupí se utiliza para preparar platillos tradicionales en los estados del sureste del país (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015). El contenido mineral en el grano depende no solo de la genética del cultivo sino también de la disponibilidad del elemento mineral en el suelo donde se produce la leguminosa (Alloway, 2013).

La desnutrición mineral se considera un desafío global para la humanidad (WHO, 2020). La deficiencia de hierro (Fe) y zinc (Zn) en los alimentos genera problemas de salud pública en el mundo, afecta el crecimiento, apetito, desarrollo cognitivo e intelectual en niños, el estado inmunológico y el rendimiento en adolescentes y adultos (Poniedzialek *et al.*, 2020). La deficiencia de Fe y Zn afecta a más de dos mil millones de habitantes en el mundo, y 60% es por deficiencia de Fe y 30% por deficiencia de Zn (Prasad y Shivay, 2020).

La biofortificación de cultivos se ha implementado como estrategia mundial para incrementar el contenido de elementos esenciales en la parte comestible (Poniedzialek *et al.*, 2020). Connorton y Balk (2019) y Di Gioia *et al.* (2019) estudiaron el efecto de la aplicación exógena de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.), para incrementar el contenido de Fe y Zn, pero hay pocos estudios sobre leguminosas de grano. Además, las investigaciones relacionadas con la biofortificación se han enfocado en incrementar el contenido de compuestos bioactivos y antioxidantes (Islam *et al.*, 2020).

Sin embargo, suplementar las deficiencias (Fe-Zn) puede tener efectos distintos, que permitan obtener alimentos vegetales enriquecidos con microelementos y fitoquímicos de importancia para la dieta alimentaria.

INTRODUCTION

Legumes are the second more important food for human consumption, they provide twice as much protein as cereals and provide mineral elements, fatty acids, amino acids, carbohydrates, vitamins and phytochemicals (Awika and Duodu, 2017). Cowpea bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.) is a grain Fabaceae member produced in tropical and subtropical regions, where dried beans, pods, leaves and green beans are consumed. In Mexico, cowpea beans are used to prepare traditional dishes in the southeastern states of the country (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015). The mineral content in the bean depends not only on the crop genetics but also on the availability of mineral elements in the soil where the legume is produced (Alloway, 2013).

Mineral malnutrition is considered a global challenge for humanity (WHO, 2020). Iron (Fe) and zinc (Zn) deficiency in foods generates public health problems in the world, affecting growth, appetite, cognitive and intellectual development in children, immune status and performance in adolescents and adults (Poniedzialek *et al.*, 2020). Fe and Zn deficiency affect more than two billion inhabitants in the world, and 60% is due to Fe deficiency and 30% due to Zn deficiency (Prasad and Shivay, 2020).

Crop biofortification has been implemented as a worldwide strategy to increase the content of essential elements in the edible portion (Poniedzialek *et al.*, 2020). Connorton and Balk (2019) and Di Gioia *et al.* (2019) studied the effect of exogenous application of ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) on rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) to increase Fe and Zn content, but there are few studies on grain legumes. In addition, research related to biofortification has focused on increasing the content of bioactive compounds and antioxidants (Islam *et al.*, 2020).

However, supplementing deficiencies (Fe-Zn) may have different effects, which would allow obtaining plant foods enriched with microelements and phytochemicals of dietary importance. The content of Fe and Zn in grain produced in traditional systems in the state of Tabasco is relatively low, so the use of agronomic biofortification is recommended to increase them.

Therefore, under the premise that at least a combination of these compounds, as a biofortification

El contenido de Fe y Zn en el grano producido en sistemas tradicionales del estado de Tabasco es relativamente bajo, por lo que se recomienda el uso de la biofortificación agronómica para incrementarlos. Por lo anterior, bajo la premisa de que al menos una combinación de estos compuestos, como procedimiento de biofortificación, podría mejorar el rendimiento y la calidad nutricional del frijol caupí (*V. unguiculata*); el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc sobre el rendimiento, contenido mineral y la actividad antioxidante del frijol caupí.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en un sistema protegido en la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en el municipio de Centro, Tabasco, México; en las coordenadas 17° 46' 56" N y 92° 57' 28" O, altitud 21 m, y temperatura promedio de 37 °C. En el estudio se usaron semillas de frijol caupí seleccionadas por Márquez-Quiroz *et al.* (2015) en un estudio previo. La siembra se realizó en bolsas de polietileno negro (30 cm de ancho y 35 cm de alto), llenas con sustrato inerte (tepetzil). La densidad de siembra fue de 44 444 plantas por hectárea.

En el ciclo del cultivo se aplicó la solución nutritiva descrita por Márquez-Quiroz *et al.* (2015): 14 mM de NO_3^- , 1 mM de H_2PO_4^- , 4 mM de SO_4^{2-} , 6 mM de K^+ , 8 mM de Ca^{2+} y 4 mM de Mg^{2+} . Para suministrar los microelementos en la solución nutritiva se utilizó el producto TradeCorp AZ® (mezcla Quelatos, Cía. Rovensa, España). El pH de la solución se ajustó entre 5.5 y 6.0 con ácido sulfúrico. La solución nutritiva se aplicó de forma manual, con aporte de 250 mL los primeros 20 d después de la germinación. La dosis aumentó a 500 mL del día 21 al 50; los días 51 al 90 después de la siembra (dds) se aplicaron 1000 mL. Para prevenir un exceso en la acumulación de sales de las soluciones nutritivas se usó un riego de 1.5 L de agua cada 8 d. El agua de riego se clasificó como agua de salinidad baja y contenido bajo de sodio ($\text{C}_1 \text{S}_1$), conductividad eléctrica de 1.1 dS m^{-1} , pH de 7.0, y la concentración de los cationes fue Ca^{2+} : 4.6, Mg^{2+} : 1.3, K^+ : 0.2, Na^+ : 3.0 mM L^{-1} , y de aniones: HCO_3^- : 4.6, Cl^- : 4.0 y SO_4^{2-} : 0 mM L^{-1} .

Los tratamientos evaluados resultaron de las combinaciones de las dosis de 0, 25, 50 y 100 $\mu\text{M L}^{-1}$ de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), grado reactivo (Cuadro 1), para un total de 16 tratamientos. Las aplicaciones al sustrato (250 mL por maceta) se realizaron de manera manual cada tercer día, a partir del día 21 y hasta los 90 dds.

procedure, would improve yield and nutritional quality of cowpea (*V. unguiculata*); the objective of this study was to evaluate the effect of the application of ferrous sulfate in combination with zinc sulfate on yield, mineral content and antioxidant activity of cowpea.

MATERIALS AND METHODS

The research was conducted in a protected system at the División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, in the municipality of Centro, Tabasco, Mexico; coordinates 17° 46' 56" N and 92° 57' 28" W, 21 m altitude, with an average temperature of 37 °C. Cowpea bean seeds selected by Márquez-Quiroz *et al.* (2015) in a previous study were used in our research. Planting was performed in black polyethylene bags (30 cm wide and 35 cm high) filled with inert substrate (tepetzil). The planting density was 44 444 plants per hectare.

During the crop cycle, the nutrient solution described by Márquez-Quiroz *et al.* (2015) was applied: 14 mM NO_3^- , 1 mM H_2PO_4^- , 4 mM SO_4^{2-} , 6 mM K^+ , 8 mM Ca^{2+} and 4 mM Mg^{2+} . TradeCorp AZ® (Chelate mixture, Rovensa, Spain) was used to supply the microelements in the nutrient solution. The pH of the solution was adjusted between 5.5 and 6.0 with sulfuric acid. The nutrient solution was applied manually, with a 250 mL dose during the first 20 d after germination. The dose increased to 500 mL from day 21 to 50; at 51 to 90 days after planting (dds) 1000 mL were applied. To prevent an excessive accumulation of salts in the nutrient solutions, 1.5 L of irrigation water were applied every 8 d. The irrigation water was classified as low salinity and low sodium content water ($\text{C}_1 \text{S}_1$), electrical conductivity of 1.1 dS m^{-1} , pH of 7.0, and the concentration of cations was Ca^{2+} : 4.6, Mg^{2+} : 1.3, K^+ : 0.2, Na^+ : 3.0 mM L^{-1} , and of anions: HCO_3^- : 4.6, Cl^- : 4.0 and SO_4^{2-} : 0 mM L^{-1} .

The treatments evaluated resulted from combinations of 0, 25, 50 and 100 $\mu\text{M L}^{-1}$ of ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) doses, reagent grade (Table 1), for a total of 16 treatments. Applications to the substrate (250 mL per pot) were made manually every third day, from 21 to 90 dds.

The plants were guided and separated vertically with twine stakes. Phytosanitary management was carried out with the application of the Karate Zeon® insecticide (Lambda cyhalothrin; Agrisolver) for controlling *Spodoptera* and Sulfacob 25° (copper sulfate pentahydrate; Agrisolver) for controlling *Colletotrichum lindemuthianum*.

Yield (g of grain per plant), number of mature pods harvested per plant, number of grains per plant (18 pods per

Cuadro 1. Formulación de tratamientos con dos microelementos (Fe) y (Zn) en combinaciones de cuatro dosis cada uno, para biofortificación del frijol caupí.**Table 1. Formulation of treatments with two microelements (Fe) and (Zn) in combinations of four doses each, for biofortification of cowpea bean.**

Tratamiento	Dosis de formulación de las soluciones con hierro y zinc (Fe - Zn)	FeSO ₄ ($\mu\text{M L}^{-1}$)	ZnSO ₄ ($\mu\text{M L}^{-1}$)
Fe1-Zn1	Control, sin Fe – sin Zn	0	0
Fe2-Zn1	Baja Fe - sin Zn	25	0
Fe3-Zn1	Media Fe - sin Zn	50	0
Fe4-Zn1	Alta Fe – sin Zn	100	0
Fe1-Zn2	Sin Fe - baja Zn	0	25
Fe2-Zn2	Baja Fe - baja Zn	25	25
Fe3-Zn2	Media Fe - baja Zn	50	25
Fe4-Zn2	Alta Fe – baja Zn	100	25
Fe1-Zn3	Sin Fe - media Zn	0	50
Fe2-Zn3	Baja Fe - media Zn	25	50
Fe3-Zn3	Media Fe - media Zn	50	50
Fe4-Zn3	Alta Fe - media Zn	100	50
Fe1-Zn4	Sin Fe - alta Zn	0	100
Fe2-Zn4	Baja Fe - alta Zn	25	100
Fe3-Zn4	Media Fe - alta Zn	50	100
Fe4-Zn4	Alta Fe - alta Zn	100	100

Las plantas se guiaron y separaron de forma vertical con tutores de hilo rafia. El manejo fitosanitario se efectuó con aplicación del insecticida Karate Zeon® (Lambda cyhalotrina; Agrisolver) para el control de *Spodoptera* y Sulfacob 25® (sulfato de cobre pentahidratado; Agrisolver) para el control de *Colletotrichum lindemuthianum*.

El rendimiento (g de grano por planta), número de vainas maduras cosechadas por planta, número de granos por planta (18 vainas por tratamiento), peso de 100 semillas, contenido mineral, contenido fenólico total y actividad antioxidante se evaluó a los 90 dds. El peso se registró en una balanza granataria (Ohaus Scout® Pro, modelo H-2710, Darmstadt, Germany) con precisión de ± 0.1 g. Todas las variables se midieron por triplicado.

La determinación del contenido mineral se realizó en los granos secos de la tercera y cuarta vaina cosechada, seis vainas por tratamiento, los cuales se molieron en un molino (Krupps, Modelo GX4100; Lyon, France), y después las muestras se cribaron con tamiz de 2 mm. Estas determinaciones se realizaron en el laboratorio de Fisiología y Nutrición Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Delicias. El nitrógeno orgánico (N) se cuantificó por el método Micro-Kjeldahl. El fósforo (P) se determinó por el método colorimétrico de vanadomolibdato en un espectrofotómetro (GENESIS 10S UV-VIS, Waltham, MA, USA) a 430 nm. La determinación del potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), manganeso (Mn), hierro (Fe) y zinc (Zn) se cuantificó por espectrofotometría de absorción atómica en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™,

treatment), 100-seed weight, mineral content, total phenolic content and antioxidant activity were evaluated at 90 dds. Weight was recorded on a granatary balance (Ohaus Scout® Pro, model H-2710, Darmstadt, Germany) with an accuracy of ± 0.1 g. All variables were measured in triplicate.

The determination of mineral content was carried out on the dry grains of the third and fourth pod harvested, six pods per treatment, which were ground in a mill (Krupps, Model GX4100; Lyon, France), and then the samples were sieved with a 2 mm screen. These determinations were carried out in the Laboratorio de Fisiología y Nutrición Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Delicias. Organic nitrogen (N) was quantified by the Micro-Kjeldahl method. Phosphorus (P) was determined by the vanadomolybdate colorimetric method in a spectrophotometer (GENESIS 10S UV-VIS, Waltham, MA, USA) at 430 nm. The determination of potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), manganese (Mn), iron (Fe) and zinc (Zn) was quantified by atomic absorption spectrophotometry in a spectrophotometer (Thermo Scientific™, model iCE 3000 series AAS, Waltham, MA, USA), and all analyses were performed in triplicate.

The extraction of antioxidant compounds was performed according to the methodology described by Guillén-Molina *et al.* (2016), for which 0.2 g of cowpea bean flour sample was weighed, 10 mL of the acetone - water mixture (7:3) was added and shaken for 30 min in a shaker (Orbit-Shaker, model 3520, Waltham, MA, USA). It was then centrifuged for 5 min at $7.735 \times g$

modelo iCE 3000 series AAS, Waltham, MA. USA), y todos los análisis se hicieron por triplicado.

La extracción de compuestos antioxidantes se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Guillén-Molina *et al.* (2016), para lo cual se pesó 0.2 g de muestra de harina de frijol caupí, se añadió 10 mL de la mezcla acetona – agua (7:3) y se agitó 30 min en un agitador (Orbit-Shaker, modelo 3520, Waltham, MA. USA). Luego se centrifugó por 5 min a 7.735 x g a 4 °C (Hermle, modelo Z323K, UKAS, United Kingdom). El sobrenadante se recuperó y el precipitado se sometió a una nueva extracción bajo las mismas condiciones de la primera extracción; para luego filtrar y unir el primer y segundo filtrado.

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. A 0.5 mL del extracto acetónico se añadieron 2.5 mL de Folin-Ciocalteu con dilución en agua (1:10) y 2 mL de carbonato de sodio. La mezcla reposó 1 h en oscuridad. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (UV/VIS BRAIC, UV-1800; Beijing, China) a 760 nm. La curva de calibración se realizó de 10 a 100 mg mL⁻¹ con ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG g⁻¹).

La actividad antioxidante se determinó con la metodología descrita por Guillén-Molina *et al.* (2016). A 200 µL del extracto acetónico se añadieron 1800 µL de solución de radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) disuelto a 125 µM en metanol al 80% (metanol – agua), reposó 60 min en oscuridad y la absorbancia se midió a 517 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS BRAIC, UV-1800; Beijing, China). Todas las mediciones se realizaron tres veces. La actividad antioxidante se expresó en porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar en un arreglo factorial. Los factores fueron los fertilizantes sulfato ferroso (FeSO₄·7H₂O) y sulfato de zinc (ZnSO₄·7H₂O) en dosis de aplicación (nula, baja, media y alta) 0, 25, 50 y 100 µM L⁻¹ respectivamente, para cada elemento (Fe o Zn). Así, con las combinaciones hubo 16 tratamientos con tres repeticiones por tratamiento, para un total de 48 unidades experimentales. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Fisher (p≤0.05). Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación de FeSO₄ - ZnSO₄ tuvo un efecto positivo en las variables rendimiento, número de

at 4 °C (Hermle, model Z323K, UKAS, United Kingdom). The supernatant was recovered, and the precipitate was subjected to a new extraction under the same conditions of the first extraction; then filtering and joining the first and second filtrate.

The total phenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method. 2.5 mL of Folin-Ciocalteu with dilution in water (1:10) and 2 mL of sodium carbonate were added to 0.5 mL of the acetone extract. The mixture rested for 1 h in the dark. The absorbance was measured in a spectrophotometer (UV/VIS BRAIC, UV-1800; Beijing, China) at 760 nm. The calibration curve was performed from 10 to 100 mg mL⁻¹ with gallic acid. Results were expressed as mg gallic acid equivalents per gram of sample (mg EAG g⁻¹).

Antioxidant activity was determined using the methodology described by Guillén-Molina *et al.* (2016). 1800 µL of DPPH (radical solution 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 125 µM dissolved in 80% methanol (methanol - water) were added to 200 µL of the acetonic extract, then rested for 60 min in the dark, and absorbance was measured at 517 nm in a spectrophotometer (UV/VIS BRAIC, UV-1800; Beijing, China). All measurements were performed three times. Antioxidant activity was expressed as percentage inhibition of the DPPH radical.

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement. The factors were ferrous sulfate (FeSO₄·7H₂O) and zinc sulfate (ZnSO₄·7H₂O) fertilizers at doses of (null, low, medium and high application) 0, 25, 50 and 100 µM L⁻¹, respectively, for each element (Fe or Zn). Thus, with the combinations there were 16 treatments with three replicates per treatment, for a total of 48 experimental units. With the data obtained, an analysis of variance and comparison of means was performed with the Fisher's test (p≤0.05). The analyses were performed with the SAS statistical software for Windows (SAS Institute Inc., 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

The application of FeSO₄ - ZnSO₄ had a positive effect on the variables yield, number of pods per plant and grains per plant (Table 2), and in this sense, the addition of a medium dose of iron and a high dose of zinc (Fe3-Zn4) increased yield by 51.04%, compared to the value obtained in the control (Fe1-Zn1). The yield obtained in this study was 1.37 - 2.07 times higher than the 7 g of grain per plant reported by Apáez-Barrios *et al.* (2011), who studied a traditional production system without biofortification. But it

vainas por planta y granos por planta (Cuadro 2), y en este sentido la adición de la dosis media de hierro y alta de zinc (Fe3-Zn4) incrementó el rendimiento en 51.04%, en comparación con el valor obtenido en el control (Fe1-Zn1). El rendimiento obtenido en este estudio fue 1.37 - 2.07 veces mayor que los 7 g de grano por planta documentados por Apáez-Barrios *et al.* (2011), quienes estudiaron un sistema de producción tradicional sin biofortificación. Pero fue 11.04% inferior a los 16.3 g por planta obtenidos por Guillén-Molina *et al.* (2016), quienes adicionaron a la solución nutritiva la combinación de dosis media de quelato de hierro y dosis media de quelato de zinc ($50 \mu\text{M L}^{-1}$ de Fe-EDDHA - $50 \mu\text{M L}^{-1}$ de Zn-EDTA). Esta diferencia en el rendimiento se debió a que los quelatos son compuestos con estabilidad mayor, hecho que facilitó su absorción por la planta.

Al respecto, el Zn participa en el desarrollo floral de las leguminosas y un aporte insuficiente puede afectar el rendimiento, número de vainas y granos (Poblaciones y Rengel, 2016). La adición de dosis baja de hierro, sin zinc (Fe2-Zn1) incrementó el número de vainas por planta en 34.4%, en comparación con el control. Respecto al número de granos por planta

was 11.04% lower than the 16.3 g per plant obtained by Guillén-Molina *et al.* (2016), who added the combination of a medium dose of iron chelate and a medium dose of zinc chelate ($50 \mu\text{M L}^{-1}$ of Fe-EDDHA - $50 \mu\text{M L}^{-1}$ of Zn-EDTA) to the nutrient solution. This difference in yield was due to chelates are compounds with greater stability, a fact which facilitated their absorption by the plant.

In this regard, Zn participates in the floral development of legumes and an insufficient supply can affect yield, number of pods and grains (Poblaciones and Rengel, 2016). The addition of low iron doses, without zinc (Fe2-Zn1) increased the number of pods per plant by 34.4%, compared to the control. Regarding the number of grains per plant, values ranging from 67.2 to 110.3 grains per plant were observed, with increases of 64.1, 61.1, and 56.6% under the Fe4-Zn1, Fe2-Zn3, and Fe2-Zn1 treatments, respectively, compared to the control.

The 100-grain weight values ranged from 11.6 to 15.1 g, with increases of 11.2 and 12.7% when solutions with medium iron and zinc (Fe3-Zn3) and low iron and high zinc (Fe2-Zn4) doses were added, respectively, compared to the control. Grain size is an important criterion for consumers, since small grains

Cuadro 2. Efecto de la aplicación de sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc sobre el rendimiento de frijol caupí.

Table 2. Effect of ferrous sulfate application in combination with zinc sulfate on cowpea bean yield.

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{M L}^{-1}$)	Rendimiento (g de grano por planta)	Número de vainas por planta	Granos por planta	Peso de 100 granos (g)
Fe1-Zn1	0-0	9.6 b [†]	6.4 b	67.2 c	13.4 abc
Fe2-Zn1	25-0	12.7 ab	8.6 a	105.3 a	13.5 abc
Fe3-Zn1	50-0	12.6 ab	7.6 ab	93.3 abc	13.6 abc
Fe4-Zn1	100-0	13.4 ab	8.0 ab	110.3 a	11.9 bc
Fe1-Zn2	0-25	10.2 ab	7.6 ab	81.0 abc	11.6 c
Fe2-Zn2	25-25	11.3 ab	6.7 ab	78.5 abc	12.3 bc
Fe3-Zn2	50-25	14.4 a	8.3 ab	99.6 ab	13.7 abc
Fe4-Zn2	100-25	13.4 ab	8.0 ab	93.6 abc	13.9 abc
Fe1-Zn3	0-50	11.1 ab	6.8 ab	83.3 abc	13.5 abc
Fe2-Zn3	25-50	13.6 ab	8.3 ab	108.3 a	13.6 abc
Fe3-Zn3	50-50	13.2 ab	7.3 ab	89.0 abc	14.9 a
Fe4-Zn3	100-50	13.2 ab	7.6 ab	100.0 ab	13.9 abc
Fe1-Zn4	0-100	12.8 ab	7.6 ab	97.6 ab	13.1 abc
Fe2-Zn4	25-100	12.9 ab	7.0 ab	93.3 abc	15.1 a
Fe3-Zn4	50-100	14.5 a	7.6 ab	101.6 ab	14.3 ab
Fe4-Zn4	100-100	11.9 ab	7.0 ab	88.3 abc	13.5 abc

[†]Valores con letra distinta indican diferencia estadística (Fisher, $p \leq 0.05$). ♦ [†]Values with different letter indicate statistical difference (Fisher, $p \leq 0.05$).

se observaron valores de entre 67.2 a 110.3 granos por planta, con incrementos de 64.1, 61.1 y 56.6% bajo los tratamientos Fe4-Zn1, Fe2-Zn3, y Fe2-Zn1, respectivamente, en comparación con el control.

Los valores del peso de 100 granos oscilaron de 11.6 a 15.1 g, con incrementos de 11.2 y 12.7% al adicionar las soluciones con dosis media de hierro y zinc (Fe3-Zn3) y dosis baja de hierro y alta de zinc (Fe2-Zn4), respectivamente, en comparación con el control. El tamaño del grano es un criterio importante para los consumidores, los granos pequeños se asocian con un menor tiempo de cocción (Guillén-Molina *et al.*, 2016). El valor obtenido en el presente estudio es superior a los 11 g registrados por Apáez-Barrios *et al.* (2011). Al respecto, Manzeke *et al.* (2017) indicaron que la fertilización con Zn²⁺ incrementa la producción y calidad nutricional del frijol caupí.

La adición de las dosis baja y media de hierro, sin zinc (Fe2-Zn1, Fe3-Zn1), y la dosis alta de ambos elementos (Fe4-Zn4) incrementó el contenido de N en 11.3, 3.7 y 2.0% respectivamente, en comparación con el control (Cuadro 3). Nuestros valores se encuentran dentro de los contenidos de N registrados

are associated with shorter cooking time (Guillén-Molina *et al.*, 2016). The value obtained in this study is higher than the 11 g reported by Apáez-Barrios *et al.* (2011). In this regard, Manzeke *et al.* (2017) indicated that fertilization with Zn²⁺ increases the production and nutritional quality of cowpea.

The addition of the low and medium doses of iron, without zinc (Fe2-Zn1, Fe3-Zn1), and the high dose of both elements (Fe4-Zn4) increased the N content by 11.3, 3.7 and 2.0%, respectively, compared to the control (Table 3). Our values are within the N contents recorded for cowpea beans, which range from 2.50 to 4.80% (Carvalho *et al.*, 2012; Muranaka *et al.*, 2016).

Regarding phosphorus compared to the control, the addition of a low dose of iron without zinc (Fe2-Zn1) increased the P content by 8.0%, while the addition of a medium dose of iron without zinc (Fe3-Zn1) modified the P content by 1.3%. The solution with low doses of both elements (Fe2-Zn2) increased the P content by 18.7%, which corresponds to the largest increase. Then, the addition of a medium dose of iron and a low dose of zinc (Fe3-Zn2) showed an increase in P of 4.0%; while adding a high dose of

Cuadro 3. Efecto de la aplicación sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc sobre el contenido mineral de los granos de frijol caupí biofortificados.

Table 3. Effect of ferrous sulfate application in combination with zinc sulfate on mineral content of biofortified cowpea beans.

Tratamiento	Dosis (μM L ⁻¹)	N [†]	P [‡]	K ^b (%)	Ca [°]	Mg ^{††}	Fe ^{¶¶}	Zn ^{§§} (mg kg ⁻¹)	Mn ^{bb}
Fe1-Zn1	0-0	3.54 e ^{ff}	0.075 cde	1.18 a	0.072 a	0.14 a	34.12 bc	49.62 a	9.43 ab
Fe2-Zn1	25-0	3.94 h	0.081 de	1.26 bc	0.097 b	0.15 a	46.69 i	55.88 f	11.93 c
Fe3-Zn1	50-0	3.67 g	0.076 cd	1.23 abc	0.118 cdef	0.15 a	41.33 h	55.91 f	9.72 ab
Fe4-Zn1	100-0	3.31 b	0.073 cd	1.24 abc	0.111 bcd	0.14 a	37.98 ef	51.58 abc	10.27 b
Fe1-Zn2	0-25	3.43 cde	0.065 bc	1.28 cd	0.12 def	0.15 a	32.79 ab	54.47 ef	9.72 ab
Fe2-Zn2	25-25	3.27 ab	0.089 e	1.33 d	0.116 cde	0.15 a	34.95 c	52.96 cde	10.41 b
Fe3-Zn2	50-25	3.45 de	0.078 de	1.21 ab	0.123 def	0.14 a	35.79 cd	51.89 bcd	10.17 ab
Fe4-Zn2	100-25	3.32 bc	0.077 cde	1.23 abc	0.134 f	0.15 a	35.61 cd	54.15 def	10.17 ab
Fe1-Zn3	0-50	3.35 bcd	0.083 de	1.24 abc	0.129 ef	0.15 a	31.89 a	50.88 abc	8.94 a
Fe2-Zn3	25-50	3.18 a	0.079 de	1.27 bcd	0.127 def	0.15 a	40.33 gh	54.49 ef	10.34 b
Fe3-Zn3	50-50	3.36 bcd	0.058 ab	1.25 abc	0.134 f	0.14 a	37.61 de	54.61 ef	9.29 ab
Fe4-Zn3	100-50	3.44 cde	0.047 a	1.21 ab	0.132 ef	0.15 a	37.09 de	53.05 cde	9.24 ab
Fe1-Zn4	0-100	3.31 b	0.052 ab	1.22 abc	0.127 def	0.14 a	33.66 abc	52.65 cde	9.57 ab
Fe2-Zn4	25-100	3.29 ab	0.056 ab	1.23 abc	0.128 def	0.15 a	38.23 efg	53.97 def	9.13 ab
Fe3-Zn4	50-100	3.32 bc	0.052 ab	1.27 bcd	0.124 def	0.15 a	39.86 fgh	54.50 ef	10.35 b
Fe4-Zn4	100-100	3.61 fg	0.057 ab	1.24 abc	0.102 bc	0.19 b	34.95 c	50.16 ab	10.27 b

[†]Valores con letra distinta indican diferencia estadística (Fisher, p ≤ 0.05); [†]N: nitrógeno; [‡]P: fósforo; ^bK: potasio; [°]Ca: calcio; ^{††}Mg: magnesio; ^{¶¶}Fe: hierro; ^{§§}Zn: zinc; ^{bb}Mn: manganeso. ♦ [†]Values with different letters indicate statistical difference (Fisher, p ≤ 0.05); [†]N: nitrogen; [‡]P: phosphorus; ^bK: potassium; [°]Ca: calcium; ^{††}Mg: magnesium; ^{¶¶}Fe: iron; ^{§§}Zn: zinc; ^{bb}Mn: manganese.

para frijol caupí, los cuales oscilan de 2.50 a 4.80% (Carvalho *et al.*, 2012; Muranaka *et al.*, 2016).

Respecto al fósforo comparado con el control, la adición de dosis baja de hierro sin zinc (Fe2-Zn1) incrementó 8.0% el contenido de P; mientras la adición de dosis media de hierro, sin zinc (Fe3-Zn1) modificó el contenido de P en 1.3%. La solución con dosis baja de ambos elementos (Fe2-Zn2) aumentó 18.7% el contenido de P, lo cual corresponde al incremento mayor. Luego, la adición de dosis media de hierro y baja de zinc (Fe3-Zn2) mostró un incremento en P del 4.0%; mientras que añadir dosis alta de hierro y baja de zinc (Fe4-Zn2) aumentó el contenido de P en 2.7%.

Otra respuesta favorable respecto a fósforo se obtuvo con la adición de la dosis media de zinc, sin añadir hierro (Fe1-Zn3), esto incrementó el contenido de P en 10.7%. Por último, la adición de dosis baja de hierro y media de zinc (Fe2-Zn3) incrementó el contenido de P en 5.3% en comparación con el control. El contenido de P en nuestro estudio se encuentra en el intervalo de deficiencia de acuerdo con lo reportado por Guillén-Molina *et al.* (2016). Al respecto se ha observado en otros cultivos que al incrementar la dosis de Zn^{2+} , el contenido de P disminuye (Hussain *et al.*, 2020).

La adición de dosis baja de ambos elementos (Fe2-Zn2), alta de hierro y baja de zinc (Fe4-Zn2), y dosis alta de ambos elementos (Fe4-Zn4) incrementó respectivamente el contenido de K, Ca y Mg en 12.7, 86.1 y 35.7%, en comparación con el control. En nuestro estudio, el contenido de estos macroelementos en el grano contrasta con los resultados de Espinosa-Moreno (2013), quienes encontraron contenidos de 1.5, 0.28 y 0.22% para K, Ca y Mg, respectivamente en el grano de frijol caupí, de producción tradicional en Tabasco.

Los contenidos de microelementos variaron: Fe (entre 31.89 y 46.69 $mg\ kg^{-1}$), Zn (de 50.16 a 55.91 $mg\ kg^{-1}$) y los de Mn entre 9.13 y 11.93 $mg\ kg^{-1}$. La adición de la dosis baja de Fe, sin Zn (Fe2-Zn1) incrementó el contenido de Fe, Zn y Mn en 36.8, 12.6 y 26.5% respectivamente, en comparación con el control. Al respecto, el aumento en las dosis de los fertilizantes usados no siempre va a permitir una acumulación mayor en el grano, porque depende del movimiento de los microelementos como iones libres desde el tallo hasta el grano (Hussain *et al.*, 2020).

iron and low dose of zinc (Fe4-Zn2) increased the P content by 2.7%.

Another favorable response with respect to phosphorus was obtained with the addition of a medium dose of zinc, without adding iron (Fe1-Zn3), which increased the P content by 10.7%. Finally, the addition of a low dose of iron and medium dose of zinc (Fe2-Zn3) increased the P content by 5.3% compared to the control. The P content in our study is in the deficiency range as reported by Guillén-Molina *et al.* (2016). In this regard, it has been observed in other crops that by increasing the dose of Zn^{2+} , the P content decreases (Hussain *et al.*, 2020).

The addition of low doses of both elements (Fe2-Zn2), high iron and low zinc (Fe4-Zn2) doses, and high doses of both elements (Fe4-Zn4) increased the K, Ca and Mg contents by 12.7, 86.1 and 35.7%, respectively, compared to the control. In our study, the content of these macroelements in the grain contrasts with the results of Espinosa-Moreno (2013), who found contents of 1.5, 0.28 and 0.22% for K, Ca and Mg, respectively, in cowpea bean of traditional production in Tabasco.

The microelement contents varied: Fe (between 31.89 and 46.69 $mg\ kg^{-1}$), Zn (from 50.16 to 55.91 $mg\ kg^{-1}$) and Mn (between 9.13 and 11.93 $mg\ kg^{-1}$). The addition of the low dose of Fe, without Zn (Fe2-Zn1) increased the Fe, Zn and Mn content by 36.8, 12.6 and 26.5%, respectively, compared to the control. In this regard, the increase in the doses of fertilizers used will not always allow a greater accumulation in the grain, because it depends on the movement of microelements as free ions from the stem to the grain (Hussain *et al.*, 2020).

Similarly, transpiration rate modifies the ability to absorb and mobilize mineral elements (White *et al.*, 2017). The phenological stage of the plant, environmental factors such as drought stress, and high levels of N, P, Fe and Cd in the rhizosphere can affect plant Zn uptake (Gupta *et al.*, 2017). Likewise, there is evidence that the addition of high doses of zinc sulfate interferes with the uptake and translocation of P, Ca and Fe, in addition to causing cytological disorders in the plant (Hussain *et al.*, 2020).

The addition of a low dose of zinc, without iron (Fe1-Zn2), a low dose of both elements (Fe2-Zn2), a medium dose of iron and low dose of zinc (Fe3-Zn2), and a high dose of iron with low dose of zinc (Fe4-Zn2) increased the total phenol content by

De manera similar, la tasa de transpiración modifica la capacidad para absorber y movilizar elementos minerales (White *et al.*, 2017). La etapa fenológica de la planta, los factores ambientales como el estrés por sequía, niveles altos de N, P, Fe y Cd en la rizósfera pueden afectar la absorción de Zn en la planta (Gupta *et al.*, 2017). También existe evidencia de que la adición de dosis elevadas de sulfato de zinc interfiere en la absorción y translocación de P, Ca y Fe, además de provocar desórdenes citológicos en la planta (Hussain *et al.*, 2020).

La adición de dosis baja de zinc, sin hierro (Fe1-Zn2), dosis baja de ambos elementos (Fe2-Zn2), dosis media de hierro y baja de zinc (Fe3-Zn2) y dosis alta de hierro con la dosis baja de zinc (Fe4-Zn2) incrementó respectivamente el contenido de fenoles totales en 24.5, 30.5, 25.0 y 22.8% en comparación con el control (Figura 1A). Además, los tratamientos

24.5, 30.5, 25.0, respectivamente, and 22.8% compared to the control (Figure 1A). In addition, the above treatments increased 35.2, 33.0, 20.0, and 17.3%, respectively, the antioxidant activity compared to the control (Figure 1B).

In this study, the antioxidant activity in biofortified cowpea bean contrasted with the results reported by Guillén-Molina *et al.* (2016) who found values of 25 to 40% inhibition of the DPPH radical. Sida-Arreola *et al.* (2015; 2017) obtained an increase in antioxidant activity by individually adding 25 $\mu\text{M L}^{-1}$ ferrous sulfate and 25 $\mu\text{M L}^{-1}$ zinc sulfate to common bean. The content of antioxidant compounds varies depending on genotype, growing conditions, agronomic practices, time of crop establishment, maturity, storage and the solvent used for extraction (Zia-Ul-Haq *et al.*, 2013). Flavonoids, flavonols, and condensed tannins are the main compounds

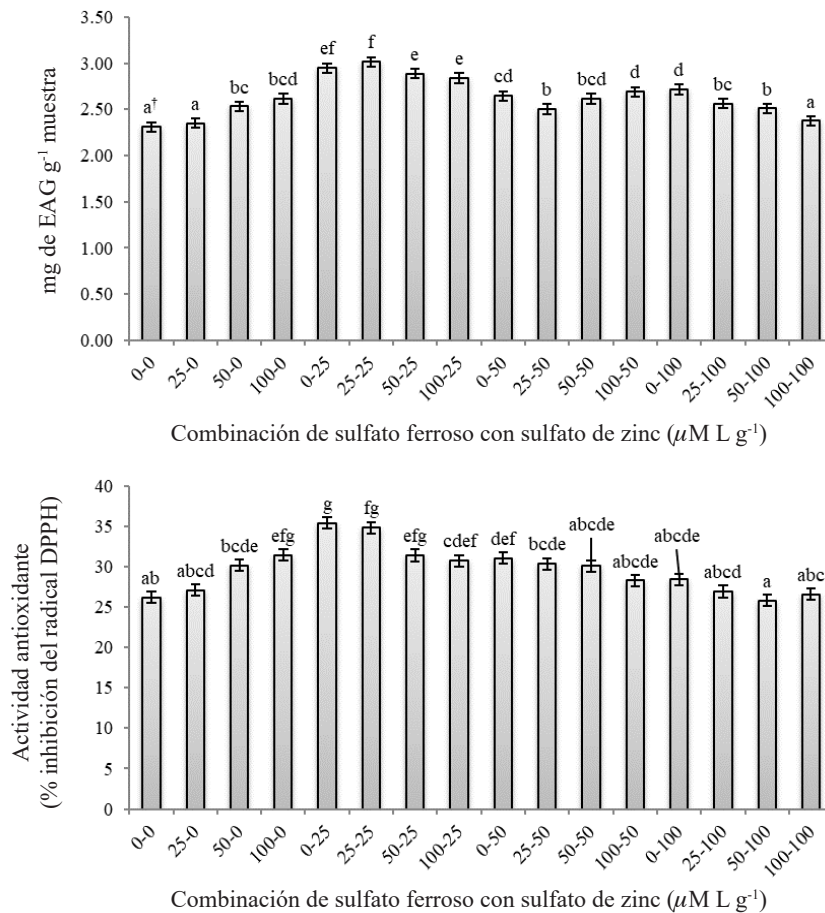


Figura 1. Contenido de fenoles totales (A) y actividad antioxidante (B) en el grano de frijol caupí biofortificado. †Valores con letra distinta indican diferencia estadística (Fisher, $p \leq 0.05$).

Figure 1. Total phenol content (A) and antioxidant activity (B) in biofortified cowpea bean. †Values with different letter indicate statistical difference (Fisher, $p \leq 0.05$).

anteriores incrementaron 35.2, 33.0, 20.0, y 17.3% respectivamente la actividad antioxidante en comparación con el control (Figura 1B).

En este estudio, la actividad antioxidante en el grano de frijol caupí biofortificado contrastó con los resultados de Guillén-Molina *et al.* (2016) quienes encontraron valores de 25 a 40% de inhibición del radical DPPH. Sida-Arreola *et al.* (2015; 2017) obtuvieron un incremento de la actividad antioxidante al adicionar en forma individual $25 \mu\text{M L}^{-1}$ de sulfato ferroso y $25 \mu\text{M L}^{-1}$ sulfato de zinc al frijol común. El contenido de compuestos antioxidantes varía en función del genotipo, condiciones de crecimiento, prácticas agronómicas, época de establecimiento del cultivo, madurez, almacenamiento y solvente usado para la extracción (Zia-Ul-Haq *et al.*, 2013). Los flavonoides, flavonoles, y taninos condensados son los compuestos principales que confieren actividad antioxidante en leguminosas (Pajak *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

La adición de las combinaciones de dosis medias de sulfato ferroso con las dosis medias y bajas de sulfato de zinc incrementó el rendimiento de grano hasta en un 50%. Los contenidos de hierro, zinc, fenoles totales y la actividad antioxidante también aumentaron, respecto al tratamiento control. La biofortificación con sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc es una alternativa clara para incrementar el rendimiento, contenido mineral y actividad antioxidante en el grano de frijol caupí.

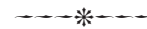
LITERATURA CITADA

- Alloway, B. J. 2013. Bioavailability of elements in soil. *In*: Selinus, O., B. Alloway, J. A. Centeno, R. B. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh, and P. Smedley (eds). *Essentials of Medical Geology: Revised Edition*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp: 351-373.
- Apáez-Barrios P., J. A. S. Escalante-Estrada, y M. T. Rodríguez-González. 2011. Crecimiento y rendimiento del frijol chino en función del tipo de espaldera y clima. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 13: 307-315.
- Awika, J. M., and K. G. Duodu. 2017. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. *J. Funct. Foods.* 38: 686-697.
- Carvalho, A. F. U., N. M. de Sousa, D. F. Farias, L. C. B. da Rocha-Bezerra, R. M. P. da Silva, M. P. Viana, S. T. Gouveia, S. S. Sampaio, M. B. de Sousa, G. P. G. de Lima, S. M. de Moraes, C. C. Barros, and F. R. F. Filho. 2012. Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including decreasing
- termination of antioxidant capacity and vitamins. *J. Food Compos. Analysis.* 26: 81-88.
- Connorton, J. M., and J. Balk. 2019. Iron biofortification of staple crops: Lessons and challenges in plant genetics. *Plant Cell Physiol.* 60: 1447-1456.
- Di Gioia, F., S. A. Petropoulos, M. Ozores-Hampton, K. Morgan, and E. R. Roskopf. 2019. Zinc and iron agronomic biofortification of *Brassicaceae* microgreens. *Agronomy.* 9: 677.
- Espinosa-Moreno J., D. Centurión-Didalco, M. L. Solano, y L. M. Lagues-Gálvez. 2013. Las leguminosas de grano. *In*: Velázquez Martínez, J. R., E. López-Hernández, y P. García-Alamilla. (coords.) *Desarrollo Científico y Tecnológico de los Recursos Alimentarios en el estado de Tabasco*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tabasco, México. pp: 183-190.
- Guillén-Molina M., C. Márquez-Quiroz, E. de la Cruz-Lázaro, J. R. Velázquez-Martínez, J. Soto, C. M. García, y J. A. Orozco Vidal. 2016. Biofortificación de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) con hierro y zinc. *Rev. Mex. Cienc. Agríc. Pub. Esp.* 3427-3438.
- Gupta, D. K., L. B. Pena, M. C. Romero-Puertas, A. Hernandez, M. Inouhe, and L. M. Sandalio. 2017. NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. *Plant Cell and Environ.* 40: 509-526.
- Hussain, S., A. Umar, M. Amir, and M. Aon. 2020. Biofortification of cereals through foliar application of minerals. *In*: Benkeblia, N. (ed). *Vitamins and Minerals Biofortification of Edible Plants*. Wiley Blackwell. Croydon, UK. pp: 191-221.
- Islam, M. Z., B.-J. Park, H.-M. Kang, and Y.-T. Lee. 2020. Influence of selenium biofortification on the bioactive compounds and antioxidant activity of wheat microgreen extract. *Food Chem.* 309: 1257-63.

CONCLUSIONS

The addition of combinations of medium doses of ferrous sulfate with medium and low doses of zinc sulfate increased grain yield by up to 50%. The contents of iron, zinc, total phenols and antioxidant activity also increased, compared to the control treatment. Biofortification with ferrous sulfate in combination with zinc sulfate is a clear alternative to increase yield, mineral content and antioxidant activity in cowpea bean.

—End of the English version—



- Manzeke, M. G., F. Mtambanengwe, H. Nezomba, M. J. Watts, M. R. Broadley, and P. Mapfumo. 2017. Zinc fertilization increases productivity and grain nutritional quality of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under integrated soil fertility management. *Field Crops Res.* 213: 231-244.
- Márquez-Quiroz, C., E. de-la-Cruz-Lázaro, R. Osorio-Osorio, and E. Sánchez-Chávez. 2015. Biofortification of cowpea beans with iron: iron's influence on mineral content and yield. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15: 839-847.
- Muranaka, S., M. Shono, T. Myoda, J. Takeuchi, J. Franco, Y. Nakazawa, O. Boukar, and H. Takagi. 2016. Genetic diversity of physical, nutritional and functional properties of cowpea grain and relationships among the traits. *Plant Gen. Res.* 14: 67-76.
- Pająk, P., R. Socha, D. Galkowska, J. Roznowski, and T. Fortuna. 2014. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chem.* 143: 300-306.
- Poblaciones, M. J., and Z. Rengel. 2016. Soil and foliar zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): Grain accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Food Chem.* 212: 427 - 433.
- Poniedzialek, B., K. Perkowska, and P. Rzymiski. 2020. Food fortification. What's in it for the malnourished world? *In: Benkeblia, N. (ed). Vitamins and Minerals Biofortification of Edible Plants.* Wiley Blackwell. Croydon, UK. pp: 27-44.
- Prasad, R., and Y. S. Shivay. 2020. Fertilizers, Grain Quality, and Nutrition-Related Human Ailments: An Overview. <https://doi.org/10.1007/s40011-018-1056-z>
- SAS Institute, Inc. 2013. Base SAS(R) 9.4. Procedures Guide: Statistical Procedures. 2nd. Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 556 p.
- Sida-Arreola, J. P., E. Sánchez-Chávez, D. D. Ávila-Quezada, P. B. Zamudio-Flores, and M. C. H. Acosta. 2015. Iron biofortification and its impact on antioxidant system, yield and biomass in common bean. *Plant Soil and Environ.* 61: 573-576.
- Sida-Arreola, J., E. Sánchez, D. Ojeda-Barrios, G. D. Ávila-Quezada, M. A. Flores-Córdova, C. Márquez-Quiroz, and P. Preciado-Rangel. 2017. Can biofortification of zinc improve the antioxidant capacity and nutritional quality of beans? *Emirates J. Food Agric.* 29: 237.
- White, P. J., J. A. Thompson, G. Wright, and S. K. Rasmussen. 2017. Biofortifying Scottish potatoes with zinc. *Plant and Soil.* 411: 151-165.
- WHO (World Health Organization) 2020. Malnutrition. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition> (Consulta: octubre 2020).
- Zia-Ul-Haq, M., S. Ahmad, R. Amarowicz, and V. de Feo. 2013. Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars commonly consumed in Pakistan. *Molecules.* 18: 2005-2017.