

Agrociencia

Volumen 56, Número 6

16 de agosto - 30 de septiembre, 2022



Dra. Emma Zavaleta Mejía



DIRECTORIO

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Said Infante Gil

DIRECTOR ADJUNTO DE AGROCIENCIA

Fernando Carlos Gómez Merino

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

Fernando Carlos Gómez Merino

Ana Rita Román Jiménez

FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN

L. Brenda Espejel Lagunas

TRADUCTORES

Inés Enriquez

Joel Castillo González

COSECHADOR DE METADATOS

Moises Quintana Arévalo

PLATAFORMA

Ana Luisa Mejía Sandoval

L. Brenda Espejel Lagunas

APOYO

Belem M. Villegas Contreras

Yolanda Feroso Meraz

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, **Volumen 56, Número 6, 16 de agosto - 30 de septiembre, 2022**, 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: 1405-3195. eISSN: 2521-9766, 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, **28 de octubre del 2022**.

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

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

Teléfono: 595 92 84427

<https://agrociencia-colpos.org>  
~~~~~

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: Dra. Emma Zavaleta Mejía



AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

CONTENTS ❖ CONTENIDO

Volumen 56

16 de agosto - 30 de septiembre, 2022

Número 6

Animal Science ⇌ Ciencia Pecuaria

FORAGE YIELD AND COMPOSITION OF BLACK OAT IN MONOCULTURE AND IN ASSOCIATION WITH WINTER VETCH ⇌ RENDIMIENTO Y COMPOSICIÓN DEL FORRAJE DE AVENA NEGRA EN MONOCULTIVO Y EN ASOCIACIÓN CON VEZA DE INVIERNO
Ricardo Daniel **Améndola-Massiotti**, Juan Daniel **Jiménez-Rosales**, Edmundo **García-Moya**, Juan Andrés **Burgueño-Ferreira**, Rodolfo **Ramírez-Valverde**, Luis Alberto **Miranda-Romero** 1044

EFFECT OF *Lemna gibba* AND *Ulva lactuca* ON HEALTH AND PRODUCTIVE PERFORMANCE IN JUVENILES OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) ⇌ EFECTO DE *Lemna gibba* Y *Ulva lactuca* SOBRE LA SALUD Y DESEMPEÑO PRODUCTIVO EN JUVENILES DE TILAPIA DEL NILO (*Oreochromis niloticus*)
Cinthya Magaly **Antonio-Cisneros**, César Mateo **Flores-Ortíz**, Martha Elena **Aguilera-Morales** 1077

DEEP LITTER PIG PRODUCTION SYSTEM AS A SUSTAINABLE ALTERNATIVE FOR SMALL FARMERS ⇌ SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CERDOS EN CAMA PROFUNDA COMO ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA PEQUEÑOS PRODUCTORES
Miguel Ángel **Solís-Tejeda**, Fabiola **Lango-Reynoso**, Pablo **Díaz-Rivera**, Jorge **Aguilar-Ávila**, Alberto **Asiain-Hoyos**, Ponciano **Pérez-Hernández** 1104

Biotechnology ⇌ Biotecnología

MICROPROPAGATION OF AGAVE (*Agave potatorum* Zucc.) THROUGH DIRECT ORGANOGENESIS ⇌ MICROPROPAGACIÓN DE AGAVE (*Agave potatorum* Zucc.) MEDIANTE ORGANOGENESIS DIRECTA
Marco Antonio **Ramírez-Mosqueda**, Rocío Guadalupe **Cárcamo-Corona**, Daniel **Aguilar-Jiménez**, Jericó **Jabín Bello-Bello** 1133

Food Science ⇌ Ciencia de los Alimentos

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF LEAFY GREEN VEGETABLES GROWN IN THE TOLUCA VALLEY ⇌ CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE HORTALIZAS DE HOJA VERDE CULTIVADAS EN EL VALLE DE TOLUCA
Rosa Laura **Ocaña-de Jesús**, Itzel **Rojas-Puebla**, Ana Tarín **Gutiérrez-Ibáñez**, Jesús Ricardo **Sánchez-Pale**, Pedro Antonio **García-Saucedo**, Luz Raquel **Bernal-Martínez** 1155

Socioeconomics ⇌ Socioeconomía

CONSUMERS PERCEPTION AND BEHAVIOUR TOWARDS GEOGRAPHICAL INDICATION PRODUCTS: THE CASE OF TRADITIONAL PESTIL FROM GUMUSHANE, TURKEY ⇌ PERCEPCIÓN Y COMPORTAMIENTO DE LOS CONSUMIDORES HACIA LOS PRODUCTOS CON INDICACIÓN GEOGRÁFICA: EL CASO DEL PESTIL TRADICIONAL DE GUMUSHANE, TURQUÍA
Üyesi **Nilgün-Doğan**, Hakan **Adanacioğlu** 1176

Water-Soil-Climate ⇌ Agua-Suelo-Clima

EFFECT OF SEED PRIMING AND FOLIAR APPLICATIONS OF P IN TOMATO SEEDLINGS ⇌ EFECTO DEL ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS Y APLICACIONES FOLIARES DE P EN PLÁNTULAS DE TOMATE
Perla Abigail **Cárdenas-Atayde**, Marcelino **Cabrera-de la Fuente**, Libia Iris **Trejo-Téllez**, Adalberto **Benavides-Mendoza**, Carlos Alberto **Garza-Alonso** 1200

FORAGE YIELD AND COMPOSITION OF BLACK OAT IN MONOCULTURE AND IN ASSOCIATION WITH WINTER VETCH

Ricardo Daniel Améndola-Massiotti¹, Juan Daniel Jiménez-Rosales^{1*}, Edmundo García-Moya², Juan Andrés Burgueño-Ferreira³, Rodolfo Ramírez-Valverde¹, Luis Alberto Miranda-Romero¹

¹ Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Zootecnia Postgrado en Producción Animal. Carretera Federal México- Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

² Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Postgrado en Botánica. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

³ Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Carretera México-Veracruz km 45, El Batán, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56237.

* Author for correspondence: jdanieljimenezr@hotmail.com

ABSTRACT

Associated grass-legume pastures have advantages over grass monoculture; in order to evaluate them the association of black oat (*Avena strigosa* Schreb) with winter vetch (*Vicia villosa* Roth) was analysed. The objective of the study was to evaluate forage yield, the botanical, morphological, and chemical composition of black oat in monoculture and in association with winter vetch, at different crop heights and residual stubble heights. Eighteen treatments were evaluated in randomized complete blocks with divided plots. In large plots, the culture type (monoculture or association); and in small plots, nine harvest management options (combinations) of three crop heights (Ch: 40, 50 and 60 cm) and three residual stubble heights (Rsh: 8, 14 and 20 cm). Forage yield was higher ($p \leq 0.05$) in Ch50-Rsh8, Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh14 during the second crop cycle, with an average 8555 kg DM ha⁻¹. In monoculture and in association, more cuts were made (three to four) with Ch40-Rsh14 and Ch40-Rsh20 and fewer cuts (one to two) with Ch60-Rsh8, Ch60-Rsh14 and Ch60-Rsh20. Crude protein concentration was 19 % higher ($p \leq 0.05$) in monoculture than in association (19.2 and 16.2 %); the highest concentrations ($p \leq 0.05$) of crude protein were obtained in Ch40-Rsh8, Ch40-Rsh14 and Ch40-Rsh20 (average 20.5 %), and the lowest was recorded in Ch60-Rsh8 (13.2 %). The forage with the least neutral detergent fibre ($p \leq 0.05$) was harvested in Ch40-Rsh8, Ch40-Rsh14 and Ch50-Rsh14 (average 43.4 %), and the highest (49.3 %) was obtained in Ch60-Rsh20. In monoculture and in association, a greater amount of forage was harvested, distributed in at least two harvests, with Ch of 50 and 60 cm in combination with 8 and 14 cm of Rsh. However, the forage did not have the best composition, due to higher concentrations of neutral detergent fibre and lower crude protein concentration.

Keywords: *Avena strigosa*, *Vicia villosa*, forage height, harvest intensity.

INTRODUCTION

Associated grass-legume pastures have advantages over grass monoculture, including higher forage yield and protein content (Luscher *et al.*, 2014), as in the association of

Citation: Améndola-Massiotti RD, Jiménez-Rosales JD, García-Moya E, Burgueño-Ferreira JA, Ramírez-Valverde R, Miranda-Romero LA. 2022. Forage yield and composition of black oat in monoculture and in association with winter vetch.

Agrociencia. 56(6): 1044-1076. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2405>

Editor in Chief:

Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: July 13, 2021.

Approved: August 25, 2022.

Published in Agrociencia:

October 05, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



common oats (*Avena sativa* L.) with common vetch (*Vicia sativa* L.) (Erol *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2016). The advantages of associations are evident with 30 to 50 % legume in the botanical composition (Luscher *et al.*, 2014).

Forage production and quality in the associations is also determined by the timing of plant harvest. As oat growth progresses, when plants reach reproductive stages, there is higher dry matter (DM) yield but with lower crude protein (CP) concentration (Espitia *et al.*, 2012; Ramírez-Ordóñez *et al.*, 2013). In most research on cereals in monoculture and their associations with *Veza* spp. the evaluation of forage yield has focused on a single harvest at the grain filling stage (Ramírez-Ordóñez *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2016). The reason for a single harvest is due to the increased risk of decapitation of the apical meristem due to the elongation of the grass stems at this phenological stage, which affects regrowth and persistence (Gastal and Lemaire, 2015).

Quiroz-Pérez *et al.* (2016) showed the productive potential of the association of black oat (*Avena strigosa* Schreb) with *Vicia* spp. Black oat or bristle oat stands out for its forage potential (Salgado *et al.*, 2013), moreover, when harvested in vegetative stage and at moderate cutting intensities, high quality forage distributed over several harvests can be obtained (Guzatti *et al.*, 2015). In Mexico, the cv. Saia is the one recommended (Sánchez *et al.*, 2014).

The evaluation of yield and forage quality of black oat, along with its association with common vetch at growth stages, affects nutritional composition of the forage. Thus, it was hypothesized that both from black oat monoculture, and in its association with winter vetch (*Vicia villosa* Roth), high forage yields with better composition distributed over more than one cut can be obtained when harvests are carried out on young plants with moderate cutting intensities. The objective of the study was to evaluate forage yield, the botanical, morphological and chemical composition of black oat in monoculture and in association with winter vetch, at different crop heights and residual stubble heights.

MATERIALS AND METHODS

Location and weather conditions

The research was conducted at the Grazing Module of the Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Mexico (19° 29' N, 98° 54' W, altitude 2240 m) in two crop cycles; the first one from October 2017 to March 2018 and the second one from October 2018 to March 2019. A soil analysis was performed in the experimental area before the study, which resulted in a clay loam texture with pH 7.5; bulk density, 1.04 g cm⁻³; organic matter, 2.64 %, low in phosphorus (14.1 mg kg⁻¹) and inorganic nitrogen (35.6 mg kg⁻¹). The climate is sub-humid temperate, with summer rains. At the Chapingo meteorological station in the State of Mexico, the average monthly temperature during the first cycle ranged between 11 and 15 °C, and in the second cycle, between 13 and 17 °C. Accumulated precipitation was similar in the two cycles (102 and 110 mm), with no precipitation in December. In November of the second cycle, 12 times more precipitation was recorded than in the first cycle (Figure 1).

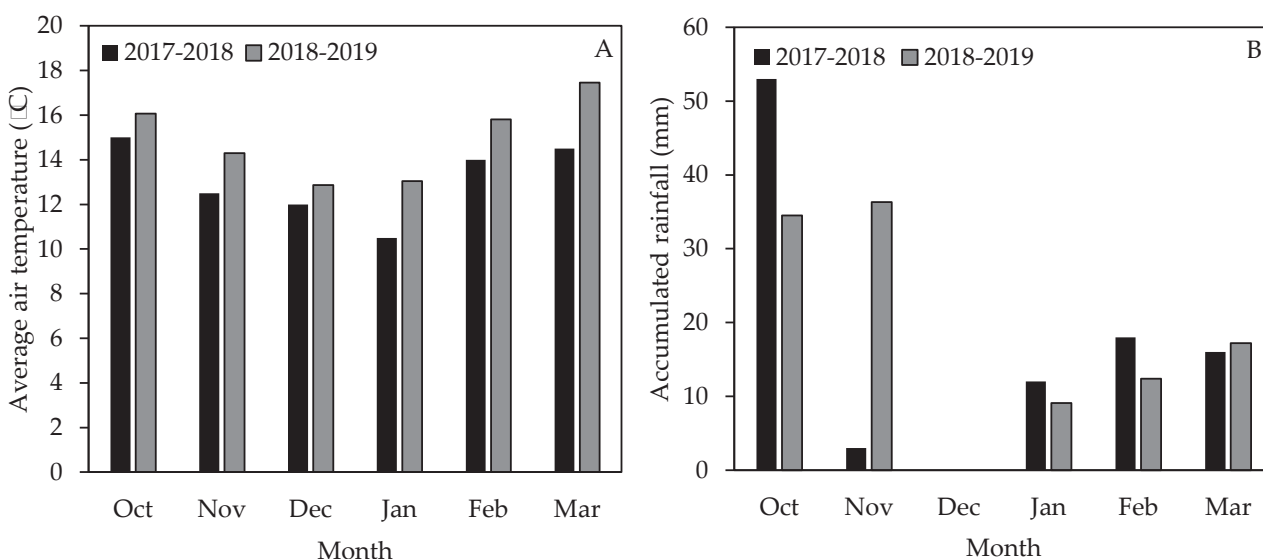


Figure 1. A: monthly average temperature and B: accumulated precipitation during the experimental cycles.

Experimental design and treatments

In a randomized block design with four replications, 18 treatments were evaluated in divided plots. In the large plots, the type of crop was evaluated with two levels, black oat in monoculture and its association with winter vetch. In the small plots, nine harvest management options were evaluated (Table 1) resulting from the combination of three crop heights (Ch, 40, 50 and 60 cm) and three residual stubble heights (Rsh, 8, 14 and 20 cm). The experimental units were 72 plots of 12 m² each and 0.5 m wide alleys between plots.

Table 1. Harvest management options evaluated in black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia in monoculture and in association with winter vetch (*Vicia villosa* Roth).

Harvest management options	Ch [†] (cm)	Rsh [‡] (cm)
Ch40-Rsh8	40	8
Ch40-Rsh14	40	14
Ch40-Rsh20	40	20
Ch50-Rsh8	50	8
Ch50-Rsh14	50	14
Ch50-Rsh20	50	20
Ch60-Rsh8	60	8
Ch60-Rsh14	60	14
Ch60-Rsh20	60	20

[†]Ch: crop height; [‡]Rsh: residual stubble height.

Experiment procedures

Sowing date was October 18, 2017 for the first cycle and October 13, 2018 for the second cycle. Seed was sown by hand (on the fly), as well as 130 kg of pure germinal oat seed per hectare in the monoculture; and 100 kg ha⁻¹ of black oat seed plus 30 kg ha⁻¹ of vetch seed, in the association. At sowing, crop was fertilized with 18 kg N ha⁻¹ and 46 kg P₂O₅ ha⁻¹, and 30 kg N ha⁻¹ were applied during the tiller stage (an average of three tillers per plant); in addition, 60 kg N ha⁻¹ were applied in the monoculture, at first irrigation after each cutting. Every 14 d, on average, sprinkler irrigation was applied (62 mm per irrigation); 13 irrigations were supplied in the first cycle and 11 irrigations in the second cycle.

Crop height records consisted of 15 measurements per plot, using a modified stick with measuring tape. Crop monitoring was done every week, when the average value was close to the defined crop height for each harvest management, records were taken every two days. The average crop heights recorded in the oat monoculture were 41±3, 48±3 and 59±2 cm in the first cycle, and 50±5, 51±4 and 53±8 cm in the second cycle. Whereas, in the association they were 41±3, 50±1 and 60±0 cm in the first cycle, and 40±3, 49±5 and 53±8 cm in the second cycle.

Evaluated variables

The evaluated variables were forage yield (FY, kg DM ha⁻¹), CP concentration (%), neutral detergent fibre (NDF, %), acid detergent fibre (ADF, %), botanical composition of the forage and the morphological composition of the monoculture. The FY was evaluated from the mass of forage harvested with scissors within each plot, at the crop height of each harvest management option, in three fixed sampling units of 0.32 m² (0.8 × 0.4 m). The fresh weight of the harvested mass was then recorded. For the determination of DM, an approximate composite sample of 400 g of the forage mass was taken and dried in an oven with forced air circulation at 55 °C, up to constant weight. The FY was evaluated from the sum of the DM yield harvested in each cut of each harvest management option. After cutting the forage samples, in order to maintain the residual stubble heights defined in each harvest management, the total of the remaining forage in each plot was cut with a mower (Model UT44110, Homelite®, USA).

Botanical and morphological compositions were quantified from a subsample composed of 400 g of the forage mass cut in each experimental unit. Black oat, vetch (in association), weeds and dead material were separated manually. The morphological components of oat (leaf blade and pseudostem+stem) were also separated manually and each component was dried until constant weight in a forced-air oven at 100 °C. In the end, the proportion of each component was estimated on a dry weight basis.

Forage chemical composition was evaluated only in the first cycle. For this, the same forage mass samples that were dried (at 55 °C) for DM determination were used and ground in mill (Thomas Model 4, Wiley®, USA), with 1 mm mesh. To estimate CP

concentration (N concentration \times 6.25), N determinations were made with the Kjeldahl method (Alencar *et al.*, 2019). NDF and ADF evaluations were carried out sequentially (Ferreira and Mertens, 2007) with the use of filter bags with porosity of 25 mm (Model F57, Ankom[®], USA) in a fibre analyser (Model A200, Ankom[®], USA).

Statistical analysis

The evaluated variables were subjected to analysis of variance in SAS[®]. The model for FY was:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + C_j + T_k + E_{ijk} + G_l + BT_{ik} + TG_{kl} + CT_{jk} + CG_{jl} + CTG_{jkl} + e_{ijkl}$$

where, Y_{ijkl} is the dependent variable; μ , the effect of the general mean; B_i , the block effect; C_j the effect of crop cycle; T_k the effect of crop type; E_{ijk} the effect of experimental error on larger plot (error a); G_l the effect of harvest management; BT_{ik} the effect of the interaction between block and crop type; TG_{kl} the effect of the interaction between crop type and harvest management option; CT_{jk} the effect of the interaction between crop cycle and crop type; CG_{jl} the effect of the interaction between crop cycle and harvest management option; CTG_{jkl} the effect of the triple interaction between crop cycle, crop type and harvest management option; e_{ijkl} the effect of the experimental error on smaller plot (error b).

The model for botanical and morphological components was:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + C_j + G_k + CG_{jk} + E_{ijk}$$

where, Y_{ijk} is the dependent variable; μ , the effect of the general mean; B_i , the block effect; C_j the effect of crop cycle; G_k the effect of harvest management; CG_{jk} the effect of the interaction between crop cycle and harvest management; E_{ijk} the effect of experimental error.

The model for CP, NDF and ADF was:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + BT_{ij} + E_{ij} + G_k + TG_{jk} + e_{ijk}$$

where, Y_{ijk} is the dependent variable; μ , the effect of the general mean; B_i , the block effect; T_j the effect of crop type; BT_{ij} the effect of the interaction between block and crop type; E_{ij} the effect of experimental error in larger plot (error a); G_k the effect of harvest management; TG_{jk} the effect of the interaction between crop type and harvest management; e_{ijk} the effect of experimental error in smaller plot (error b). Means were compared with the test of Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Dates and number of cuts in crops

The number of cuts in the monoculture and in the association varied with every harvest management option (Table 2). Regardless of the type of culture, in Ch40-Rsh14 and Ch40-Rsh20 a higher number of cuts was achieved (three to four), and in Ch60-Rsh8, Ch60-Rsh14 and Ch60-Rsh20 fewer cuts were recorded (one to two). Independently of crop height in the harvest management options, the intervals between cuts in both

Table 2. Cutting dates of black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia in monoculture and in association with winter vetch (*Vicia villosa* Roth) at different harvesting managements, in two crop cycles.

Harvest management options	Ch [†] 40 Rsh [‡] 8	Ch40 Rsh14	Ch40 Rsh20	Ch50 Rsh8	Ch50 Rsh14	Ch50 Rsh20	Ch60 Rsh8	Ch60 Rsh14	Ch60 Rsh20
Monoculture in the first crop cycle (2017-2018)									
Cut									
1	Jan 5	Jan 5	Jan 5	Jan 17	Jan 17	Jan 17	Feb 11	Feb 11	Feb 11
2	Feb 22	Feb 15	Feb 11	Feb 27	Feb 22	Feb 17			Mar 14
3		Mar 7	Feb 27			Mar 14			
4			Mar 17						
das-1 [§]	79	79	79	91	91	91	116	116	116
dbc ^b	48	31	24	41	36	28	-	-	31
Monoculture in the second crop cycle (2018-2019)									
Cut									
1	Dec 14	Dec 14	Dec 14	Dec 26	Dec 26	Dec 26	Jan 15	Jan 15	Jan 15
2	Feb 5	Jan 29	Jan 22	Feb 19	Feb 16	Feb 13	Mar 02	Mar 02	Feb 25
3	Mar 4	Feb 25	Feb 13	Mar 4					
das-1 [§]	62	62	62	74	74	74	94	94	94
dbc ^b	40	37	27	55	52	49	46	46	41
Associated crop in the first crop cycle (2017-2018)									
Cut									
1	Jan 17	Jan 17	Jan 17	Feb 14	Feb 14	Feb 14	Feb 20	Feb 20	Feb 20
2	Feb 27	Feb 20	Feb 17		Mar 13	Mar 7			
3		Mar 13	Mar 7						
das-1 [§]	91	91	91	119	119	119	125	125	125
dbc ^b	41	28	25	-	27	21	-	-	-
Associated crop in the second crop cycle (2018-2019)									
Cut									
1	Dec 14	Dec 14	Dec 14	Dec 26	Dec 26	Dec 26	Jan 15	Jan 15	Jan 15
2	Feb 15	Feb 5	Jan 22	Mar 2	Feb 16	Feb 13	Mar 4	Mar 4	Feb 25
3		Feb 28	Feb 13	Mar 4					
das-1 [§]	62	62	62	74	74	74	94	94	94
dbc ^b	63	38	27	66	52	49	48	48	41

[†]Ch: crop height (40, 50 and 60 cm); [‡]Rsh: residual stubble height (8, 14 and 20 cm); [§]das-1: days after sowing to first cut; ^bdbc: days between cuts.

crops were longer with high harvesting intensity (less residual forage, Ch40-Rsh8, Ch50-Rsh8 and Ch60-Rsh8) and shorter with low intensity (more residual forage, Ch40-Rsh20, Ch50-Rsh20 and Ch60-Rsh20).

The increase in the interval between cuts in both crops at higher harvest intensity (less residual forage) is a response that has been observed in grasses. Hamilton *et al.* reported greater interval between cuts when harvesting perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) at higher harvest intensity (2.5 and 5 cm Rsh) than at lower (12.5 and 15 cm Rsh). This response is related to the slow regrowth of the plants, due to the smaller residual leaf area that remains after intense forage harvest. On the contrary, with low harvesting intensities, the interval between cuts is reduced, due to the rapid growth of the forage originated by the greater residual leaf area in the sprouts that favour photosynthesis (Martins *et al.*, 2021).

In the first crop cycle, the crop height goals at the first cut were reached earlier in the monoculture than in the association; but in the second cycle, the first cut was made on the same date in both crop types. The lower growth of the association compared to monoculture is explained by interspecific competition, which has already been documented in associations of cereals with vetch; as lower growth rates have been observed in associations than in monocultures (Lithourgidis *et al.*, 2006).

Forage yield

In the FY, an effect of the crop cycle × crop type × harvest management options interaction was detected ($p \leq 0.001$). However, based on sums of squares, 61 % of the variation was attributed to the crop cycle × harvest management options interaction (38 %, $p \leq 0.05$), and to the effects of crop cycle (18 %, $p \leq 0.05$) and crop type (11 %, $p \leq 0.05$) and 14 % to the triple interaction. The highest FYs were obtained in the harvesting managements of Ch50-Rsh8, Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh14 in the second cycle (average 8555 kg DM ha⁻¹). The lowest FYs resulted in Ch50-Rsh8, Ch50-Rsh14, Ch50-Rsh20, Ch60-Rsh8, Ch60-Rsh14 and Ch60-Rsh20 of the first cycle, and with Ch40-Rsh20 and Ch50-Rsh20 of the second cycle (average 5348 kg DM ha⁻¹, Table 3). The FY was 22 % higher ($p \leq 0.05$) in the second cycle than in the first (6866 *vs.* 5632 kg DM ha⁻¹), and 17 % higher ($p \leq 0.05$) in the monoculture than in the association (6743 *vs.* 5754 kg DM ha⁻¹, Figure 2).

The higher FY obtained in Ch50-Rsh8, Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh14 of the second cycle are attributed to the fact that forage was harvested at higher Ch and harvest intensities (lower Rsh) and to the better environmental conditions that were present in the second cycle. There is evidence that FY is higher when harvested at higher heights (Espitia *et al.*, 2012) and high intensities (Brink *et al.*, 2013; Hamilton *et al.*, 2013). In the second cycle, mean monthly temperatures were higher and precipitation one month after sowing (November) was also higher than in the first cycle (Figure 1). This led to the rapid growth and establishment of the crops, and as a result, one more cut was obtained with the harvesting management options (Ch50-Rsh8, Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh14) in the second cycle (Table 2). During the second cycle, even

Table 3. Forage yield of black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia in monoculture and in association with winter vetch (*Vicia villosa* Roth) at different harvesting management options, in two crop cycles.

Harvest management options	Crop cycle	kg DM ha ⁻¹
Ch [†] 40-Rsh [‡] 8	First	5861 cdef
	Second	5882 cdef
Ch40-Rsh14	First	6231 cde
	Second	6072 cdef
Ch40-Rsh20	First	6154 cdef
	Second	5491 def
Ch50-Rsh8	First	5717 def
	Second	7984 ab
Ch50-Rsh14	First	5589 def
	Second	6695 bcd
Ch50-Rsh20	First	5574 def
	Second	4854 f
Ch60-Rsh8	First	5485 def
	Second	8879 a
Ch60-Rsh14	First	4827 f
	Second	8803 a
Ch60-Rsh20	First	5245 ef
	Second	7133 bc
	SEM [§]	269
	<i>p</i> ^b	0.0001

[†]Ch: crop height (40, 50 and 60 cm); [‡]Rsh: residual stubble height (8, 14 and 20 cm); [§]SEM: standard error of the mean; ^b*p*: probability of difference; ^aMeans with different letters indicate statistical difference (Tukey, *p* ≤ 0.05).

the first cuts in all harvest management options were made on average 19 d earlier in the monoculture and 35 d earlier in the association than during the first cycle (Table 2). As documented in other research conducted in associated crops (Puzynska *et al.*, 2021) and monocultures (Solomon *et al.*, 2017), it is evident that climatic variations (in temperature and precipitation) between evaluation years affect FY.

The productive advantage of the monoculture versus the association is explained by the fact that in the monoculture there were four more cuts in the first cycle and one more cut in the second cycle than in the association. In this regard, there is evidence that grass forage associated with vetch grows more slowly than when it is grown in monoculture, due to inter-species competition (Lithourgidis *et al.*, 2006). As a result, during the first experiment, crop height goals at first cut in the monoculture were reached on average 16 d earlier than in the association (Table 2). Furthermore, in this study, it is likely that the application of N in the monoculture (60 kg N ha⁻¹ harvest⁻¹) had a greater impact on the FY than in the association.

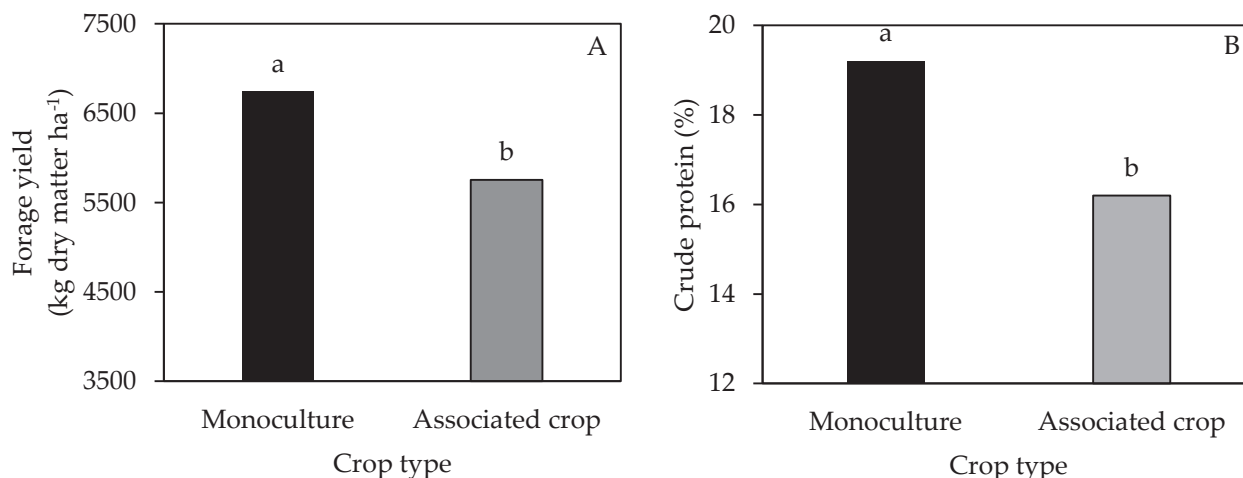


Figure 2. A: forage yield and B: crude protein concentration of black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia in monoculture and in association with winter vetch (*Vicia villosa* Roth). Columns with different letters are different (Tukey, $p \leq 0.05$).

Black oat in monoculture was more productive than their association with winter vetch, which is consistent with other studies (Lithourgidis *et al.*, 2006; Tuna and Orak *et al.*, 2007), which evaluated the monoculture of common oats and their association with common vetch. On the contrary, Flores *et al.* (2016) mentioned higher FY in the association of common oats with common vetch, but they made a single cut when the grass was in doughy grain and in this study the crop heights were reached in the vegetative stage of oat (the proportion of oat inflorescence was on average 0.6 and 0.7 %).

Botanical and morphological compositions

In monoculture, no effect of the crop cycle × harvest management interaction ($p > 0.05$) was detected on the proportions of oat, weeds, dead material, and oat morphological components (leaf blade, pseudostem+stem and inflorescence). However, there was effect ($p \leq 0.05$) of harvest management options on the proportions of oat, dead material (Table 4) and leaf blade and pseudostem+stem components (Figure 3) In monoculture, the highest proportion of oat resulted in Ch50-Rsh14 (97.7 %) and the lowest in Ch60-Rsh20 (82.9 %). In contrast, dead material content was higher in the harvesting managements with higher crop height Ch60-Rsh8, Ch60-Rsh14 and Ch60-Rsh20 (average 8.7 %), and was lower in Ch40-Rsh8, Ch40-Rsh14, Ch40-Rsh20, Ch50-Rsh8, Ch50-Rsh14 and Ch50-Rsh20 (average 0.5 %, Table 4). The proportion of weeds was similar ($p > 0.05$) in all harvest management options (average 5.3 %).

In monoculture, the highest proportions of oat leaf blade resulted in the Ch40-Rsh14 and Ch40-Rsh20 harvest management options (average 71.5 %), and the lowest in

Table 4. Botanical composition of black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia to different harvest management options, in two crop cycles.

Harvest management options	Black oat	Weeds	Dead material
Ch ⁴⁰ -Rsh ⁸	94.0 ab	6.0	0.0 b
Ch40-Rsh14	89.7 ab	9.6	0.7 b
Ch40-Rsh20	95.2 ab	3.4	1.4 b
Ch50-Rsh8	93.4 ab	6.1	0.5 b
Ch50-Rsh14	97.7a	2.1	0.2 b
Ch50-Rsh20	94.1 ab	5.9	0.0 b
Ch60-Rsh8	88.3 ab	1.0	10.7a
Ch60-Rsh14	88.2 ab	5.2	6.6 ab
Ch60-Rsh20	82.9 b	8.4	8.7a
SEM [§]	2.8	2.3	1.6
<i>p</i> ^p	0.007	0.101	0.001
Crop cycle			
First	87.2 b	11.6a	1.2 b
Second	96.3a	0.0 b	3.7a
SEM	1.3	1.1	0.8
<i>p</i>	0.001	0.001	0.025

[†]Ch: crop height (40, 50 and 60 cm); [‡]Rsh: residual stubble height (8, 14 and 20 cm); [§]SEM: standard error of the mean; ^p*p*: probability of difference; [¶] Means with different letters between rows indicate statistical difference (Tukey, *p* ≤ 0.05).

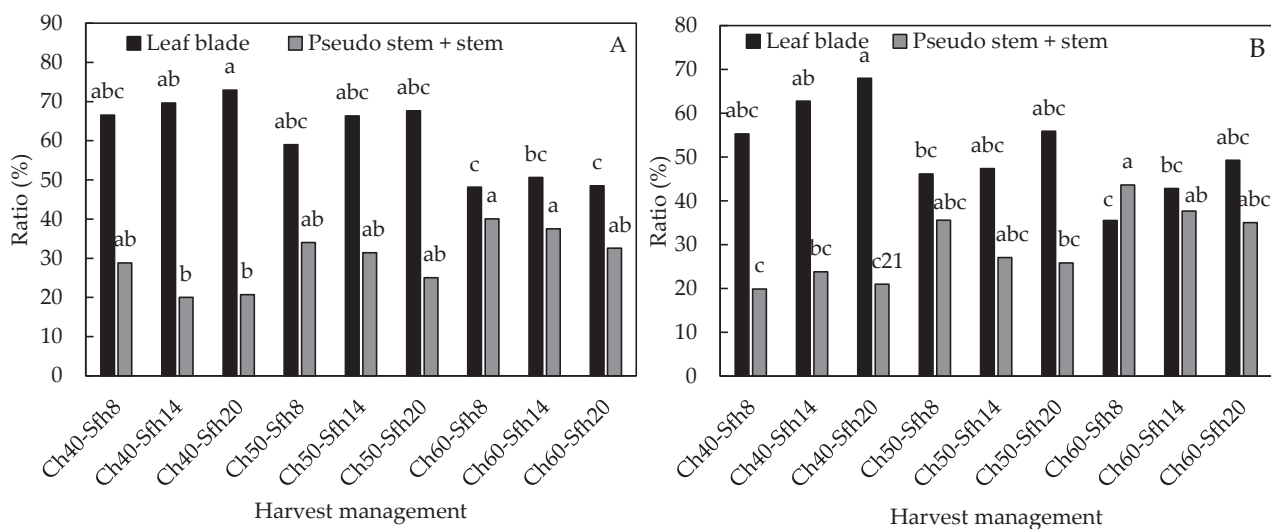


Figure 3. Leaf blade and pseudostem+stem of black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia in A: monoculture and B: in association with winter vetch (*Vicia villosa* Roth) with different harvest management options. Columns with different letters are different (Tukey, *p* ≤ 0.05).

Ch60-Rsh8, Ch60-Rsh14 and Ch60-Rsh20 (average 49 %). In contrast, the proportions of pseudostem+stem were lower in Ch40-Rsh14 and Ch40-Rsh20 (average 20.5 %), and higher in Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh14 (average 39 %, Figure 3).

The amount of inflorescence in the harvest management options was similar ($p > 0.05$), on average 0.7 %. Effect ($p \leq 0.05$) of crop cycle on the proportions of oat, weeds and dead material was detected (Table 4). Oat and dead material were 10 and 208 % higher in the second cycle than in the first. Weeds were only present in the first cycle, perhaps due to increased competition from oat in the second cycle.

In the association, an effect of the crop cycle \times harvest management options interaction ($p \leq 0.05$) was detected in the proportions of black oat, vetch, and dead material (Table 5). The highest percentages of black oat resulted in Ch40-Rsh14, Ch40-Rsh20, Ch50-Rsh8, Ch50-Rsh14 and Ch50-Rsh20 harvest management options (average 93.9 %), during the second cycle, and the lowest in Ch50-Rsh8, Ch50-Rsh14 and Ch50-Rsh20 from the first cycle (average 61.8 %). The highest proportions of vetch were obtained in Ch40-Rsh8 of the second cycle and Ch50-Rsh14 of the first cycle (average 17.2 %); the

Table 5. Botanical composition of black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia in association with winter vetch (*Vicia villosa* Roth) with different harvest management options, in two crop cycles.

Harvest management options	Crop cycle	Black oat	Vetch	Weeds	Dead material
Ch [†] 40-Rsh [‡] 8	First	73.6 bcd [¶]	7.9 ab	18.1	0.4 c
	Second	76.7 abcd	17.1a	1.1	5.1 abc
Ch40-Rsh14	First	81.1 abc	7.1 ab	11.0	0.8 c
	Second	93.0 ab	7.0 ab	0.0	0.0 c
Ch40-Rsh20	First	87.1 abc	4.0 b	8.6	0.3 c
	Second	91.7 ab	4.7 b	0.2	3.4 bc
Ch50-Rsh8	First	62.9 cd	10.3 ab	20.0	6.8 abc
	Second	91.1 ab	8.9 ab	0.0	0.0 c
Ch50-Rsh14	First	54.2 d	17.2a	25.2	3.4 bc
	Second	96.5a	3.5 b	0.0	0.0 c
Ch50-Rsh20	First	68.4 cd	10.2 ab	17.1	4.3 abc
	Second	97.2a	2.8 b	0.0	0.0 c
Ch60-Rsh8	First	74.6 abcd	7.9 ab	11.1	6.4 abc
	Second	83.4 abc	4.6 b	0.0	12.0 ab
Ch60-Rsh14	First	80.6 abcd	4.9 ab	10.1	4.3 abc
	Second	80.9 abc	5.2 ab	0.5	13.4a
Ch60-Rsh20	First	83.8 abc	1.8 b	8.1	6.3 abc
	Second	84.5 abcd	4.8 b	0.0	10.7 ab
	SEM [§]	4.8	2.5	3.8	2.2
	p^b	0.001	0.001	0.261	0.011

[†]Ch: crop height (40, 50 and 60 cm); [‡]Rsh: residual stubble height (8, 14 and 20 cm); [§]SEM: standard error of the mean; ^b p : probability of difference; [¶]Means with different letters between rows indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

lowest were in Ch40-Rsh20 and Ch60-Rsh20 of the first cycle and Ch40-Rsh20, Ch50-Rsh14, Ch50-Rsh20, Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh20 of the second cycle (average 3.7 %). The highest proportions of dead material were recorded in Ch60-Rsh8, Ch60-Rsh14 and Ch60-Rsh20 of the second cycle (average 12 %), and were null in Ch40-Rsh14, Ch50-Rsh8, Ch50-Rsh14 and Ch50-Rsh20 of the second cycle.

In the association, the highest oat leaf blade proportions resulted in the harvest managements of Ch40-Rsh14 and Ch40-Rsh20 (average 65 %), and the lowest in Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh14 (average 39 %). In contrast, the proportions of pseudostem+stem were lower in Ch40-Rsh8, Ch40-Rsh14, Ch40-Rsh20 and Ch50-Rsh20 (average 23 %), and higher in Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh14 (average 41 %, Figure 3). Oat inflorescence was similar ($p > 0.05$) across harvest management options (mean 0.6 %).

In both monoculture and association, an opposite relationship was detected between leaf blade ratios and pseudostem+stem with increasing crop height in harvest management options; a common relationship that has been observed in forage grasses (Aguinaga *et al.*, 2008; Guzatti *et al.*, 2015). The leaf blade ratio was higher at 40 cm crop height than at 60 cm, and the pseudostem+stem ratio was higher at 60 cm crop height than at 40 cm. These results are due to the fact that during the growth of grasses there is a modification in their canopy structure. During the vegetative state leaves grow (on stems that do not elongate) and then the state of stem elongation continues (Gastal and Lemaire, 2015; Lemaire and Belanger, 2020), which stops the development of new leaves, so the older leaves are shaded. This process increases senescence and the accumulation of dead material at the base of the canopy (Da Silva *et al.*, 2015). This explains why the amount of dead material was higher in the harvest management options with 60 cm of crop height.

In the association, although the proportions of black oat and vetch varied between harvest management options, the proportion of vetch was much lower than that of black oat; on average 81 % black oat and 7 % vetch were harvested. The low proportion of vetch in the association was attributed to the lower proportion of legume seed at planting density; 77 % of seed was black oat and 23 % was vetch. There is evidence that, in the oat-vetch association, the percentage of the legume in the forage harvested reflects the amount of legume seed at seeding density (Erol *et al.*, 2009).

Chemical composition

No effect of crop type \times harvest management options interaction ($p > 0.05$) was detected on the chemical composition of forage. The concentration of CP was 19 % higher ($p \leq 0.05$) in monoculture (19.2%) than in association (Figure 2); whereas those of NDF and ADF were similar ($p > 0.05$) between crop types, with averages of 45 and 24 %. The highest CP concentrations ($p \leq 0.05$) were obtained in the harvest management options with the lowest crop height (Ch40-Rsh8, Ch40-Rsh14 and Ch40-Rsh20, average 20.5 %) and the lowest (13.2 %) was recorded with Ch60-Rsh8 (Figure 4). Forage with the lowest NDF concentrations ($p \leq 0.05$) was harvested in Ch40-Rsh8, Ch40-Rsh14 and Ch50-Rsh14 (average 43.4 %), and in Ch60-Rsh20 the forage with the highest NDF

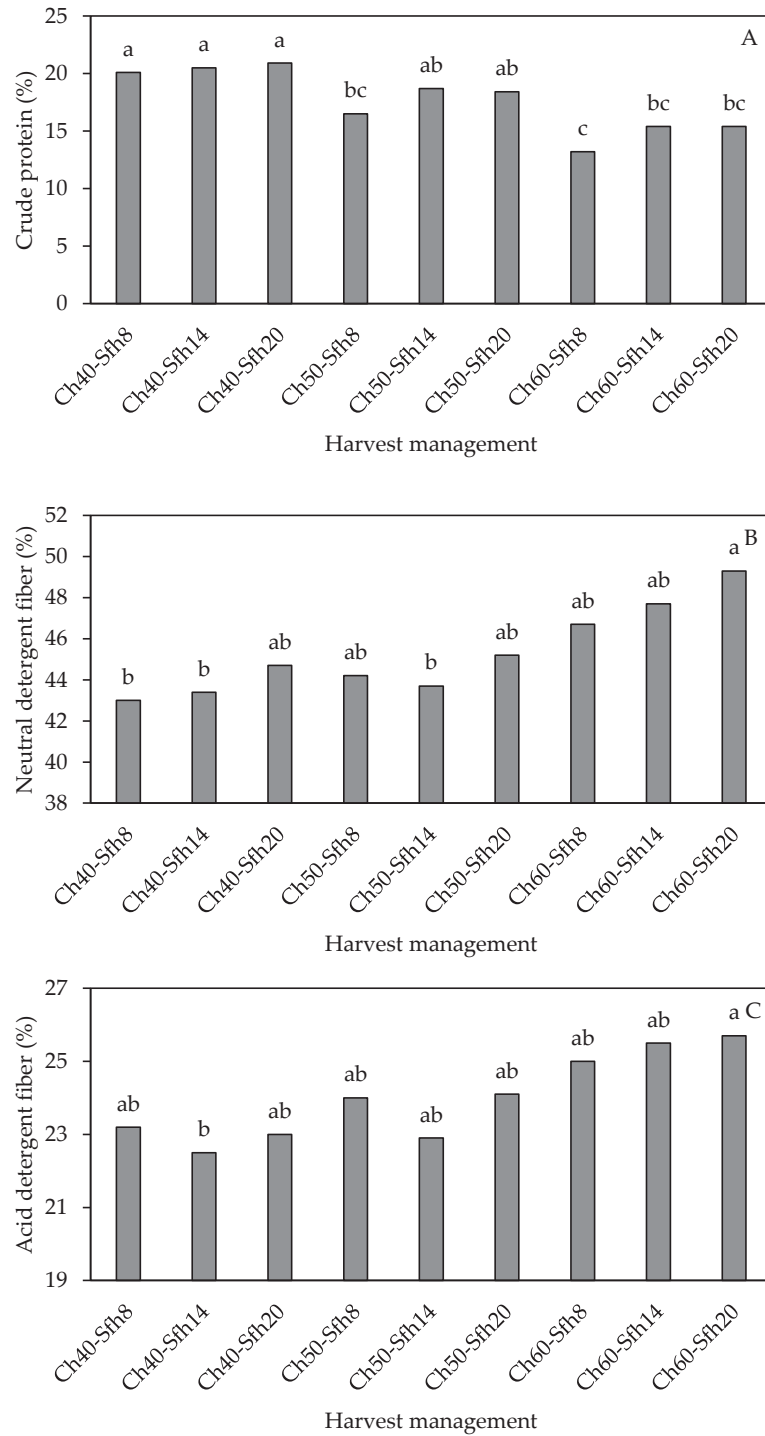


Figure 4. Concentrations of A: crude protein, B: neutral detergent fibre, and C: acid detergent fibre of black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia in monoculture and in association with winter vetch (*Vicia villosa* Roth) with different harvest management options. Columns with different letters in each subfigure are different (Tukey, $p \leq 0.05$).

concentration (49.3 %) was harvested. The concentration of NDF was lowest ($p \leq 0.05$) in Ch40-Rsh14 (22.5 %) and highest in Ch60-Rsh20 (25.7 %).

The lower CP concentration obtained in the grass-legume association of this study does not agree with that mentioned in other research (Lithourgidis *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2016). This difference is attributed to the effect of oat maturity stage at harvest on forage quality (Molla *et al.*, 2018). In this study, the cuts were made when the forage was in vegetative stage, while in studies that have obtained higher CP contribution in the association (Lithourgidis *et al.*, 2006, Flores *et al.*, 2016) the crop was harvested when the oat were in advanced stages of maturity (reproductive stage) with lower forage quality. Flores *et al.* (2016) obtained CP concentrations of 17.9, 12.5, 9.5, 9.5 and 9.8 % in the blister, milky grain, doughy grain, and mature grain stages; these results are lower than what was obtained in the oat monoculture (19.2 % CP, Figure 2) of this study.

Another reason for the lower CP concentration in the association than in the monoculture was the low proportion of vetch in the botanical composition of the association (1.8 to 17.2 %, Table 5). The CP contribution of mixed grasslands (grass-legume) versus pure grasses are evidently higher when the legume in the composition is in a ratio of 30 to 50 % (Luscher *et al.*, 2014). In this study, the vetch seed proportion (23 %) in the association seeding density was lower than that of black oat (77 %). There is evidence that the forage CP of the common oats-common vetch association increases as the percentage of legume at seeding, and within the harvested DM, increases (Erol *et al.*, 2009).

The decrease in CP concentration and increase in NDF and ADF concentrations obtained with advancing crop growth are common responses obtained in grasses (Castro-Hernandez *et al.*, 2017), legumes (Sulc *et al.*, 2020) and oat-vetch associations (Molla *et al.*, 2018). With the harvest management options in which a higher proportion of leaf blade was obtained (Ch40-Rsh14 and Ch40-Rsh20) forage was harvested with higher CP concentration and lower NDF and ADF concentrations. On the contrary, with the harvest management options in which the highest proportion of pseudostem+stem was obtained (Ch60-Rsh8 and Ch60-Rsh14), forage was harvested with lower CP concentration and high concentrations of NDF and ADF. This latter is explained by the best chemical composition (less NDF, ADF and more CP) that leaves have compared to stems (Branco *et al.*, 2012).

CONCLUSIONS

In black oat in monoculture and in association with winter vetch, more forage was harvested, distributed in at least two cuts, with crop heights of 50 and 60 cm in combination with higher intensity harvests (8 and 14 cm of residual forage). However, the forage harvested with such management options was not the best in composition, due to high proportions of stems, neutral detergent fibre and lower crude protein concentration.

ACKNOWLEDGMENTS

To the National Council of Science and Technology in Mexico (CONACYT) for the scholarship granted to Juan Daniel Jiménez-Rosales during his doctoral studies.

REFERENCES

- Aguinaga AAQ, Carvalho PCF, Anghinoni I, Pilau A, Aguinaga AJQ, Gianluppi GDF. 2008. Componentes morfológicos e produção de forragem de pastagem de aveia e azevém manejada em diferentes alturas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37 (9): 1523–1530. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008000900002>
- Alencar NM, Vendramini JMB, Dubeux Jr JCB, dos Santos AC, Sánchez JMD, da Silva HM, Silveira ML, Sousa LF, Neiva JNM. 2019. Impact of leaf and stem proportions on dry matter and crude protein *in situ* disappearance of rhizome peanut genotypes. *Crop Science* 59 (4): 1815–1821. <https://doi.org/10.2135/cropsci2019.02.0114>
- Branco AF, Viana KB, Castañeda RD, Prohmann PE, Coneglian SM, Mouro GF. 2012. Chemical composition and crude protein fractions of Coast cross grass under grazing on winter, spring and summer in Southern Brazil. *Acta Scientiarum Animal Science* 34 (2): 183–187. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v34i2.10895>
- Brink GE, Jackson RD, Alber NB. 2013. Residual sward height effects on growth and nutritive value of grazed temperate perennial grasses. *Crop Science* 53 (5): 2264–2274. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.01.0068>
- Castro-Hernández H, Domínguez-Vara IA, Morales-Almaráz E, Huerta-Bravo M. 2017. Composición química, contenido mineral y digestibilidad *in vitro* de raigrás (*Lolium perenne*) según intervalo de corte y época de crecimiento. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8 (2): 201–210. <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i2.4445>
- Da Silva SC, Sbrissia AF, Pereira LET. 2015. Ecophysiology of C₄ forage grasses—understanding plant growth for optimising their use and management. *Agriculture* 5 (3): 598–625. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030598>
- Erol A, Kaplan M, Kizilsimsek M. 2009. Oat (*Avena sativa*)-common vetch (*Vicia sativa*) mixtures grown on a low-input basis for a sustainable agriculture. *Tropical Grasslands* 43 (3): 191–196.
- Espitia Rangel E, Villaseñor Mir HE, Tovar Gómez R, de la O Olán M, Limón Ortega A. 2012. Momento óptimo de corte para rendimiento y calidad de variedades de avena forrajera. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (4): 771–783. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i4.1430>
- Ferreira G, Mertens DR. 2007. Measuring detergent fiber and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags. *Animal Feed Science and Technology* 133 (3–4): 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.04.010>
- Flores N MJ, Sánchez G RA, Echavarría C FG, Gutiérrez L R, Rosales N CA, Salinas G H. 2016. Producción y calidad de forraje en mezclas de veza común con cebada, avena y triticale en cuatro etapas fenológicas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 7 (3): 275–291. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v7n3/2448-6698-rmcp-7-03-00275-en.pdf> (Retrieved: June 2022).
- Gastal F, Lemaire G. 2015. Defoliation, shoot plasticity, sward structure and herbage utilization in pasture: review of the underlying ecophysiological processes. *Agriculture* 5 (4): 1146–1171. <https://doi.org/10.3390/agriculture5041146>
- Guzatti GC, Duchini PG, Sbrissia AF, Ribeiro-Filho HMN. 2015. Aspectos qualitativos e produção de biomassa em pastos de aveia e azevém cultivados puros ou consorciados e submetidos a pastejo leniente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 67 (5): 1399–1407. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8103>
- Hamilton SA, Kallenbach RL, Bishop-Hurley GJ, Roberts CA. 2013. Stubble height management changes the productivity of perennial ryegrass and tall fescue pastures. *Agronomy Journal* 105 (3): 557–562. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0293>
- Lemaire G, Belanger G. 2020. Allometries in plants as drivers of forage nutritive value: a review. *Agriculture* 10 (1): 5. <https://doi.org/10.3390/agriculture10010005>

- Lithourgidis AS, Vasilakoglou IB, Dhima KV, Dordas CA, Yiakoulaki MD. 2006. Forage yield and quality of common vetch mixtures with oat and triticale in two seeding ratios. *Field Crops Research* 99 (2–3): 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.03.008>
- Lüscher A, Mueller-Harvey I, Soussana JF, Rees RM, Peyraud JL. 2014. Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science* 69 (2): 206–228. <https://doi.org/10.1111/gfs.12124>
- Martins CDM, Schmitt D, Duchini PG, Miqueloto T, Sbrissia AF. 2021. Defoliation intensity and leaf area index recovery in defoliated swards: implications for forage accumulation. *Scientia Agricola* 78 (2). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0095>
- Molla EA, Wondimagegn BA, Chekol YM. 2018. Evaluation of biomass yield and nutritional quality of oat–vetch mixtures at different harvesting stage under residual moisture in Fogera District, Ethiopia. *Agriculture and Food Security* 7: 88. <https://doi.org/10.1186/s40066-018-0240-y>
- Puzynska K, Puzynski S, Synowiec A, Bocianowski J, Lepiarczyk A. 2021. Grain yield and total protein content of organically grown oat–vetch mixtures depending on soil type and oats’ cultivar. *Agriculture* 11 (1): 79. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010079>
- Quiroz-Pérez JC, Améndola-Massiotti RD, Zaragoza-Ramírez JL, Ortiz-Moreno O. 2016. Consumo aparente de forraje de *Avena strigosa* y *Vicia* spp. con riego, bajo pastoreo invernal en el centro de México (PP116. Producción y utilización de pasturas). *Revista Argentina de Producción Animal* 36 (Supl.1): 410. <https://www.aapa.org.ar/rapa/36/Vol36Supl1.pdf> (Retrieved: September 2022).
- Ramírez-Ordóñez S, Domínguez-Díaz D, Salmerón-Zamora JJ, Villalobos-Villalobos G, Ortega-Gutiérrez JA. 2013. Producción y calidad del forraje de variedades de avena en función del sistema de siembra y de la etapa de madurez al corte. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (4): 395–403. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/36-4/4r.pdf> (Retrieved: May 2022).
- Salgado P, Thang VQ, Thu TV, Trach NX, Cuong VC, Lecomte P, Richard D. 2013. Oats (*Avena strigosa*) as winter forage for dairy cows in Vietnam: an on-farm study. *Tropical Animal Health and Production* 45: 561–568. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0260-8>
- Sánchez Gutiérrez RA, Gutiérrez B H, Serna P A, Gutiérrez L R, Espinoza C A. 2014. Producción y calidad de forraje de variedades de avena en condiciones de temporal en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 5 (2): 131–142.
- Solomon JKQ, Macoon B, Lang DJ. 2017. Harvest management based on leaf stage of a tetraploid vs. a diploid cultivar of annual ryegrass. *Grass and Forage Science* 72 (4): 743–756. <https://doi.org/10.1111/gfs.12313>
- Sulc RM, Arnold AM, Cassida KA, Albrecht KA, Hall MH, Min D, Xu X, Undersander DJ, van Santen E. 2020. Changes in forage nutritive value of reduced-lignin alfalfa during regrowth. *Crop Science* 61 (2): 1478–1487. <https://doi.org/10.1002/csc2.20366>
- Tuna C, Orak A. 2007. The role of intercropping on yield potential of common vetch (*Vicia sativa* L.)/oat (*Avena sativa* L.) cultivated in pure stand and mixtures. *Journal of Agricultural and Biological Science* 2 (2): 14–19.

RENDIMIENTO Y COMPOSICIÓN DEL FORRAJE DE AVENA NEGRA EN MONOCULTIVO Y EN ASOCIACIÓN CON VEZA DE INVIERNO

Ricardo Daniel Améndola-Massiotti¹, Juan Daniel Jiménez-Rosales^{1*}, Edmundo García-Moya², Juan Andrés Burgueño-Ferreira³, Rodolfo Ramírez-Valverde¹, Luis Alberto Miranda-Romero¹

¹ Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Zootecnia Postgrado en Producción Animal. Carretera Federal México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

² Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Postgrado en Botánica. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

³ Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Carretera México-Veracruz km 45, El Batán, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56237.

* Autor para correspondencia: jdanieljimenezr@hotmail.com

RESUMEN

El cultivo asociado de gramíneas y leguminosas para forraje tiene ventajas sobre el monocultivo; para evaluarlas se investigó la asociación de avena negra (*Avena strigosa* Schreb) con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth). El objetivo del estudio fue evaluar el rendimiento de forraje, la composición botánica, morfológica y química de avena negra en monocultivo y en asociación con veza de invierno, a diferentes alturas del cultivo y alturas de forraje residual. Se evaluaron 18 tratamientos con un diseño de bloques completos al azar en parcelas divididas; en las parcelas mayores, el tipo de cultivo (monocultivo o asociación); y en parcelas menores, nueve gestiones de cosecha (combinaciones) de tres alturas de cultivo (Ac: 40, 50 y 60 cm) y tres alturas de forraje residual (Afr: 8, 14 y 20 cm). El rendimiento de forraje fue mayor ($p \leq 0.05$) en Ac50-Afr8, Ac60-Afr8 y Ac60-Afr14 durante el segundo ciclo de cultivo, 8555 kg MS ha⁻¹ promedio. En monocultivo y asociación, con Ac40-Afr14 y Ac40-Afr20 se hicieron más cortes (tres a cuatro) y con Ac60-Afr8, Ac60-Afr14 y Ac60-Afr20 menos cortes (uno a dos). La concentración de proteína cruda fue 19 % mayor ($p \leq 0.05$) en monocultivo que en asociación (19.2 y 16.2 %). Las concentraciones mayores ($p \leq 0.05$) de proteína cruda se obtuvieron en Ac40-Afr8, Ac40-Afr14 y Ac40-Afr20 (promedio 20.5 %), y la menor se registró en Ac60-Afr8 (13.2 %). El forraje con menor porcentaje de fibra detergente neutro ($p \leq 0.05$) se cosechó en Ac40-Afr8, Ac40-Afr14 y Ac50-Afr14 (promedio 43.4 %), mientras que Ac60-Afr20 obtuvo el mayor (49.3 %). En monocultivo y asociación se cosechó mayor cantidad de forraje, distribuido en al menos dos cosechas, con Ac de 50 y 60 cm en combinación con Afr. de 8 y 14 cm. Sin embargo, el forraje no fue de la mejor composición, debido a la mayor concentración de fibra detergente neutro y menor concentración de proteína cruda.

Palabras clave: *Avena strigosa*, *Vicia villosa*, altura de forraje, intensidad de cosecha.

Citation: Améndola-Massiotti RD, Jiménez-Rosales JD, García-Moya E, Burgueño-Ferreira JA, Ramírez-Valverde R, Miranda-Romero LA. 2022. Rendimiento y composición del forraje de avena negra en monocultivo y en asociación con veza de invierno. *Agrociencia*. 56(6): 1044-1076. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2405>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: July 13, 2021.
Approved: August 25, 2022.
Published in Agrociencia:
October 05, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



INTRODUCCIÓN

El cultivo asociado de gramíneas y leguminosas para forraje tiene ventajas sobre el monocultivo de gramíneas, al tener mayor rendimiento y contenido de proteína (Luscher *et al.*, 2014), como es el caso de la asociación de avena (*Avena sativa* L.) con veza común (*Vicia sativa* L.) (Erol *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2016). Las ventajas de las asociaciones son evidentes al tener de 30 a 50 % de leguminosa en la composición botánica (Luscher *et al.*, 2014).

La productividad y calidad de forraje en asociaciones también están determinados por el momento de cosecha. Conforme la avena crece, cuando la planta alcanza el estado reproductivo, hay mayor rendimiento de materia seca (MS) pero con concentración de proteína cruda (PC) menor (Espitia *et al.*, 2012; Ramírez-Ordoñez *et al.*, 2013). En investigaciones previas sobre cereales en monocultivo y sus asociaciones con *Veza* spp., la evaluación del rendimiento de forraje se ha enfocado en una sola cosecha en la etapa de llenado del grano (Ramírez-Ordoñez *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2016). La razón para hacer una sola cosecha es el aumento del riesgo de decapitación del meristemo apical por la elongación de los tallos en dicha etapa fenológica, lo cual afecta el rebrote y la persistencia (Gastal y Lemaire, 2015).

Quiroz-Pérez *et al.* (2016) mostraron el potencial productivo de la asociación de avena negra (*Avena strigosa* Schreb) con *Vicia* spp. La avena negra destaca por su potencial forrajero (Salgado *et al.*, 2013); además, cuando se cosecha en estado vegetativo y a intensidades de corte moderadas se puede obtener forraje de calidad alta distribuido en varias cosechas (Guzatti *et al.*, 2015). En México, el cv. Saia es recomendado (Sánchez *et al.*, 2014).

La evaluación del rendimiento y la calidad del forraje de avena negra, así como su asociación con la veza común en etapa de crecimiento, afecta la composición nutricional del forraje. Por ello se hipotetiza que tanto del monocultivo de avena negra como en asociación con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth) se pueden obtener rendimientos de forraje altos y con mejor composición distribuidos en más de una cosecha, cuando los cortes se lleven a cabo en plantas jóvenes con intensidades de corte moderadas. El objetivo del estudio fue evaluar el rendimiento de forraje, la composición botánica, morfológica y química de avena negra en monocultivo y en asociación con veza de invierno, a diferentes alturas del cultivo y alturas de forraje residual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y condiciones climatológicas

La investigación se realizó en el Módulo de Pastoreo de la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, México (19° 29' N, 98° 54' O, altitud 2240 m) en dos ciclos de cultivo; el primero de octubre 2017 a marzo 2018, y el segundo de octubre 2018 a marzo 2019. Se analizó el suelo del área experimental antes de la realización del estudio, del cual se obtuvo una textura franco-arcillosa con pH 7.5; densidad aparente, 1.04 g cm⁻³; materia orgánica, 2.64 %, bajo en fósforo (14.1 mg kg⁻¹) y en nitrógeno inorgánico (35.6 mg kg⁻¹). El clima es templado subhúmedo, con lluvias en verano. En la estación

meteorológica de Chapingo, Estado de México, se registró durante el primer ciclo, una oscilación de la temperatura media mensual entre 11 y 15 °C, y en el segundo, entre 13 y 17 °C. La precipitación acumulada fue semejante en los dos ciclos (102 y 110 mm), sin precipitaciones en diciembre. En noviembre del segundo ciclo se registró 12 veces más precipitación que en el primero (Figura 1).

Diseño experimental y tratamientos

En un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, se evaluaron 18 tratamientos en parcelas divididas. En las parcelas mayores se evaluó el tipo de cultivo con dos niveles, avena negra en monocultivo y su asociación con veza de invierno. En las parcelas menores se evaluaron nueve gestiones de cosecha (Cuadro 1) producto de la combinación de tres alturas de cultivo (Ac, 40, 50 y 60 cm) y tres alturas de forraje residual (Afr, 8, 14 y 20 cm). Las unidades experimentales corresponden a 72 parcelas de 12 m² cada una y callejones de 0.5 m de ancho entre parcelas.

Conducción de los experimentos

Las siembras se hicieron el 18 de octubre de 2017 para el primer ciclo y el 13 de octubre de 2018 para el segundo ciclo. Se usó siembra manual (al voleo), así como 130 kg de semilla pura germinable de avena por hectárea en el monocultivo; y 100 kg ha⁻¹ de semilla de avena negra más 30 kg ha⁻¹ de veza, en la asociación. Al momento de la siembra se fertilizó con 18 kg N ha⁻¹ y 46 kg P₂O₅ ha⁻¹, y durante la emisión de vástagos de avena (en promedio tres vástagos por planta) se aplicaron 30 kg N ha⁻¹; además, en el monocultivo se aplicaron en el primer riego después de cada corte 60 kg N ha⁻¹. Cada

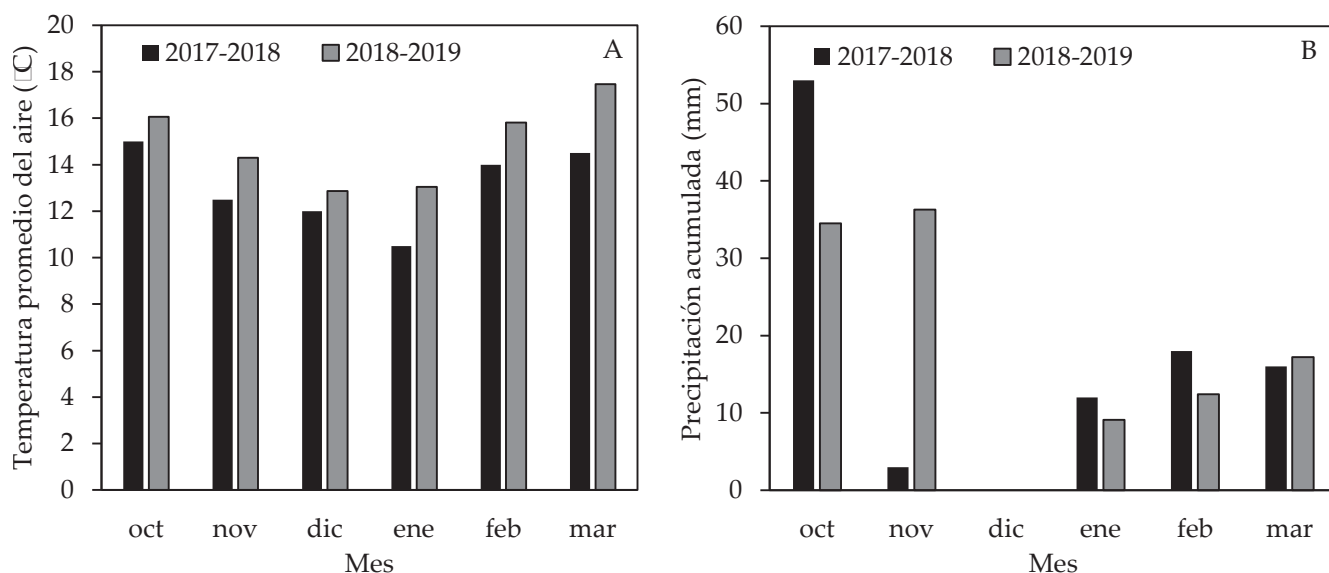


Figura 1. A: temperatura promedio mensual y B: precipitación acumulada durante los dos ciclos de cultivo.

Cuadro 1. Gestiones de cosecha evaluadas en avena negra (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia en monocultivo y en asociación con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth).

Gestión de cosecha	Ac [†] (cm)	Afr [‡] (cm)
Ac40-Afr8	40	8
Ac40-Afr14	40	14
Ac40-Afr20	40	20
Ac50-Afr8	50	8
Ac50-Afr14	50	14
Ac50-Afr20	50	20
Ac60-Afr8	60	8
Ac60-Afr14	60	14
Ac60-Afr20	60	20

[†]Ac: altura de cultivo; [‡]Afr: altura de forraje residual.

14 d, en promedio, se aplicó riego por aspersión (62 mm por riego); se suministraron 13 riegos en el primer ciclo y 11 riegos en el segundo.

El registro de la altura del cultivo consistió en 15 mediciones por parcela realizadas con un bastón provisto con cinta métrica. El seguimiento sistemático se hizo cada semana, cuando el valor promedio fue cercano a la altura de cultivo definida para cada gestión de cosecha, las lecturas se llevaron a cabo cada dos días. Las alturas de cultivo promedio registradas en el monocultivo de avena fueron 41 ± 3 , 48 ± 3 y 59 ± 2 cm en el primer ciclo, y 50 ± 5 , 51 ± 4 y 53 ± 8 cm en el segundo ciclo; en tanto que en la asociación fueron 41 ± 3 , 50 ± 1 y 60 ± 0 cm en el primer ciclo, y 40 ± 3 , 49 ± 5 y 53 ± 8 cm en el segundo ciclo.

Variables evaluadas

Se valoraron el rendimiento de forraje (RF, kg MS ha⁻¹), concentración de PC (%), fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %), composición botánica del forraje y la composición morfológica del monocultivo. El RF se evaluó a partir de la masa de forraje cosechada con tijeras dentro de cada parcela, a la altura de cultivo de cada gestión de cosecha, en tres unidades de muestreo fijas de 0.32 m² (0.8 × 0.4 m). Después, se registró el peso fresco de la masa cosechada. Para la determinación de MS se tomó una muestra compuesta de 400 g de la masa de forraje y se secó en estufa con circulación de aire forzado a 55 °C, hasta peso constante. El RF se evaluó a partir de la suma del rendimiento de MS cosechado en cada corte de cada gestión de cosecha. Después del corte de las muestras de forraje, con el fin de respetar las alturas de forraje residual definidas en cada gestión de cosecha, se hizo el corte total del forraje que quedó en cada parcela; con una segadora (Model UT44110, Homelite®, EE. UU.). La composición botánica y morfológica se cuantificó a partir de una submuestra compuesta de 400 g de la masa de forraje cortada en cada unidad experimental. Por medio de separación manual se obtuvieron avena, veza (en asociación), maleza y material

muerto. A continuación, se separaron los componentes morfológicos de avena (lámina de hoja y pseudotallo + tallo) y cada componente se secó hasta peso constante en estufa de aire forzado a 100 °C. Al final, la proporción de cada componente se estimó con base en el peso seco.

La composición química del forraje fue evaluada solo en el primer ciclo. Para ello, se usaron las mismas muestras de masa de forraje que fueron secadas (a 55 °C) para la determinación de MS y se molieron en molino (Thomas Model 4, Wiley®, EE. UU.) con criba de 1 mm; para estimar la concentración de PC (concentración de N × 6.25) se hicieron determinaciones de N con el método de Kjeldahl (Alencar *et al.*, 2019). Las evaluaciones de FDN y FDA se llevaron a cabo de manera secuencial (Ferreira y Mertens, 2007) con el uso de bolsas filtrantes con porosidad de 25 µm (Model F57, Ankom®, EE. UU.) en un analizador de fibras (Model A200, Ankom®, EE. UU.).

Análisis estadístico

A las variables evaluadas se les realizó un análisis de varianza en SAS®. El modelo para el RF fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + C_j + T_k + E_{ijk} + G_l + BT_{ik} + TG_{kl} + CT_{jk} + CG_{jl} + CTG_{jkl} + e_{ijkl}$$

donde, Y_{ijkl} es la variable dependiente; μ , el efecto de la media general; B_i , el efecto de bloque; C_j el efecto del ciclo de cultivo; T_k , el efecto del tipo de cultivo; E_{ijk} , el efecto del error experimental en parcela mayor (error a); G_l , el efecto de la gestión de cosecha; BT_{ik} , el efecto de la interacción entre bloque y tipo de cultivo; TG_{kl} , el efecto de la interacción entre tipo de cultivo y gestión de cosecha; CT_{jk} , el efecto de la interacción entre ciclo de cultivo y tipo de cultivo; CG_{jl} , el efecto de la interacción entre ciclo de cultivo y gestión de cosecha; CTG_{jkl} , el efecto de la triple interacción entre el ciclo de cultivo, tipo de cultivo y gestión de cosecha; e_{ijkl} , el efecto del error experimental en parcela menor (error b).

El modelo para los componentes botánicos y morfológicos fue:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + C_j + G_k + CG_{jk} + E_{ijk}$$

donde, Y_{ijk} es la variable dependiente; μ , el efecto de la media general; B_i , el efecto de bloque; C_j el efecto del ciclo de cultivo; G_k , el efecto de la gestión de cosecha; CG_{jk} , el efecto de la interacción entre ciclo de cultivo y gestión de cosecha; E_{ijk} , el efecto del error experimental.

El modelo para PC, FDN y FDA fue:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + BT_{ij} + E_{ij} + G_k + TG_{jk} + e_{ijk}$$

donde, $Y_{ijk'}$ es la variable dependiente; μ , el efecto de la media general; $B_{i'}$ el efecto de bloque; $T_{j'}$ el efecto del tipo de cultivo; $BT_{ij'}$ el efecto de la interacción entre bloque y tipo de cultivo; $E_{ijk'}$ el efecto del error experimental en parcela mayor (error a); $G_{k'}$ el efecto de la gestión de cosecha; $TG_{jk'}$ el efecto de la interacción entre tipo de cultivo y gestión de cosecha; $e_{ijk'}$ el efecto del error experimental en parcela menor (error b). Las medias se compararon con pruebas de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fechas y número de cortes en los cultivos

El número de cortes en el monocultivo y en la asociación varió con las gestiones de cosecha (Cuadro 2). Independiente del tipo de cultivo, en Ac40-Afr14 y Ac40-Afr20 se logró un mayor número de cortes (tres a cuatro), y en Ac60-Afr8, Ac60-Afr14 y Ac60-Afr20 se registraron menos cortes (uno a dos). Al margen de la altura de cultivo en las gestiones de cosecha, los intervalos entre cortes en ambos cultivos fueron mayores con intensidad alta de cosecha (menos forraje residual, Ac40-Afr8, Ac50-Afr8 y Ac60-Afr8) y menores con baja intensidad (más forraje residual, Ac40-Afr20, Ac50-Afr20 y Ac60-Afr20).

El aumento del intervalo entre cortes en ambos cultivos a mayor intensidad de cosecha (menos forraje residual) es una respuesta que ha sido observada en gramíneas forrajeras. Hamilton *et al.* (2013) consignaron mayor intervalo entre cortes cuando cosecharon ballico perenne (*Lolium perenne* L.) y festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) a mayor intensidad de cosecha (2.5 y 5 cm de Afr) que a menor (12.5 y 15 cm de Afr). Dicha respuesta se relacionó con el rebrote lento de las plantas, por el área foliar residual menor que queda después de la cosecha intensa del forraje. Por el contrario, con intensidades de cosecha bajas se reduce el intervalo entre cortes, debido al crecimiento rápido del forraje originado por la mayor área foliar residual en los hijatos que favorecen la fotosíntesis (Martins *et al.*, 2021).

En el primer ciclo de cultivo, las metas de altura de cultivo al primer corte se alcanzaron antes en el monocultivo que en la asociación; pero en el segundo ciclo, el primer corte se hizo en la misma fecha en ambos tipos de cultivo. El menor crecimiento de la asociación frente al monocultivo se explica por la competencia interespecífica, que ya ha sido documentada en asociaciones de cereales con veza; al observarse menores tasas de crecimiento en las asociaciones que en los monocultivos (Lithourgidis *et al.*, 2006).

Rendimiento de forraje

En el RF se detectó efecto de la interacción ciclo de cultivo \times tipo de cultivo \times gestión de cosecha ($p \leq 0.001$). Sin embargo, con base en las sumas de cuadrados, el 61 % de la variación se atribuyó a la interacción ciclo de cultivo \times gestión de cosecha (38 %, $p \leq 0.05$), y a los efectos del ciclo de cultivo (18 %, $p \leq 0.05$) y tipo de cultivo (11 %, $p \leq 0.05$) y el 14 % a la triple interacción. Los mayores RF se obtuvieron en las gestiones de cosecha de Ac50-Afr8, Ac60-Afr8 y Ac60-Afr14 en el segundo ciclo (promedio 8555 kg MS ha⁻¹). Los menores RF resultaron en Ac50-Afr8, Ac50-Afr14, Ac50-Afr20, Ac60-

Cuadro 2. Fechas de corte de avena negra (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia en monocultivo y en asociación con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth) a diferentes gestiones de cosecha, en dos ciclos de cultivo.

Gestión de cosecha	Ac ⁴ 40 Afr ⁸	Ac40 Afr14	Ac40 Afr20	Ac50 Afr8	Ac50 Afr14	Ac50 Afr20	Ac60 Afr8	Ac60 Afr14	Ac60 Afr20
Monocultivo en el primer ciclo de cultivo (2017-2018)									
Corte									
1	5 ene	5 ene	5 ene	17 ene	17 ene	17 ene	11 feb	11 feb	11 feb
2	22 feb	15 feb	11 feb	27 feb	22 feb	17 feb			14 mar
3		7 mar	27 feb			14 mar			
4			17 mar						
dds-1 [§]	79	79	79	91	91	91	116	116	116
dec ^b	48	31	24	41	36	28	-	-	31
Monocultivo en el segundo ciclo de cultivo (2018-2019)									
Corte									
1	14 dic	14 dic	14 dic	26 dic	26 dic	26 dic	15 ene	15 ene	15 ene
2	5 feb	29 ene	22 ene	19 feb	16 feb	13 feb	02 mar	02 mar	25 feb
3	4 mar	25 feb	13 feb	4 mar					
dds-1 [§]	62	62	62	74	74	74	94	94	94
dec ^b	40	37	27	55	52	49	46	46	41
Asociación en el primer ciclo de cultivo (2017-2018)									
Corte									
1	17 ene	17 ene	17 ene	14 feb	14 feb	14 feb	20 feb	20 feb	20 feb
2	27 feb	20 feb	17 feb		13 mar	7 mar			
3		13 mar	7 mar						
dds-1 [§]	91	91	91	119	119	119	125	125	125
dec ^b	41	28	25	-	27	21	-	-	-
Asociación en el segundo ciclo de cultivo (2018-2019)									
Corte									
1	14 dic	14 dic	14 dic	26 dic	26 dic	26 dic	15 ene	15 ene	15 ene
2	15 feb	5 feb	22 ene	2 mar	16 feb	13 feb	4 mar	4 mar	25 feb
3		28 feb	13 feb	4 mar					
dds-1 [§]	62	62	62	74	74	74	94	94	94
dec ^b	63	38	27	66	52	49	48	48	41

[†]Ac: altura de cultivo (40, 50 y 60 cm); [‡]Afr: altura de forraje residual (8, 14 y 20 cm); [§]dds-1: días después de la siembra al primer corte; ^bdec: días entre cortes.

Afr8, Ac60-Afr14 y Ac60-Afr20 del primer ciclo, y con Ac40-Afr20 y Ac50-Afr20 del segundo ciclo (promedio 5348 kg MS ha⁻¹, Cuadro 3). El RF fue 22 % mayor ($p \leq 0.05$) en el segundo ciclo que en el primero (6866 vs. 5632 kg MS ha⁻¹), y 17 % superior ($p \leq 0.05$) en el monocultivo que en la asociación (6743 vs. 5754 kg MS ha⁻¹, Figura 2).

Los mayores RF obtenidos en Ac50-Afr8, Ac60-Afr8 y Ac60-Afr14 del segundo ciclo se atribuyen a que con dichas gestiones se cosechó el forraje a mayores Ac e intensidades

Cuadro 3. Rendimiento de forraje de avena negra (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia en monocultivo y en asociación con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth) con diferentes gestiones de cosecha, en dos ciclos de cultivo.

Gestión de cosecha	Ciclo de cultivo	kg MS ha ⁻¹
Ac [†] 40-Afr [‡] 8	Primero	5861 cdef
	Segundo	5882 cdef
Ac40-Afr14	Primero	6231 cde
	Segundo	6072 cdef
Ac40-Afr20	Primero	6154 cdef
	Segundo	5491 def
Ac50-Afr8	Primero	5717 def
	Segundo	7984 ab
Ac50-Afr14	Primero	5589 def
	Segundo	6695 bcd
Ac50-Afr20	Primero	5574 def
	Segundo	4854 f
Ac60-Afr8	Primero	5485 def
	Segundo	8879 a
Ac60-Afr14	Primero	4827 f
	Segundo	8803 a
Ac60-Afr20	Primero	5245 ef
	Segundo	7133 bc
	EEM [§]	269
	<i>p</i> ^b	0.0001

[†]Ac: altura de cultivo (40, 50 y 60 cm); [‡]Afr: altura de forraje residual (8, 14 y 20 cm); [§]EEM: error estándar de la media; ^b*p*: probabilidad de diferencia; ^aMedias con letra distinta indican diferencia estadística (Tukey, *p* ≤ 0.05).

de cosecha (menores Afr) y a las mejores condiciones ambientales que se presentaron en el segundo ciclo. Existe evidencia de que el RF es superior cuando se cosecha a alturas mayores (Espitia *et al.*, 2012) e intensidades altas (Brink *et al.*, 2013; Hamilton *et al.*, 2013). En el segundo ciclo las temperaturas medias mensuales que se registraron fueron superiores y la precipitación un mes después de la siembra (noviembre) también fue mayor que en el primer ciclo (Figura 1). Lo anterior originó el rápido crecimiento y establecimiento de los cultivos, y en consecuencia que se obtuviera un corte más con las gestiones de cosecha (Ac50-Afr8, Ac60-Afr8 y Ac60-Afr14) en el segundo ciclo (Cuadro 2). Durante el segundo ciclo, incluso los primeros cortes en todas las gestiones de cosecha se hicieron en promedio 19 d antes en el monocultivo y 35 d antes en la asociación que durante el primer ciclo (Cuadro 2). Al igual que lo documentado en otras investigaciones realizadas en cultivos asociados (Puzynska *et al.*, 2021) y mono-

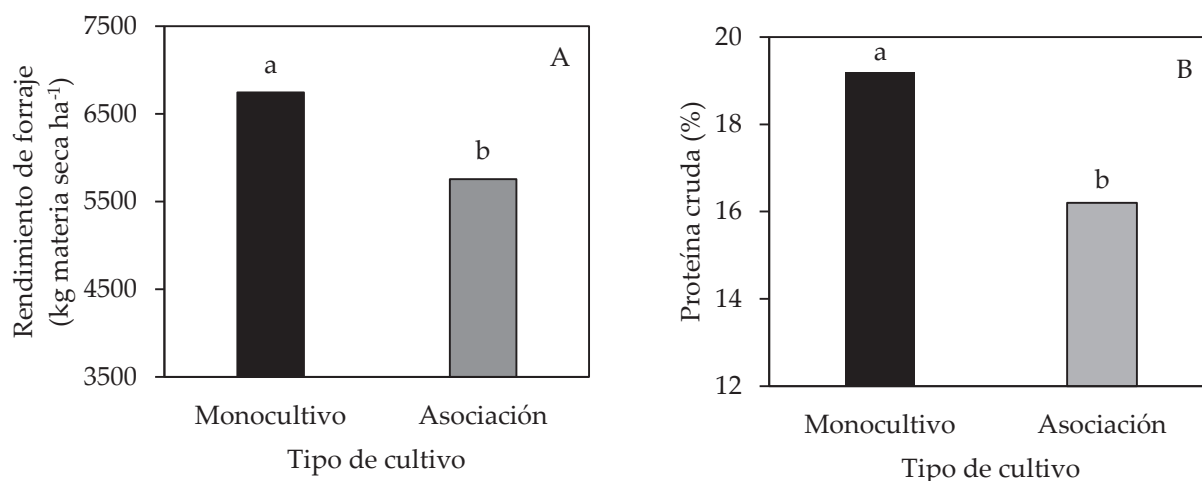


Figura 2. A: rendimiento de forraje y B: concentración de proteína cruda de avena negra (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia en monocultivo y en asociación con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth). Columnas con letra distinta son diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

cultivos (Solomon *et al.*, 2017), es evidente que las variaciones climáticas (en temperatura y precipitación) entre los años de evaluación afectan el RF.

La ventaja productiva del monocultivo frente a la asociación se explica porque en el monocultivo hubo cuatro cortes más en el primer ciclo y un corte más en el segundo ciclo que en la asociación. Al respecto, hay evidencia de que el forraje de gramíneas asociadas con veza crece más lento que cuando se desarrolla en monocultivo, debido a la competencia entre especies (Lithourgidis *et al.*, 2006). Como resultado de lo anterior, durante el primer experimento, las metas de altura de cultivo al primer corte en el monocultivo se alcanzaron en promedio 16 d antes que en la asociación (Cuadro 2). Además, en este estudio es probable que la aplicación de N en el monocultivo (60 kg N ha⁻¹ cosecha⁻¹) haya incidido para que el RF fuese mayor que en la asociación.

La avena negra en monocultivo fue más productiva que su asociación con veza de invierno, lo que coincide con lo consignado en otras investigaciones (Lithourgidis *et al.*, 2006; Tuna y Orak, 2007) en las cuales se evaluó el monocultivo de avena común y su asociación con veza común. Por el contrario, Flores *et al.* (2016) señalaron mayor RF en la asociación de avena común con veza común, pero hicieron un solo corte cuando la gramínea estaba en grano masoso. En este estudio, las alturas de cultivo se alcanzaron en estado vegetativo de la avena (la proporción de inflorescencia de avena fue en promedio 0.6 y 0.7 %).

Composiciones botánica y morfológica

En el monocultivo, no se detectó efecto de la interacción ciclo de cultivo × gestión de cosecha ($p > 0.05$) en las proporciones de avena, maleza, material muerto y componentes morfológicos de avena (lámina de hoja, pseudotallo + tallo e inflorescencia). Sin

embargo, hubo efecto ($p \leq 0.05$) de la gestión de cosecha en las proporciones de avena, material muerto (Cuadro 4) y los componentes lámina de hoja y pseudotallo + tallo (Figura 3). En el monocultivo, la mayor proporción de avena resultó en Ac50-Afr14 (97.7 %) y la menor en Ac60-Afr20 (82.9 %). Por el contrario, el contenido de material muerto fue superior en las gestiones de cosecha con mayor altura de cultivo Ac60-Afr8, Ac60-Afr14 y Ac60-Afr20 (promedio 8.7 %), y fue menor en Ac40-Afr8, Ac40-Afr14, Ac40-Afr20, Ac50-Afr8, Ac50-Afr14 y Ac50-Afr20 (promedio 0.5 %, Cuadro 4). La proporción de maleza fue semejante ($p > 0.05$) en todas las gestiones de cosecha (promedio 5.3 %).

En el monocultivo las mayores proporciones de lámina de hoja de avena resultaron en las gestiones de cosecha de Ac40-Afr14 y Ac40-Afr20 (promedio 71.5 %), y las menores en Ac60-Afr8, Ac60-Afr14 y Ac60-Afr20 (promedio 49 %). Por el contrario, las proporciones de pseudotallo + tallo resultaron menores en Ac40-Afr14 y Ac40-Afr20 (promedio 20.5 %), y mayores en Ac60-Afr8 y Ac60-Afr14 (promedio 39 %, Figura 3). La cantidad de inflorescencia en las gestiones de cosecha fue similar ($p > 0.05$), en promedio 0.7 %. Se detectó efecto ($p \leq 0.05$) del ciclo de cultivo en las proporciones de avena, maleza y material muerto (Cuadro 4). Avena y material muerto fueron 10 y 208 % superiores en el segundo ciclo que en el primero. La maleza solo estuvo presente en el

Table 4. Botanical composition of black oat (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia to different harvest management options, in two crop cycles.

Gestión de cosecha	Avena	Maleza	Material muerto
Ac [†] 40-Afr [‡] 8	94.0 ab	6.0	0.0 b
Ac40-Afr14	89.7 ab	9.6	0.7 b
Ac40-Afr20	95.2 ab	3.4	1.4 b
Ac50-Afr8	93.4 ab	6.1	0.5 b
Ac50-Afr14	97.7a	2.1	0.2 b
Ac50-Afr20	94.1 ab	5.9	0.0 b
Ac60-Afr8	88.3 ab	1.0	10.7a
Ac60-Afr14	88.2 ab	5.2	6.6 ab
Ac60-Afr20	82.9 b	8.4	8.7a
EEM [§]	2.8	2.3	1.6
p^b	0.007	0.101	0.001
Ciclo de cultivo			
Primero	87.2 b	11.6a	1.2 b
Segundo	96.3a	0.0 b	3.7a
EEM	1.3	1.1	0.8
p	0.001	0.001	0.025

[†]Ac: altura de cultivo (40, 50 y 60 cm); [‡]Afr: altura de forraje residual (8, 14 y 20 cm); [§]EEM: error estándar de la media; ^b p : probabilidad de diferencia; ^aMedias con letra distinta entre hileras indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

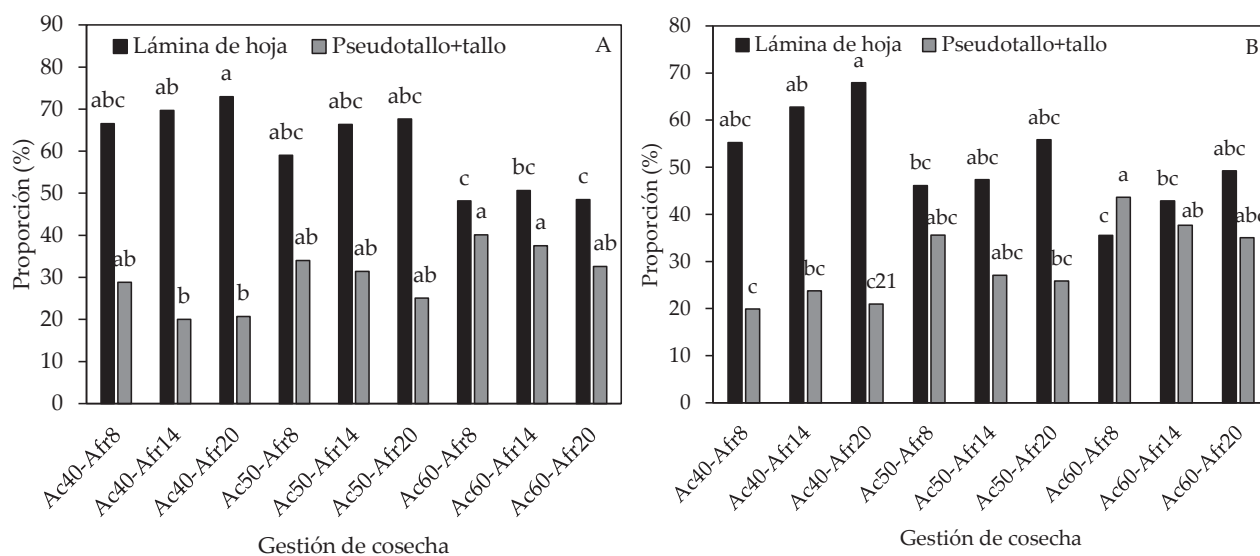


Figura 3. Lámina de hoja y pseudotallo + tallo de avena negra (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia en A: monocultivo y B: en asociación con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth) con diferentes gestiones de cosecha. Columnas con letra distinta son diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

primer ciclo, quizá debido a la mayor competencia por parte de la avena en el segundo ciclo.

En la asociación se detectó efecto de la interacción ciclo de cultivo \times gestión de cosecha ($p \leq 0.05$) en las proporciones de avena, veza y material muerto (Cuadro 5). Los mayores porcentajes de avena resultaron en las gestiones de cosecha de Ac40-Afr14, Ac40-Afr20, Ac50-Afr8, Ac50-Afr14 y Ac50-Afr20 (promedio 93.9 %), durante el segundo ciclo, y los menores en Ac50-Afr8, Ac50-Afr14 y Ac50-Afr20 del primer ciclo (promedio 61.8 %). Las mayores proporciones de veza se obtuvieron en Ac40-Afr8 del segundo ciclo y Ac50-Afr14 del primer ciclo (promedio 17.2 %); las menores se presentaron en Ac40-Afr20 y Ac60-Afr20 del primer ciclo y Ac40-Afr20, Ac50-Afr14, Ac50-Afr20, Ac60-Afr8 y Ac60-Afr20 del segundo ciclo (promedio 3.7 %). Las mayores proporciones de material muerto se registraron en Ac60-Afr8, Ac60-Afr14 y Ac60-Afr20 del segundo ciclo (promedio 12 %), y fueron nulas en Ac40-Afr14, Ac50-Afr8, Ac50-Afr14 y Ac50-Afr20 del segundo ciclo.

En la asociación las mayores proporciones de lámina de hoja de avena resultaron en las gestiones de cosecha de Ac40-Afr14 y Ac40-Afr20 (promedio 65 %), y las menores en Ac60-Afr8 y Ac60-Afr14 (promedio 39 %). Por el contrario, las proporciones de pseudotallo + tallo resultaron menores en Ac40-Afr8, Ac40-Afr14, Ac40-Afr20 y Ac50-Afr20 (promedio 23 %), y mayores en Ac60-Afr8 y Ac60-Afr14 (promedio 41 %, Figura 3). La inflorescencia de avena fue similar ($p > 0.05$) en las gestiones de cosecha (promedio 0.6 %).

Cuadro 5. Composición botánica de avena negra (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia en asociación con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth) con diferentes gestiones de cosecha, en dos ciclos de cultivo.

Gestión de cosecha	Ciclo de cultivo	Avena	Veza	Maleza	Material muerto
Ac [†] 40-Afr [‡] 8	Primero	73.6 bcd [¶]	7.9 ab	18.1	0.4 c
	Segundo	76.7 abcd	17.1a	1.1	5.1 abc
Ac40-Afr14	Primero	81.1 abc	7.1 ab	11.0	0.8 c
	Segundo	93.0 ab	7.0 ab	0.0	0.0 c
Ac40-Afr20	Primero	87.1 abc	4.0 b	8.6	0.3 c
	Segundo	91.7 ab	4.7 b	0.2	3.4 bc
Ac50-Afr8	Primero	62.9 cd	10.3 ab	20.0	6.8 abc
	Segundo	91.1 ab	8.9 ab	0.0	0.0 c
Ac50-Afr14	Primero	54.2 d	17.2a	25.2	3.4 bc
	Segundo	96.5a	3.5 b	0.0	0.0 c
Ac50-Afr20	Primero	68.4 cd	10.2 ab	17.1	4.3 abc
	Segundo	97.2a	2.8 b	0.0	0.0 c
Ac60-Afr8	Primero	74.6 abcd	7.9 ab	11.1	6.4 abc
	Segundo	83.4 abc	4.6 b	0.0	12.0 ab
Ac60-Afr14	Primero	80.6 abcd	4.9 ab	10.1	4.3 abc
	Segundo	80.9 abc	5.2 ab	0.5	13.4a
Ac60-Afr20	Primero	83.8 abc	1.8 b	8.1	6.3 abc
	Segundo	84.5 abcd	4.8 b	0.0	10.7 ab
	EEM [§]	4.8	2.5	3.8	2.2
	<i>p</i> ^b	0.001	0.001	0.261	0.011

[†]Ac: altura de cultivo (40, 50 y 60 cm); [‡]Afr: altura de forraje residual (8, 14 y 20 cm); [§]EEM: error estándar de la media; ^b*p*: probabilidad de diferencia; [¶]Medias con letra distinta entre hileras indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Tanto en el monocultivo como en la asociación se detectó una relación opuesta entre las proporciones de lámina de hoja y el pseudotallo + tallo con el incremento de la altura del cultivo en las gestiones de cosecha; relación común que ha sido observada en gramíneas forrajeras (Aguinaga *et al.*, 2008; Guzatti *et al.*, 2015). La proporción de lámina de hoja fue mayor en altura de cultivo de 40 cm que en 60 cm, y la de pseudotallo + tallo fue mayor en altura de cultivo de 60 cm que en 40 cm. Estos resultados se deben a que durante el crecimiento de las gramíneas hay una modificación en su estructura del dosel. Durante el estado vegetativo crecen hojas (en tallos que no se alargan) y después continúa el estado de elongación de tallos (Gastal y Lemaire, 2015; Lemaire y Belanger, 2020); mismo que detiene el desarrollo de nuevas hojas, por lo que las hojas más viejas son sombreadas. Este proceso aumenta la senescencia y la acumulación de material muerto en la base del dosel (Da Silva *et al.*, 2015). Lo anterior explica el motivo por el cual la cantidad de material muerto fue superior en las gestiones de cosecha con 60 cm de altura de cultivo.

En la asociación, si bien las proporciones de avena negra y veza variaron entre las gestiones de cosecha, la proporción de veza fue mucho menor que la de avena; en promedio se cosechó 81 % de avena y 7 % de veza. El bajo porcentaje de leguminosa en la asociación se atribuye a la baja proporción de su semilla en la densidad de siembra; 77 % de semilla fue de avena y 23 % de veza. Hay evidencia de que en la asociación de avena-veza, el porcentaje de la leguminosa en el forraje cosechado refleja la cantidad de semilla de la leguminosa en la densidad de siembra (Erol *et al.*, 2009).

Composición química

No se detectó efecto de la interacción tipo de cultivo × gestión de cosecha ($p > 0.05$) en la composición química del forraje. La concentración de PC fue 19 % mayor ($p \leq 0.05$) en monocultivo (19.2 %) que en asociación (Figura 2), en tanto que las de FDN y FDA fueron similares ($p > 0.05$) entre tipos de cultivo, con promedios de 45 y 24 %. Las mayores concentraciones de PC ($p \leq 0.05$) se obtuvieron en las gestiones de cosecha con menor altura de cultivo (Ac40-Afr8, Ac40-Afr14 y Ac40-Afr20, promedio 20.5 %) y el menor (13.2 %) se registró con Ac60-Afr8 (Figura 4). El forraje con las menores concentraciones de FDN ($p \leq 0.05$) se cosechó en Ac40-Afr8, Ac40-Afr14 y Ac50-Afr14 (promedio 43.4 %), y en Ac60-Afr20 se cosechó el forraje con mayor concentración de FDN (49.3 %). La concentración de FDA fue más baja ($p \leq 0.05$) en Ac40-Afr14 (22.5 %) y más alta en Ac60-Afr20 (25.7 %).

La menor concentración de PC lograda de la asociación gramínea-leguminosa de este estudio no concuerda con lo reportado en otras investigaciones (Lithourgidis *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2016). Esto se atribuye al efecto que tiene el estado de madurez de la avena al momento de la cosecha en la calidad del forraje (Molla *et al.*, 2018). En este estudio, los cortes se hicieron cuando el forraje estaba en estado vegetativo, mientras que en otras investigaciones que han obtenido mayor aporte de PC en la asociación (Lithourgidis *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2016), el cultivo se cosechó cuando la avena estaba en estados avanzados de madurez (etapa reproductiva) con menor calidad de forraje. Flores *et al.* (2016) obtuvieron concentraciones de PC de 17.9, 12.5, 9.5 y 9.8 % en estados de embuche, grano lechoso, grano masoso y grano maduro; estos resultados son menores a lo obtenido en el monocultivo de avena (19.2 % de PC, Figura 2) de este estudio.

Otra razón de la concentración menor de PC obtenida en la asociación respecto al monocultivo es el menor porcentaje de veza en la composición botánica de la asociación (1.8 a 17.2 %, Cuadro 5). El aporte de PC de las praderas mixtas (gramínea-leguminosa) frente a gramíneas puras es evidentemente mayor cuando la leguminosa en la composición está en proporción de 30 a 50 % (Luscher *et al.*, 2014). En este estudio, la proporción de semilla de veza (23 %) en la densidad de siembra de la asociación fue menor que la de avena negra (77 %). Existe evidencia de que la PC del forraje de la asociación avena común con veza común aumenta a medida que el porcentaje de leguminosa en la siembra y en la MS cosechada se incrementa (Erol *et al.*, 2009).

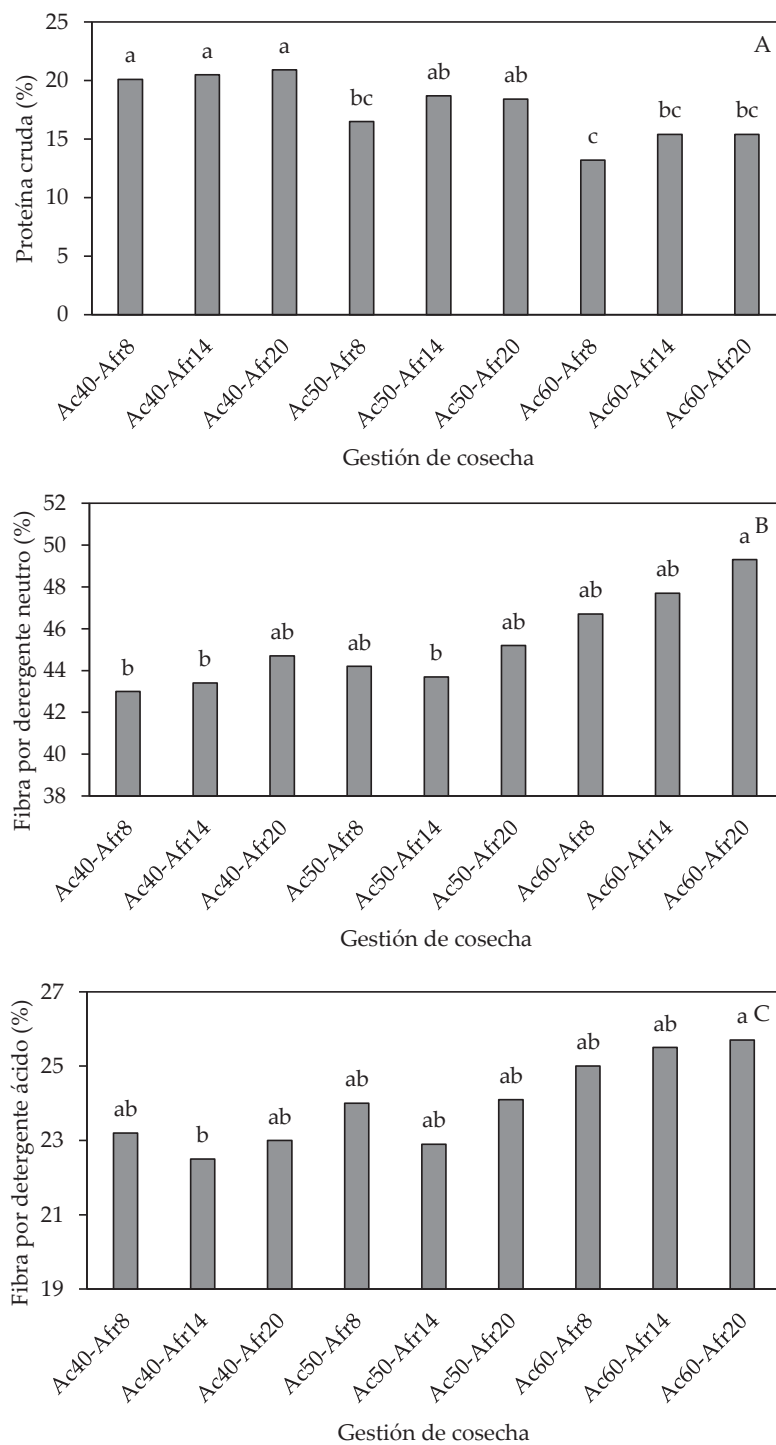


Figura 4. Concentraciones de A: proteína cruda, B: fibra detergente neutro y C: fibra detergente ácido de avena negra (*Avena strigosa* Schreb) cv. Saia en monocultivo y en asociación con veza de invierno (*Vicia villosa* Roth) con diferentes gestiones de cosecha. Columnas con letra distinta en cada subfigura son diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

La disminución de la concentración de PC y el aumento de las concentraciones de FDN y FDA que se obtuvieron con el avance del crecimiento de los cultivos son respuestas comunes que se han obtenido en gramíneas (Castro-Hernández *et al.*, 2017), leguminosas (Sulc *et al.*, 2020) y asociaciones de avena con veza (Molla *et al.*, 2018). En las gestiones de cosecha en las que se obtuvo mayor proporción de lámina foliar (Ac40-Afr14 y Ac40-Afr20), se cosechó forraje con mayor concentración de PC y menores concentraciones de FDN y FDA. Por el contrario, en las gestiones de cosecha en las que se obtuvo la mayor proporción de pseudotallo + tallo (Ac60-Afr8 y Ac60-Afr14), se cosechó el forraje con menor concentración de PC y altas concentraciones de FDN y FDA. Esto último se explica por la mejor composición química que tienen las hojas (menos FDN, FDA y más PC) frente a los tallos (Branco *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

En avena negra en monocultivo y en asociación con veza de invierno se cosechó mayor cantidad de forraje, distribuido en al menos dos cosechas, con alturas de cultivos de 50 y 60 cm en combinación con cosechas de mayor intensidad (8 y 14 cm de forraje residual). Sin embargo, el forraje cosechado con dichas gestiones no fue el de la mejor composición, debido a las altas proporciones de tallos, fibra detergente neutro y a la menor concentración de proteína cruda.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Juan Daniel Jiménez-Rosales durante sus estudios de doctorado.

REFERENCIAS

- Aguinaga AAQ, Carvalho PCF, Anghinoni I, Pilau A, Aguinaga AJQ, Gianluppi GDF. 2008. Componentes morfológicos e produção de forragem de pastagem de aveia e azevém manejada em diferentes alturas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37 (9): 1523–1530. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008000900002>
- Alencar NM, Vendramini JMB, Dubeux Jr JCB, dos Santos AC, Sánchez JMD, da Silva HM, Silveira ML, Sousa LF, Neiva JNM. 2019. Impact of leaf and stem proportions on dry matter and crude protein *in situ* disappearance of rhizome peanut genotypes. *Crop Science* 59 (4): 1815–1821. <https://doi.org/10.2135/cropsci2019.02.0114>
- Branco AF, Viana KB, Castañeda RD, Prohmann PE, Coneglian SM, Mouro GF. 2012. Chemical composition and crude protein fractions of Coast cross grass under grazing on winter, spring and summer in Southern Brazil. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 34 (2): 183–187. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v34i2.10895>
- Brink GE, Jackson RD, Alber NB. 2013. Residual sward height effects on growth and nutritive value of grazed temperate perennial grasses. *Crop Science* 53 (5): 2264–2274. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.01.0068>
- Castro-Hernández H, Domínguez-Vara IA, Morales-Almaráz E, Huerta-Bravo M. 2017. Composición química, contenido mineral y digestibilidad *in vitro* de raigrás (*Lolium perenne*) según intervalo de corte y época de crecimiento. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8 (2): 201–210. <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i2.4445>
- Da Silva SC, Sbrissia AF, Pereira LET. 2015. Ecophysiology of C₄ forage grasses-understanding plant growth for optimising their use and management. *Agriculture* 5 (3): 598–625. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030598>

- Erol A, Kaplan M, Kizilsimsek M. 2009. Oats (*Avena sativa*)-common vetch (*Vicia sativa*) mixtures grown on a low-input basis for a sustainable agriculture. *Tropical Grasslands* 43 (3): 191–196.
- Espitia Rangel E, Villaseñor Mir HE, Tovar Gómez R, de la O Olán M, Limón Ortega A. 2012. Momento óptimo de corte para rendimiento y calidad de variedades de avena forrajera. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (4): 771–783. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i4.1430>
- Ferreira G, Mertens DR. 2007. Measuring detergent fiber and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags. *Animal Feed Science and Technology* 133 (3-4): 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.04.010>
- Flores N MJ, Sánchez G RA, Echavarría C FG, Gutiérrez L R, Rosales N CA, Salinas G H. 2016. Producción y calidad de forraje en mezclas de veza común con cebada, avena y triticale en cuatro etapas fenológicas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 7 (3): 275–291. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v7n3/2448-6698-rmcp-7-03-00275-en.pdf> (Recuperado: junio 2022).
- Gastal F, Lemaire G. 2015. Defoliation, shoot plasticity, sward structure and herbage utilization in pasture: review of the underlying ecophysiological processes. *Agriculture* 5 (4): 1146–1171. <https://doi.org/10.3390/agriculture5041146>
- Guzatti GC, Duchini PG, Sbrissia AF, Ribeiro-Filho HMN. 2015. Aspectos qualitativos e produção de biomassa em pastos de aveia e azevém cultivados puros ou consorciados e submetidos a pastejo leniente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 67 (5): 1399–1407. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8103>
- Hamilton SA, Kallenbach RL, Bishop-Hurley GJ, Roberts CA. 2013. Stubble height management changes the productivity of perennial ryegrass and tall fescue pastures. *Agronomy Journal* 105 (3): 557–562. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0293>
- Lemaire G, Belanger G. 2020. Allometries in plants as drivers of forage nutritive value: a review. *Agriculture* 10 (1): 5. <https://doi.org/10.3390/agriculture10010005>
- Lithourgidis AS, Vasilakoglou IB, Dhima KV, Dordas CA, Yiakoulaki MD. 2006. Forage yield and quality of common vetch mixtures with oat and triticale in two seeding ratios. *Field Crops Research* 99 (2-3): 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.03.008>
- Lüscher A, Mueller-Harvey I, Soussana JF, Rees RM, Peyraud JL. 2014. Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science* 69 (2): 206–228. <https://doi.org/10.1111/gfs.12124>
- Martins CDM, Schmitt D, Duchini PG, Miqueloto T, Sbrissia AF. 2021. Defoliation intensity and leaf area index recovery in defoliated swards: implications for forage accumulation. *Scientia Agricola* 78 (2). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0095>
- Molla EA, Wondimagegn BA, Chekol YM. 2018. Evaluation of biomass yield and nutritional quality of oats–vetch mixtures at different harvesting stage under residual moisture in Fogera District, Ethiopia. *Agriculture and Food Security* 7: 88. <https://doi.org/10.1186/s40066-018-0240-y>
- Puzynska K, Puzynski S, Synowiec A, Bocianowski J, Lepiarczyk A. 2021. Grain yield and total protein content of organically grown oats–vetch mixtures depending on soil type and oats' cultivar. *Agriculture* 11 (1): 79. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010079>
- Quiroz-Pérez JC, Améndola-Massiotti RD, Zaragoza-Ramírez JL, Ortiz-Moreno O. 2016. Consumo aparente de forraje de *Avena strigosa* y *Vicia* spp. con riego, bajo pastoreo invernal en el centro de México (PP116. Producción y utilización de pasturas). *Revista Argentina de Producción Animal* 36 (Supl.1): 410. <https://www.aapa.org.ar/rapa/36/Vol36Supl1.pdf> (Recuperado: septiembre 2022).
- Ramírez-Ordóñez S, Domínguez-Díaz D, Salmerón-Zamora JJ, Villalobos-Villalobos G, Ortega-Gutiérrez JA. 2013. Producción y calidad del forraje de variedades de avena en función del sistema de siembra y de la etapa de madurez al corte. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (4): 395–403. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/36-4/4r.pdf> (Recuperado: mayo 2022).
- Salgado P, Thang VQ, Thu TV, Trach NX, Cuong VC, Lecomte P, Richard D. 2013. Oats (*Avena strigosa*) as winter forage for dairy cows in Vietnam: an on-farm study. *Tropical Animal Health and Production* 45: 561–568. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0260-8>

- Sánchez Gutiérrez RA, Gutiérrez B H, Serna P A, Gutiérrez L R, Espinoza C A. 2014. Producción y calidad de forraje de variedades de avena en condiciones de temporal en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 5 (2): 131–142.
- Solomon JKQ, Macoon B, Lang DJ. 2017. Harvest management based on leaf stage of a tetraploid vs. a diploid cultivar of annual ryegrass. *Grass and Forage Science* 72 (4): 743–756. <https://doi.org/10.1111/gfs.12313>
- Sulc RM, Arnold AM, Cassida KA, Albrecht KA, Hall MH, Min D, Xu X, Undersander DJ, van Santen E. 2020. Changes in forage nutritive value of reduced-lignin alfalfa during regrowth. *Crop Science* 61 (2): 1478–1487. <https://doi.org/10.1002/csc2.20366>
- Tuna C, Orak A. 2007. The role of intercropping on yield potential of common vetch (*Vicia sativa* L.)/oat (*Avena sativa* L.) cultivated in pure stand and mixtures. *Journal of Agricultural and Biological Science* 2 (2): 14–19.

Agrociencia

EFFECT OF *Lemna gibba* AND *Ulva lactuca* ON HEALTH AND PRODUCTIVE PERFORMANCE IN JUVENILES OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Cinthya Magaly Antonio-Cisneros¹, César Mateo Flores-Ortíz², Martha Elena Aguilera-Morales^{1*}

¹ Universidad del Papaloapan. Instituto de Agroingenierías. Av. Ferrocarril S/N, Ciudad Universitaria, Centro, Loma Bonita, Oaxaca, México. C. P. 68400.

² Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. de los Barrios No.1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C. P. 54090.

* Author for correspondence: aguilena02@hotmail.com

ABSTRACT

Currently, mannan-oligosaccharides (MOS) are added to the production costs of Nile tilapia to prevent and avoid diseases. An alternative are aquatic plants rich in biologically active compounds such as *Lemna gibba*, a freshwater macrophyte, and *Ulva lactuca*, a green seaweed, which have shown productive and economic efficiency as feed for livestock, poultry, and fish, but their effect as a functional ingredient has not been evaluated. The objective was to demonstrate that dietary supplementation of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *L. gibba* and *U. lactuca* can have a beneficial effect on the health and productive performance of tilapia allowing to consider these supplements as functional ingredients such as mannan-oligosaccharides (MOS). The base diet was supplemented with *L. gibba* and *U. lactuca* at percentages 0, 10, 15 and 20 % (L0, L10, L15, L20; U0, U10, U15, U20; M0, M10, M15, M20) and compared to a mannan-oligosaccharide (MOS) control. Health parameters (hematological study, lysozyme and complement C3 activities) and productive performance (survival, S; final weight, FW; protein efficiency ratio, PER, and feed conversion factor, FCF) were evaluated. Statistical difference was found ($p \leq 0.05$) among treatments and supplementation percentages. The U20 diet showed the greatest effect ($p \leq 0.05$) on health parameters and L15 showed the best results ($p \leq 0.05$) in productive performance. It is concluded that *U. lactuca* and *L. gibba* can be used as a functional ingredient at a proportion of 15 % to produce feed for Nile tilapia juveniles in order to promote health and growth.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, functional ingredient, health.

INTRODUCTION

Nile tilapia is a strategic species for food security (FAO, 2019) that may contribute to meeting food demand, one of the consequences of population increase and climate change in developing countries. One of the limiting factors in tilapia production and cause of large economic losses is mortality associated with diseases and ineffectiveness of the current methods used (El-Sayed, 2020). It is advisable to abandon traditional practices and prohibit the use of antibiotics that generate bacterial resistance in fish

Citation: Antonio-Cisneros CM, Flores-Ortíz CM, Aguilera-Morales MA. 2022. Efecto de *Lemna gibba* y *Ulva lactuca* sobre la salud y desempeño productivo en juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Agrociencia*. 56(6): 1077-1103. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2497>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: February 22, 2022.
Approved: September 11, 2022.
Published in Agrociencia:
September 29, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



and their consumers, in addition to contaminating the water and sediment. Therefore, available, and economically feasible alternatives are required.

One of the supplements, which adds to production costs as a multifunctional supplement, is mannan-oligosaccharides (MOS) (Yuji-Sado *et al.*, 2015). Aquatic plants can be an alternative to supplements because in their natural environments they synthesize biologically active compounds to tolerate adverse environmental conditions and as defense against predators. The chemical composition and number of compounds synthesized by aquatic plants vary depending on the species, genetics, habitat, environmental conditions, exposure to solar radiation, among others (Hentati *et al.*, 2020).

Among them *Lemna gibba*, a small freshwater macrophyte plant that shows accelerated growth in temperate and tropical water pools, because of its nutritional content it has been recommended for animal feed (El-Shafai *et al.*, 2004). Another is *Ulva lactuca*, a green seaweed that is abundant on tropical coasts in warm months (Hentati *et al.*, 2020). Both plants have been studied in livestock, poultry and fish feed with satisfactory productive results and economic efficiency (Tirado-Estrada *et al.*, 2018) but have not been evaluated in farmed tilapia as an ingredient or functional feed. That is, as a natural food that in addition to being nutritious contains biologically active components that provide some beneficial effect on health and reduce the risk of contracting bacterial, fungal, or viral diseases (Beltrán de Heredia, 2016).

The possibility of sustaining the use of these aquatic plants as a functional food supplement can contribute to improve production practices. Based on the mannan-oligosaccharides (MOS) have been used to improve weight gain, serum lysozyme concentration which boosts the immune system and to prevent the adhesion of pathogenic bacteria in the intestine which promotes optimal absorption of nutrients for proper growth (Yuji-Sado *et al.*, 2015). It is assumed that the study may contribute to improve production practices through the natural use of aquatic plants, towards sustainability, disease prevention and improvement in the physiological condition of tilapia. Therefore, the objective of this study was to demonstrate that dietary supplementation of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Lemna gibba* and *Ulva lactuca* can have a beneficial effect on the health and productive performance of tilapia, allowing to consider these supplements as functional ingredients such as mannan-oligosaccharides (MOS).

MATERIALS AND METHODS

Aquatic plants, origin, and processing

Ulva lactuca was collected in the state of Veracruz-Llave at the beaches “Norte” and “Gaviotas”. *Lemna gibba* was collected at “Plan de pájaros” and “Buena vista” lakes in the municipality of Loma Bonita, Oaxaca, both during July-August 2020. The aquatic plants were washed with well water under running water. Subsequently, they were put to dry in the sun with constant turning on cloth and a mesh. A sample of each aquatic plant was taken at tearing point and then dried in an oven at 45 °C for 3 hours. Finally, each of the plants were ground. *U. lactuca* with a conventional blender and *L.*

gibba with a mortar and pestle. The grinding was passed through a 0.01 μm diameter sieve to obtain flour.

Fish and experimental conditions

Nile tilapias were purchased from TECNOPEZ S.A. the aquaculture farm, located in the state of Veracruz-Llave, transported, and handled following the guide for the care and use of laboratory animals (NRC, 2011) and the international standards of the Aquatic Animal Health Code (2019) of the World Organization for Animal Health (OIE, for its acronym in French). Juveniles of Nile tilapia ($9.33 \text{ g} \pm 0.20$) were selected for the experiment.

Experimental design

The multifactorial experiment was conducted as a completely randomized block design. Four aquaria were used per treatment, each of 80 L with three replicates in a constant recirculation system. Ten fish were randomly placed in each aquarium. Water quality was daily monitored for temperature, pH and ammonium oxygen demand using a 550 YSI probe. The experiment lasted 60 days. The mathematical model used was:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

where Y_{ij} is the response variable, μ is the overall mean, T_i is the effect of the i -th treatment, β_j is the block effect and ε_{ij} is the effect of experimental error.

Experimental diets

The isoprotein base diet (35 % crude protein) in all treatments for juvenile tilapia was supplemented with *L. gibba* and *U. lactuca* in different percentages (0, 10, 15, 20 %), the treatments were identified as U0, U10, U15, U20 and L0, L10, L15, L20. They were compared with control diets supplemented with a commercial functional ingredient, mannan-oligosaccharides (MOS) (Bio-Mos[®] Alltech) in the same concentrations and labeled as M0, M10, M15, M20; with 0 % as the control in all treatments. The experimental diets and proximate chemical analysis are presented in Table 1. Fish were fed the diets for 5 d *ad libitum* and thereafter the feeding regime was three times a day (8:00, 14:00 and 20:00 h) at 10 % of their biomass for the first 30 days. Subsequently, from day 31 to 60, diets were provided at 8 % of fish biomass in two rations (8:00 and 20:00 h) (Zhou *et al.*, 2010). The weight of the fish in each treatment was recorded every 15 days.

Evaluation of health parameters

Hematological study

Health reference values were determined using the methodology described by Horowitz *et al.* (2010) and Tukey's test, recommended by The Clinical and Laboratory

Table 1. Composition of experimental diets (g kg⁻¹) and proximate chemical analysis.

Experimental diets												
Treatment (%)	0		10		15		20					
Fish flour (60 %)	153		153		153		153					
Soybean flour (44 %)	306		306		306		306					
Maize corn flour (8.5 %)	503		403		353		303					
Fish oil	22		22		22		22					
Vitamins and mineral premix [†]	16		16		16		16					
<i>L. gibba</i> or <i>U. Lactuca</i>	0		100		150		200					
MOS	0		1		1.5		2					

Proximate chemical analysis (DB)												
	L0	L10	L15	L20	U0	010	U15	U20	M0	M10	M15	M20
DM	87.4	87.6	87.4	87.5	87.5	87.4	87.4	87.6	87.4	87.5	87.5	87.4
CP	35.3	36.4	37.2	38.4	35.2	36.7	37.5	39.2	35.3	35.4	35.3	35.2
EE	2.6	2.9	3.2	3.7	3.5	3.1	3.4	3.9	2.6	2.3	2.6	2.5
CF	4.7	4.9	5.1	5.3	4.6	4.9	5.2	5.3	4.6	4.6	4.6	4.6
ASH	28.3	30.1	31.4	32	28.3	30.2	31.6	32.3	28.2	28.3	28.2	28.3
NFE	29	25.7	23.1	20.6	29.2	24.8	24.2	19.2	29.1	29.2	29.1	29.2

[†]Composition of vitamin premix (g kg⁻¹ premix): vitamin A, acetate (20 000 IU g⁻¹) 5; vitamin D3 (850 000 IU g⁻¹) 0.001; DL-alpha-tocopheryl acetate (250 IU g⁻¹) 12; menadione 2. 4; thiamine-HCl 2.5; riboflavin (B2) 5; pyridoxine-HCl (B6) 4; DL Ca pantothenate 0.012; nicotinic acid 0.024; biotin 0.048; inositol 0.4; vitamin B12 4.8; folic acid 1.2; cellulose 962.62. Composition of mineral premix (g kg⁻¹ premix): cobalt chloride 0.04; cupric sulfate pentahydrate 2.5; ferrous sulfate 40; magnesium sulfate heptahydrate 283.98; magnesium sulfate monohydrate 6.5; potassium iodide 0.67; sodium selenite 0.1; zinc sulfate heptahydrate 131.93; cellulose 534.28. DB: dry basis; DM: dry matter; CP: crude protein as nitrogen; EE: ether extract; CF: crude fiber; ASH: ash; NFE: nitrogen free extract.

Standards Institute (CLSI, guide C28-A3), following the technique of Fagbuaro *et al.* (2016). Fifty healthy tilapia fish of different ages (10 - 120 g) fasted for 12 h were used, anesthetized with clove essence (30 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich) and blood samples were taken from the caudal fin (1.5 mL) with a 21G needle in vacutainer BD EDTA K2 (United Kingdom).

Red blood cell count (E) and haematocrit (Hto) were evaluated with a Sysmex XP300 semi-automatic hematology analyzer. Hemoglobin (Hb) levels by photometry, by the cyanide-free method. Erythrocyte indices were calculated using the formulas used by Hahn-von-Hessberg (2014): mean corpuscular volume (MCV)= (haematocrit (%) × 10) /erythrocyte count (×10⁶ mm⁻³); mean corpuscular hemoglobin (MCH)= (hemoglobin (g dL⁻¹) × 10) /erythrocyte count (×10⁶ mm⁻³). Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHgC) = hemoglobin (g dL⁻¹) × 100/ hematocrit (%). Total protein (TP), albumin (Alb), leukocyte count (L) and glucose (G) were obtained according to Oluwalola *et al.* (2020). On days 1, 30 and 60 within the experiment, blood samples were taken from the fish for each treatment in vacutainers with anticoagulant and without anticoagulant,

as described above. Samples without anticoagulant were kept at 4 °C for later use. Samples with anticoagulant were analyzed by hematological study as described.

Lysozyme activity

The methodology applied by Soares *et al.* (2018) was used. Blood samples without anticoagulant were analyzed by commercial lysozyme test (Sigma-Aldrich, LY0100). Blood samples (90 µL) from tilapia were lysed with *Micrococcus lysodeikticus* (lyophilized cells, Sigma-Aldrich Chemical, MO, USA), at a concentration of 0.01 % w/v in reactive buffer and incubated at a temperature of 25 °C at pH 6.24. The change in absorbance at 450 nm of 0.001 per mg protein is equivalent to one unit of lysozyme, which was expressed in µg mL⁻¹.

C3 complement activity

It was determined by commercial kit (SPINREACT-1102094, C3) based on Chen *et al.* (2019). Antibodies from solution (R2) (goat serum, human anti-C3, pH 7.5, sodium azide 0.95 g L⁻¹) were combined with blood samples from tilapia that formed insoluble compounds detected through the change in absorbance at 340 nm equivalent to the concentration of C3 in the sample. A calibration curve was previously performed using the calibrator protein C3 (SPINREAC 1102004) as standard and NaCl (9 g L⁻¹) as diluent at concentrations 0.1, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.

Productive performance

With the fortnight records of weight and feed provided to the fish, the parameters of productive performance were determined using the formulas used by Abdel-Wahab *et al.* (2016): Weight gain (WG) = final weight (g) - initial weight (g), survival (S) = 100 * (final number ÷ initial number), feed conversion factor (FCF) = feed ingested (g) ÷ weight gained (g) and protein efficiency ratio (PER) = weight gain ÷ protein consumed.

Statistical analysis

Hematologic values were analyzed with Student's *t*-test ($p \leq 0.05$) and the relationship between hematologic indices was tested by simple correlation analysis. Values obtained for lysozyme activity, C3 activity and productive performance were analyzed by one-way ANOVA ($p \leq 0.05$) and differences between treatments were analyzed post hoc with Tukey through IBM SPSS Modeler 17.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Water quality in all treatments remained within desirable intervals for Nile tilapia according to El-Sayed (2020). The values of the variables monitored in the water showed no significant differences ($p \leq 0.05$) in any of the parameters temperature 27.4 ± 1.14 °C, pH 7.11 ± 0.32 nor oxygen demand 6.9 mg L⁻¹

Evaluation of health parameters

Hematological study

Although tilapia is farmed worldwide, in Latin America reports on hematological parameters for healthy tilapia are scarce (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011), so they were determined in this study (Table 2). There were significant differences ($p \leq 0.05$)

Table 2. Hematological study and their reference intervals of juvenile Nile tilapia fed the different experimental diets.

	M0	M10	M15	M20	Reference interval
E (mm ³)	1.3 ± 0.03b	1.5 ± 0.06b	1.7 ± 0.05a	1.7 ± 0.03a	1.1 – 1.8
Hb (g dL ⁻¹)	4.6 ± 0.03d	5.7 ± 0.05c	6.8 ± 0.02b	7.9 ± 0.05a	3.3 – 7.7
Hto (%)	12.7 ± 0.03d	14.6 ± 0.03c	17.3 ± 0.03b	18.4 ± 0.04a	11.0 – 19.0
MCV (fL)	90.0 ± 0.05d	93.0 ± 0.07c	96.0 ± 0.04b	102.0 ± 0.05a	76.5 – 104
MCH (pg)	28.5 ± 0.05c	31.2 ± 0.07b	33.3 ± 0.05b	35.1 ± 0.05a	22.5 – 37.5
MCHgC (g dL ⁻¹)	28.2 ± 0.08d	29.5 ± 0.05c	31.6 ± 0.08b	33.5 ± 0.07a	27.1 – 33
L (mm ³)	5150 ± 0.05d	6200 ± 0.05c	6600 ± 0.02b	6750 ± 0.04a	4000 – 6900
TP (g L ⁻¹)	4.5 ± 0.09d	5.9 ± 0.05c	6.3 ± 0.05b	7.4 ± 0.03a	3.4 – 7.9
ALB (g L ⁻¹)	2.3 ± 0.05d	2.7 ± 0.05c	3.1 ± 0.5b	4.0 ± 0.06a	2.2 – 5.0
G (mg L ⁻¹)	55.0 ± 0.03a	54.0 ± 0.03a	55.0 ± 0.03a	56.0 ± 0.02a	47.0 – 59.0

	U0	U10	U15	U20
E (mm ³)	1.3 ± 0.05c	1.4 ± 0.03c	1.5 ± 0.03b	1.6 ± 0.03a
Hb (g dL ⁻¹)	4.6 ± 0.03d	4.8 ± 0.05c	5.6 ± 0.05b	6.9 ± 0.02a
Hto (%)	11.9 ± 0.03d	13.6 ± 0.02c	15.6 ± 0.04b	17.10 ± 0.03a
MCV (fL)	89.3 ± 0.04d	91.5 ± 0.05c	94.2 ± 0.05b	98.4 ± 0.07a
HCM (pg)	28.4 ± 0.03d	29.6 ± 0.04c	31.3 ± 0.04b	33.8 ± 0.04a
MCHgC (g dL ⁻¹)	29.0 ± 0.9c	29.3 ± 0.50c	29.8 ± 0.04b	32.7 ± 0.08a
L (mm ³)	5200 ± 0.07d	5850 ± 0.04c	6100 ± 0.06b	6300 ± 0.05a
TP (g L ⁻¹)	4.4 ± 0.03c	4.5 ± 0.03c	5.2 ± 0.05b	6.3 ± 0.05a
ALB (g L ⁻¹)	2.4 ± 0.05c	3.1 ± 0.05b	3.7 ± 0.04a	4.3 ± 0.04a
G (mg L ⁻¹)	55.0 ± 0.04a	55.0 ± 0.04a	56.0 ± 0.03a	55.0 ± 0.03a

	L0	L10	L15	L20
E (mm ³)	1.3 ± 0.03b	1.3 ± 0.05b	1.4 ± 0.03a	1.4 ± 0.02a
Hb (g dL ⁻¹)	4.5 ± 0.02c	4.6 ± 0.02c	5.0 ± 0.05b	5.8 ± 0.02a
Hto (%)	12.0 ± 0.03c	14.1 ± 0.06b	14.6 ± 0.06 b	16.5 ± 0.02a
MCV (fL)	90.1 ± 0.03d	91.5 ± 0.05c	93.5 ± 0.05b	96.2 ± 0.08a
MCH (pg)	28.1 ± 0.06c	28.4 ± 0.03c	30.6 ± 0.04b	31.7 ± 0.06a
MCHgC (g dL ⁻¹)	28.4 ± 0.04d	29.1 ± 0.06c	29.9 ± 0.05b	31.3 ± 0.05a
L (mm ³)	4975 ± 0.06c	5100 ± 0.05b	5800 ± 0.05a	5900 ± 0.06a
TP (g L ⁻¹)	4.6 ± 0.05c	4.8 ± 0.02c	5.3 ± 0.06b	6.0 ± 0.05a
ALB (g L ⁻¹)	2.3 ± 0.04d	3.4 ± 0.05c	3.7 ± 0.05b	4.2 ± 0.05a
G (mg L ⁻¹)	56.0 ± 0.03a	55.0 ± 0.03a	55.0 ± 0.03a	56.0 ± 0.03a

± is the standard deviation (n=3). Mean values with different superscript in the same row are significant ($p \leq 0.05$). E: erythrocytes, Hb: hemoglobin, Hto: haematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoblobin, MCHgC: mean corpuscular hemoglobin concentration, L: leukocytes, TP: total proteins, ALB: albumin, G: glucose.

between treatments and different percentages of supplementation. Values increased as a function of the percentage of supplementation in all treatments. As expected, the values of the MOS controls were higher, M20 (E 1.7 mm³, Hb 7.9 g dL⁻¹, Hto 18.4%, MCV 102 fl, MCH 35.1 pg, MCHgC 33.5 g dL⁻¹, L 6750 mm³, TP 7.4 g L⁻¹, ALB 4.0 g L⁻¹, G 56 mg L⁻¹) followed by U20 and L20 (E 1.6 and 1.4 mm³, Hb 6.9 and 5.8 g dL⁻¹, Hto 17.10 and 16.5%, MCV 98.4 and 96.2 Fl, MCH 33.8 and 31.7 pg, MCHgC 32.7 and 31.3 g dL⁻¹, L 6300 and 5900 mm³, TP 6.3 and 6.0 g L⁻¹, ALB 4.3 and 4.2 g L⁻¹, G 55 and 56 mg L⁻¹, respectively) (Table 2) (Table 2). The values of the hematological parameters were within the reference interval, which meant that the treatments used did not affect the health of the fish; it stimulated the production of E and with it the production of Hb, promoting optimal oxygenation in the blood and the utilization of the nutrients in the diet. Except for the Hb value of the M20 diet, above the reference interval. Hernández *et al.* (2020) explain that because Es contain Hb (oxygen transport protein in the blood), higher levels indicate oxygen deficiency in the blood and problems in the assimilation of nutrients from food. The Hb results differ from those reported by Bittencourt *et al.* (2003) (10.5 g dL⁻¹) and Reda *et al.* (2016) (5.4 g dL⁻¹) for *O. niloticus*. El-Hawarry (2012) and Oluwalola *et al.* (2020) that blood differences occur as a function of the physiological state of the fish, their origin, water quality factors and study treatments. E, Hb and Hto had a proportional correspondence with the erythrocyte indices MCV (size), MCH (mean hemoglobin load) and MCHgC (hemoglobin color) indicating that there were no alterations and are within the health levels reported by Fagbuaro *et al.* (2016). The Hto was 3 times the Hb concentration, coinciding with that referred by El-Hawarry (2012). The production of L was promoted by both MOS and *L. gibba* and *U. Lactuca* as a function of the increase of supplementation in the experimental diets without causing affectations since all values were within the reference interval. According to Oluwalola *et al.* (2020) leukocytes participate in immune responses by fighting foreign agents. Hahn-Von-Hessberg *et al.* (2011) and Hernández *et al.* (2020) noted that leukocyte values differed in each study due to the environmental and methodological conditions of each investigation. The TP values (albumin, liver protein and globulin) were within the reference interval. They did not differ among treatments (MOS, U and L) (Table 2), however, significant differences ($p \leq 0.05$) were found in TP levels, the higher the percentage of inclusion in the experimental diets.

The above indicates that the use of these supplements in the feeding of juvenile Nile tilapia can reduce liver and nutritional problems (Fagbuaro *et al.*, 2016). Levels outside the reference interval are associated with infections, nutritional deficiencies, and stress (Reda *et al.*, 2016 and Oluwalola *et al.*, 2020). It is worth mentioning that TP influence positively or negatively depending on its value on G levels, since proteins are the main source of energy and play an important role in the maintenance of blood glucose (Yildirim *et al.*, 2009 and Oluwalola *et al.*, 2020). The ALB and G values in the treatments of this study were different from those obtained by Fagbuaro *et al.* (2016) although they were within the reference interval, indicating that the nutrients in the experimental diets were satisfactorily absorbed and that the diets had a satisfactory

amount of protein for the fish (El-Hawarry, 2012). Hernández *et al.* (2020) and Onyia *et al.* (2015) indicated that serum biochemistry in fish can be influenced by several factors such as water temperature, feed, fish age, sex, genetics, treatments, and captivity conditions.

Lysozyme activity and complement C3 activity

Lysozyme in fish is an indicator of non-specific immune functions, functions as an opsonin and activator of the complement system and phagocytosis (Cerezuela *et al.*, 2012). The complement system is a component of the immune system consisting of numerous proteins and all pathways generate factor C3, which is responsible for regulating the nonspecific and adaptive immune response (Chen *et al.*, 2019). Lysozyme and C3 activities increased proportionally to tilapia growth, percentage of supplementation and elapsed days of experimentation; thus, they were more evident at day 60 in all treatments, although with significant differences ($p \leq 0.05$). Activities were higher in U20 (269 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme and 122 mg dL^{-1} , respectively) than in L20 (256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme and 116 mg dL^{-1} , respectively) but not regarding the control M20 (310 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 139 mg dL^{-1} , respectively) (Figures 1 and 2). Considering the value of M20 as 100 % maximum effect on lysozyme and C3 activity, it was observed that with the U20 diet fish reached 86 and 88% of the maximum effect, and with the L20 diet, 82 and 83 % respectively.

The behavior of the *U. lactuca* and *L. gibba* treatments was similar to the MOS control, with an increase in lysozyme and complement C3 activities that influenced hematological parameters, mainly leukocytes. Results were similar to those obtained by Soares *et al.* (2018) who with 0.2 and 0.4 % Glucan MOS in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) obtained an increase in leukocyte respiratory burst and lysozyme.

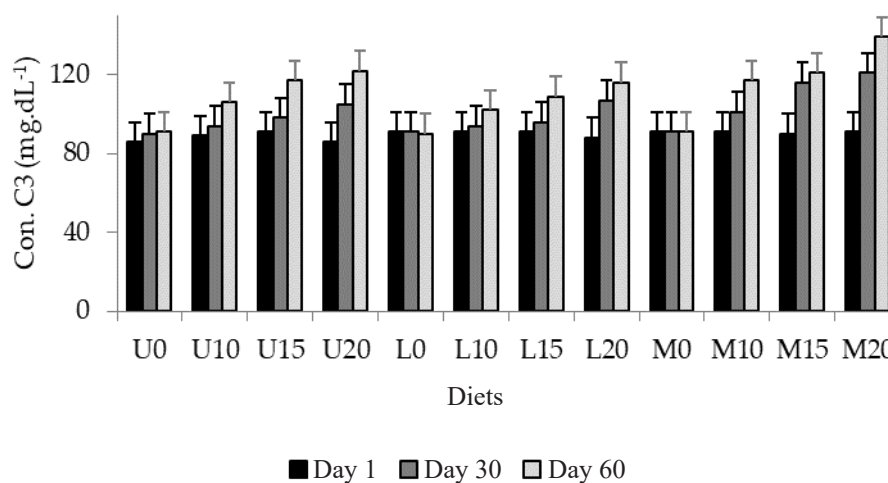


Figure 1. Comparison of complement C3 activity corresponding to experimental diets and days elapsed.

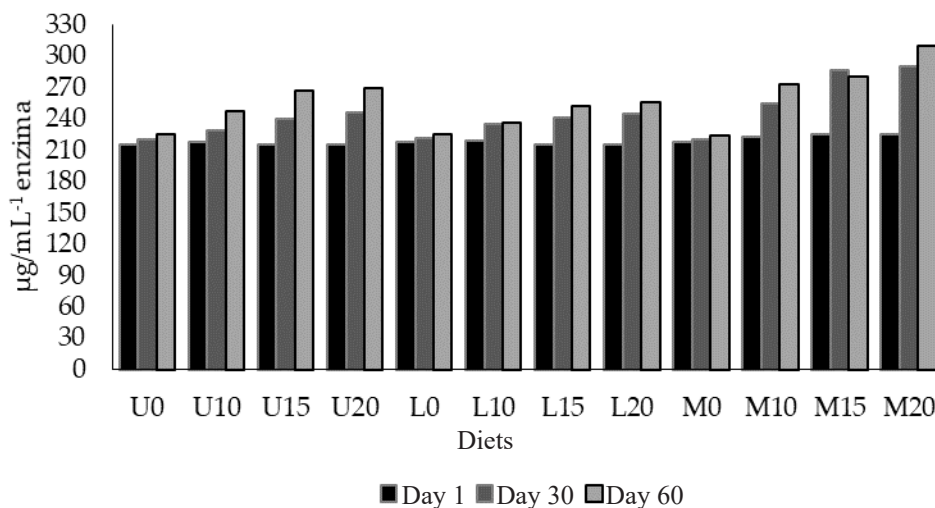


Figure 2. Comparison of lysozyme concentration corresponding to experimental diets and days elapsed.

The results obtained are in the interval obtained by Cerezuela *et al.* (2012) who used microalgae and demonstrated improvements in the immune response of fish. Those authors explained that lysozyme activity varies with age, fish size, water quality and degree of exposure to treatments.

Lin *et al.* (2011) demonstrated increased lysozyme activity and phagocytosis with MOS in *Cyprinus carpio*. The promotion of lysozyme and complement C3 activities may be related to the composition of aquatic plants rich in polysaccharides and antioxidants in their cell walls. *U. lactuca* contains ulvans, sulfated polysaccharides associated with immunomodulatory, antibacterial and antifungal functions among others (Hentati *et al.*, 2020). Whereas the genus *Lemna* contains a wide variety of galacturonan polysaccharides, proteins and phenolic compounds (Zhao *et al.*, 2014). There was a directly proportional relationship of complement C3 activity with leukocytes, it may be that these are stimulated by polysaccharides in both aquatic plants. Chen *et al.* (2019) referred that leukocytes form the first line of defense, an anti-attack complex against foreign bodies by activating complement C3.

Productive performance

Diets supplemented with *L. gibba* and *U. lactuca* were highly accepted by the Nile tilapia fish, Yildirim *et al.* (2009) reported that it is probably because of their odor and succulent taste. The mean final weight of fish fed the diets supplemented with *L. gibba* and *U. lactuca* was significantly higher ($p \leq 0.05$) than their controls (L0 and U10, respectively) and the MOS control diets. The L15 diet presented the best productive performance values (FP 131 g, PER 3.08 and FCF 1.5) followed by the U15 diet (127 g, 3.11 and 1.78, respectively) and the M15 control (112 g, 270 and 1.6, respectively). In

all treatments, survival was 100 % (Table 3) Although the U20 diet gave the best health results at the cellular and humoral levels, growth was negatively affected. Abdel-Wahab *et al.* (2016) explained that the decrease in growth at high levels of *Ulva* meal (30 %) could be due to the high fiber content and its possible effects on protein and dry matter digestibility. The variation in chemical constituents of aquatic plants such as *U. lactuca* is influenced by the environment in which they are found (Suryaningrum and Samsudin, 2020).

The diets with MOS had no effect on fish growth, which is in agreement with that reported by Soares *et al.* (2018), who explained that the effect of MOS on growth in fish depends on the species to which it is supplied, the time of application and the temperature of the environment. The better productive performance of L15 was partly due to the contribution of protein and amino acids from aquatic plants, mainly growth-promoting lysine, and methionine (Yildirim *et al.*, 2009; Aguilera *et al.*, 2018) (Table 4). Protein from both *L. gibba* and *U. lactuca* was used as an energy source for growth. *L. gibba* has shown to contribute to the growth of several fish species when part of the fish meal is substituted (El-Sayed, 2019). González *et al.* (2013) reported increased growth of tilapia fry when 12 % *Lemna trinervis* was included in the diet. El-Shafai *et al.* (2004) replaced 20 to 40 % of fish meal with *Lemna minor* meal in fresh and dehydrated form, both of which favored growth, PER and the best FCF (1.4) in tilapia. *U. lactuca* has also shown to promote growth when included at 20 to 30 % in the diet of African catfish *Clarias gariepinus* (Abdel-Wahab *et al.*, 2016) and at 5 and 10 % in juvenile fish *Scatophagus argus* (Yangthong and Ruensirikul, 2020). In tilapia diet it has been included at 10 %, although inclusion up to 20 % is suggested, with satisfactory

Table 3. Comparison of zootechnical parameters of juvenile Nile tilapia fed with the experimental diets (mannan-oligosaccharides, *Ulva lactuca* and *Lemna gibba*) at different percentages of supplementation (0, 10,15 and 20).

	IP(g)	FW (g)	S (%)	PER	FCF
M0	9.37 ± 0.25	104.03 ± 1.50c	100	2.71 ± 0.04c	1.42 ± 0.03c
M10	9.43 ± 0.31	110.17 ± 1.02b	100	2.88 ± 0.03b	1.45 ± 0.05c
M15	9.43 ± 0.32	113.77 ± 1.56b	100	2.98 ± 0.04b	1.55 ± 0.05b
M20	9.40 ± 0.20	119.37 ± 2.15a	100	3.14 ± 0.06a	1.60 ± 0.06a
U0	9.37 ± 0.25	103.03 ± 1.56c	100	2.68 ± 0.04c	1.42 ± 0.03a
U10	9.37 ± 0.23	111.97 ± 2.63b	100	2.93 ± 0.08b	1.52 ± 0.05b
U15	9.30 ± 0.20	127.03 ± 1.72a	100	3.36 ± 0.05a	1.38 ± 0.03b
U20	9.40 ± 0.10	123.93 ± 2.70a	100	3.27 ± 0.08a	1.64 ± 0.02b
L0	9.33 ± 0.12	104.37 ± 1.98c	100	2.71 ± 0.05c	1.42 ± 0.03a
L10	9.23 ± 0.15	110.33 ± 1.66b	100	2.89 ± 0.05b	1.52 ± 0.02b
L15	9.33 ± 0.25	104.37 ± 1.98c	100	2.72 ± 0.05c	1.40 ± 0.02c
L20	9.40 ± 0.17	117.83 ± 1.31a	100	2.95 ± 0.05a	1.59 ± 0.05c

± is the standard deviation (n=3). Mean values with the same level of supplementation and different superscript in the same column are significant ($p \leq 0.05$). IW: initial weight; FW: final average weight; S: survival; PER: protein efficiency ratio; FCF: feed conversion factor.

Table 4. Chemical composition (dry basis) and amino acids present in *Ulva lactuca* and *Lemna gibba*.

Component	<i>Lemna gibba</i>	<i>Ulva lactuca</i>
Ash (%)	20.10	33.07
Crude protein %	21.5	17.2
Lipids %	4.45	1.7
Nitrogen free extract %	32.4	38.34
Amino acids composition		
Arginine	0.003	0.004
Histidine	0.001	0.001
Isoleucine	1.569	4.57
Leucine	0.003	9.33
Lysine	22.33	9.24
Methionine	8.57	5.92
Threonine	0.21	4.76
Valine	2.23	4.01
Alanine	27.80	9.77
Glycine	1.76	6.11

(Aguilera *et al.*, 2018).

results in growth, feed utilization and survival rate (Suryaningrum and Samsudin, 2020).

CONCLUSIONS

All diets supplemented with *Lemna gibba* and *Ulva lactuca* showed an effect on the cellular (hematological study) and humoral parameters evaluated (lysozyme and complement C3 activity), in regard to the control diets (L0 and U0). However, statistically the effect was greater in L20 and U20. According to the hematological study, *U. lactuca* and *L. gibba* contributed to improved oxygen transport in the blood, increased leukocyte, increased lysozyme and C3 activity, without affecting the nutritional quality of the diet or affecting the health of the fish. The U20 diet showed the greatest significant effect on health parameters and L15 showed the best results on production.

U. lactuca and *L. gibba* can be used as a functional ingredient in a proportion of 15 % for the production of Nile tilapia juvenile feed, with favorable effects on health and growth. *U. lactuca* can be included in the diet of juvenile tilapia up to 20 %, because it favors a higher activity of lysozyme and C3 complement, after verifying the content of *Ulva* fiber since it varies according to its habitat and can promote negative growth.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) for the economic resources provided and to the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), the Universidad del Papaloapan and their technicians team for the facilities provided during the development of this research.

REFERENCES

- Abdel-Wahab AAW, El-Sayed MIY, Nasser AA. 2016. Potential use of green macroalgae *Ulva lactuca* as a feed supplement in diets on growth performance, feed utilization and body composition of the African catfish, *Clarias gariepinus*. Saudi Journal of Biological Sciences 23 (3): 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.11.010>
- Aguilera Morales ME, Canales Martínez M, Ávila González E, Flores Ortiz CM. 2018. Nutrients and bioactive compounds of the *Lemna gibba* and *Ulva lactuca* as possible ingredients to functional foods. Latin American Journal of Aquatic Research 46 (4): 709–716. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-8>
- Beltrán de Heredia, MR. 2016. Alimentos funcionales. Farmacia profesional 30 (2): 12–14.
- Bittencourt NL, Molinari LM, Scoaris DO, Pedroso RB, Nakamura CV, Nakamura TU, Filho BA, Filho BP. 2003. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. Acta Scientiarum: Biological Sciences 25 (2): 385–38.
- Cerezuela R, Guardiola FA, Meseguer J, Esteban MA. 2012. Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae: effects on the immune system. Fish Physiology Biochemical 38 (6): 1729–1739. <https://dx.doi.org/10.1007/s10695-012-9670-9>
- Chen DD, Li JH, Yao YY, Zhang YA. 2019. *Aeromonas hydrophila* suppresses complement pathways via degradation of complement C3 in bony fish by metalloprotease. Fish and Shellfish Immunology 94: 739–745. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.057>
- Código Sanitario para Animales Acuáticos. 2019. Organización mundial de sanidad animal (OIE). <https://www.oie.int/es/normas/codigo-acuatico/acceso-en-linea/> (Recuperado: diciembre 2021).
- El-Hawarry WN. 2012. Biochemical and non-specific immune parameters of healthy Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their interspecific hybrid (male *O. aureus* × female *O. niloticus*) maintained in semi-intensive culture system. Online Journal of Animal and Feed Research 2 (1): 84–88.
- El-Sayed A-F M. 2020. Tilapia Culture. 2nd Edition. Academic Press: Oxfordshire, U.K. 348 p. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-04085-5>
- El-Shafai SA, El-Gohary FA, Verreth JAJ, Schrama JW, Gijzen HJ. 2004. Apparent digestibility coefficient of duckweed (*Lemna minor*), fresh and dry for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture Research 35 (6): 574–586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01055.x>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2019. Contribución de la acuicultura a la erradicación del hambre, la obtención de suministros alimentarios y la promoción de buenas prácticas higiénicas y dietéticas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Comité de pesca, subcomité de acuicultura. Trondheim (Noruega). COFI:AQ/X/2019/6/Rev.1. 18 p. <http://www.fao.org/3/na220es/na220es.pdf> (Recuperado: septiembre 2021).
- Fagbuaro O, Oladimeji IA, Adeyinka FA. 2016. Hematological and serum biochemical profile of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* from Ero dam in Ikun Ekiti, Ekiti state Nigeria. American Journal of Research Communication 4 (4): 192–205. http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2016/04/Fagbuaro_Vol44.pdf [ISSN: 2325-4076] (Recuperado: noviembre 2021).
- González S R, Romero C O, Valdivié N M, Ponce P J. 2013. Lenteja de agua una opción en dietas para tilapia roja. Revista AquaTIC 38: 85–93.
- Hahn-von-Hessberg C, Grajales-Quintero A, Gutiérrez-Jaramillo AV. 2011. Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas. Veterinaria y Zootecnia 5 (1): 47–61.
- Hentati F, Tounsi L, Djomdi D, Pierre G, Delattre C, Ursu AV, Fendri I, Abdelkafi S, Michaud P. 2020. Bioactive polysaccharides from seaweeds. Molecules 25 (14): 3152. <https://doi.org/10.3390/molecules25143152>
- Hernández C, Olmeda-Guerrero L, Chávez-Sánchez MC, Ibarra-Castro L, Gaxiola-Cortés G, Martínez-Cárdenas L. 2020. Nutritional evaluation of canola meal as fish meal replacement for juvenile spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*): Effects on growth performance, hematological parameters, body composition, and nutrient digestibility. Animal Feed Science and Technology 269: 114683. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114683>
- Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, Pesce A, Sine HE, Zakowski J. 2010. EP28-A3c: Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical

- Laboratory; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. 3rd Edition. Wayne, PA, USA. 59 p.
- Lin S, Pan Y, Luo L, Luo L. 2011. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* Koi). *Fish and Shellfish Immunology* 31 (6): 788–794. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.013>
- NRC (National Research Council). 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academy Press: Washington, DC, USA. 392 p. <https://doi.org/10.17226/13039>
- Oluwalola OL, Fagbenro OA, Adebayo OT. 2020. Haematological and serum biochemical profiles of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* from different culture enclosures. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 8 (3): 489–493.
- Onyia LU, Diyaware MY, Michael KG, Musa M, Ochokwu IJ. 2015. Comparison of haematological indices, blood group and genotype of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and *Clarias anguillaris* (Linnaeus, 1758). *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 10 (5): 392–399. <https://doi.org/10.3923/jfas.2015.392.399>
- Reda RM, Mahmoud R, Selim KM, El-Araby IE. 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 50: 255–262. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.040>
- Soares MP, Oliveira FC, Cardoso IL, Urbinati EC, Meldau de Campos C, Hisano H. 2018. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 73: 133–140. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.046>
- Suryaningrum LH, Samsudin R. 2020. Nutrient digestibility of green seaweed *Ulva* meal and the influence on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emirates Journal of Food and Agriculture* 32 (7): 488–494. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i7.2131>
- Tirado-Estrada G, Ramos-Mijangos LM, Miranda-Romero LA, Tirado-González DN, M. Salem AZM, Mlambo V, Medina-Cuéllar SE, González-Reyes M, Barababosa P A. 2018. Potential impacts of dietary *Lemna gibba* supplements in a simulated ruminal fermentation system and environmental biogas production. *Journal of Cleaner Production* 181: 555–561. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.120>
- Yangthon M, Ruensirikul J. 2020. Feed intake stimulation of juvenile spotted scat (*Scatophagus argus* Linnaeus, 1766) using dietary seaweed supplementation (*Ulva* sp.). *Aquaculture* 529: 735626. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735626>
- Yildirim Ö, Ergün S, Yaman S, Türker A. 2009. Effects of two seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a feed additive in diets on growth performance, feed utilization, and body composition of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15 (3): 455–460.
- Yuji-Sado R, Raulino-Domanski F, Freitas PF, Baioco-Sales F. 2015. Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). *Latin American Journal of Aquatic Research* 43 (5): 944–952. <https://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-14>
- Zhao X, Moates GK, Wellner N, Collins SRA, Coleman MJ, Waldron KW. 2014. Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). *Carbohydrate Polymers* 111: 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.079>
- Zhou QC, Buentello JA, Gatlin III DM. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309 (1-4): 253–257. <https://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.003>

EFFECTO DE *Lemna gibba* Y *Ulva lactuca* SOBRE LA SALUD Y DESEMPEÑO PRODUCTIVO EN JUVENILES DE TILAPIA DEL NILO (*Oreochromis niloticus*)

Cinthya Magaly **Antonio-Cisneros**¹, César Mateo **Flores-Ortíz**², Martha Elena **Aguilera-Morales**^{1*}

¹ Universidad del Papaloapan. Instituto de Agroingenierías. Av. Ferrocarril S/N, Ciudad Universitaria, Centro, Loma Bonita, Oaxaca, México. C. P. 68400.

² Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. de los Barrios No.1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C. P. 54090.

* Autor para correspondencia: aguilen02@hotmail.com

RESUMEN

Actualmente, los manano-oligosacáridos (MOS) se suman a los costos de producción de la tilapia del Nilo para prevenir y evitar enfermedades. Una alternativa son las plantas acuáticas ricas en compuestos con actividad biológica como *Lemna gibba*, macrofitas de agua dulce y *Ulva lactuca*, alga marina verde, las cuales Figuhan mostraron eficiencia productiva y económica como alimento de ganado, aves y peces, pero no se ha evaluado su efecto como ingrediente funcional. El objetivo fue demostrar que la suplementación de la dieta para juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), suplementada con *L. gibba* y *U. lactuca*, puede tener un efecto benéfico en la salud y el desempeño productivo de la tilapia para considerar estos suplementos ingredientes funcionales como los manano-oligosacáridos (MOS). La dieta base fue suplementada con *L. gibba* y *U. lactuca* en porcentajes 0, 10, 15 y 20 % (L0, L10, L15, L20; U0, U10, U15, U20; M0, M10, M15, M20) y comparada con un testigo de manano-oligosacáridos (MOS). Se evaluaron parámetros de salud (estudio hematológico, actividades de la lisozima y del complemento C3) y desempeño productivo (supervivencia, S; peso final, PF; tasa de eficiencia proteica, TEP y factor de conversión alimenticia, FCA). Se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre tratamientos y porcentajes de suplementación. La dieta U20 mostró el mayor efecto ($p \leq 0.05$) sobre los parámetros de salud y L15 mostró los mejores resultados ($p \leq 0.05$) en producción. Se concluye que *U. lactuca* y *L. gibba* pueden utilizarse como ingrediente funcional en una proporción del 15 % para la elaboración de alimentos de juveniles de tilapia del Nilo para favorecer la salud y el crecimiento.

Palabras clave: *Oreochromis niloticus*, ingrediente funcional, salud.

INTRODUCCIÓN

La tilapia del Nilo es una especie estratégica de seguridad alimenticia (FAO, 2019) que puede contribuir a satisfacer la demanda de alimentos, una de las consecuencias del incremento demográfico y el cambio climático en los países en desarrollo. Uno de los factores limitantes de la producción de tilapia y causa de grandes pérdidas económicas es la mortalidad asociada con enfermedades e ineficacia de los métodos

Citation: Antonio-Cisneros CM, Flores-Ortíz CM, Aguilera-Morales MA. 2022. Efecto de *Lemna gibba* y *Ulva lactuca* sobre la salud y desempeño productivo en juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Agrociencia*. 56(6): 1077-1103. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2497>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: February 22, 2022.
Approved: September 11, 2022.
Published in Agrociencia:
September 29, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



actuales utilizados (El-Sayed, 2020). Lo aconsejable es dejar las prácticas tradicionales y prohibir el uso de antibióticos que generan resistencia bacteriana en los peces y sus consumidores, además de contaminar el agua y el sedimento. Por lo cual se requieren alternativas disponibles y de factibilidad económica.

Uno de los suplementos, que se suma a los costos de producción como complemento multifuncional, son los manano-oligosacáridos (MOS) (Yuji-Sado *et al.*, 2015). Las plantas acuáticas pueden ser una alternativa a los suplementos ya que en sus ambientes naturales sintetizan compuestos con actividad biológica; para tolerar condiciones ambientales adversas y defenderse de sus depredadores. La composición química y cantidad de compuestos que sintetizan las plantas acuáticas varían en función de la especie, genética, hábitat, condiciones ambientales, exposición a radiaciones solares, entre otras (Hentati *et al.*, 2020).

Entre ellas *Lemna gibba*, una pequeña planta macrofita de agua dulce que muestra crecimiento acelerado en las charcas de aguas templadas y tropicales; y por su contenido nutricional se ha recomendado para la alimentación animal (El-Shafai *et al.*, 2004). Otra es *Ulva lactuca*, alga marina verde que abunda en las costas tropicales en los meses cálidos (Hentati *et al.*, 2020). Ambas plantas se han estudiado en la alimentación de ganado, aves y peces con resultados productivos y eficiencia económica satisfactoria (Tirado-Estrada *et al.*, 2018) pero no se han evaluado en la tilapia de cultivo como un ingrediente o alimento funcional. Esto es, como alimento natural que además de ser nutritivo contiene componentes biológicamente activos que aportan algún efecto benéfico sobre la salud y reducen el riesgo de contraer enfermedades de tipo bacteriano, fúngico o viral (Beltrán de Heredia, 2016).

La posibilidad de sustentar el uso de estas plantas acuáticas como complemento alimenticio funcional puede contribuir a mejorar las prácticas de producción. A partir de que los manano-oligosacáridos (MOS) se han utilizado para mejorar la ganancia de peso, la concentración de lisozima del suero que refuerza el sistema inmune y para impedir la adhesión de bacterias patógenas en el intestino lo cual promueve una absorción óptima de los nutrientes para un crecimiento adecuado (Yuji-Sado *et al.*, 2015). Se asume que el estudio contribuirá a mejorar las prácticas de producción por medio del aprovechamiento natural de plantas acuáticas, hacia la sustentabilidad, prevención de enfermedades y mejora en la condición fisiológica de la tilapia. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue demostrar que la suplementación de la dieta para juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) con *Lemna gibba* y *Ulva lactuca* puede tener un efecto benéfico en la salud y el desempeño productivo de la tilapia para considerar estos suplementos ingredientes funcionales como los manano-oligosacáridos (MOS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas acuáticas, procedencia y proceso

Ulva lactuca fue colectada en el Estado de Veracruz, Llave en las playas "Norte" y "Gaviotas". *Lemna gibba* fue colectada en la "laguna plan de pájaros" y "laguna buena vista" en el municipio de Loma Bonita, Oaxaca, ambas durante los meses de julio –

agosto de 2020. Las plantas acuáticas fueron lavadas con agua de pozo a chorro de agua corriente. Después se pusieron a secar al sol con volteos constantes sobre lona y una malla. Se tomó una muestra al cuarteo de cada una de las plantas acuáticas para luego terminarla de secar en horno a 45°C durante 3 horas. Por último, fueron molidas cada una de las plantas; *U. lactuca* con una licuadora convencional y *L. gibba* con ayuda de un mortero. La molienda se pasó por un tamiz de 0.01 µm de diámetro para obtener una harina.

Peces y condiciones experimentales

Las tilapias del Nilo se adquirieron de la granja acuícola TECNOPEZ S.A., ubicada en el Estado de Veracruz Llave, se transportaron y se manejaron de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NRC, 2011) y las normas internacionales del Código Sanitario para Animales Acuáticos (2019) de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés). Para el experimento se seleccionaron juveniles de tilapias del Nilo (9.33 g ± 0.20).

Diseño experimental

El experimento multifactorial se realizó con un diseño de bloques completamente al azar. Se utilizaron por tratamiento cuatro acuarios, cada uno de 80 L con 3 réplicas en un sistema de recirculación constante. En cada acuario se colocaron 10 peces al azar. Se monitoreó diariamente la calidad de agua a través de los parámetros temperatura, pH y demanda de oxígeno amonio por medio de una sonda 550 YSI. El experimento tuvo una duración 60 días. El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

donde Y_{ij} es la variable de respuesta, μ es la media general, T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento, β_j es el efecto del bloque y ε_{ij} es el efecto del error experimental.

Dietas experimentales

La dieta base isoproteínica (35 % proteína cruda) en todos los tratamientos para juveniles de tilapia fue suplementada con *L. gibba* y *U. lactuca* en diferentes porcentajes (0, 10, 15, 20 %), los tratamientos fueron identificados como U0, U10, U15, U20 y L0, L10, L15, L20. Se compararon con dietas testigo suplementadas con un ingrediente funcional comercial, manano-oligosacáridos (MOS) (Bio-Mos® Alltech) en las mismas concentraciones y etiquetados como M0, M10, M15, M20; fue 0 % en todos los tratamientos el control. La composición química aproximada y el análisis de las dietas experimentales se presentan en el Cuadro 1. Los peces fueron alimentados con las dietas durante 5 días *ad libitum* y en días subsecuentes el régimen alimenticio fue tres veces al día (8:00, 14:00 y 20:00 h) al 10 % de su biomasa durante los primeros 30 días. Luego, del día 31 al 60, las dietas se proporcionaron al 8 % de la biomasa de los peces en dos raciones (8:00 y 20:00 h) (Zhou *et al.*, 2010). El peso de los peces de cada tratamiento se registró cada 15 días.

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales (g kg⁻¹) y su análisis químico proximal.

Dietas experimentales												
Tratamiento (%)	0	10	15	20								
Harina de pescado (60 %)	153	153	153	153								
Harina de soya (44 %)	306	306	306	306								
Harina de maíz (8.5 %)	503	403	353	303								
Aceite de pescado	22	22	22	22								
Premezcla de vitaminas y minerales [†]	16	16	16	16								
<i>L. gibba</i> or <i>U. Lactuca</i>	0	100	150	200								
MOS	0	1	1.5	2								
Análisis químico proximal (BS)												
	L0	L10	L15	L20	U0	010	U15	U20	M0	M10	M15	M20
MS	87.4	87.6	87.4	87.5	87.5	87.4	87.4	87.6	87.4	87.5	87.5	87.4
PC	35.3	36.4	37.2	38.4	35.2	36.7	37.5	39.2	35.3	35.4	35.3	35.2
EE	2.6	2.9	3.2	3.7	3.5	3.1	3.4	3.9	2.6	2.3	2.6	2.5
FC	4.7	4.9	5.1	5.3	4.6	4.9	5.2	5.3	4.6	4.6	4.6	4.6
CEN	28.3	30.1	31.4	32	28.3	30.2	31.6	32.3	28.2	28.3	28.2	28.3
ELN	29	25.7	23.1	20.6	29.2	24.8	24.2	19.2	29.1	29.2	29.1	29.2

[†] Composición de la premezcla de vitaminas (g kg⁻¹ premezcla): vitamina A, acetato (20 000 UI g⁻¹) 5; vitamina D3 (850 000 UI g⁻¹) 0.001; DL-alfa-tocoferil acetato (250 UI g⁻¹) 12; menadiona 2.4; tiamina-HCl 2.5; riboflavina (B2) 5; piridoxina-HCl (B6) 4; DL Ca pantotenato 0.012; ácido nicotínico 0.024; biotina 0.048; inositol 0.4; vitamina B12 4.8; ácido fólico 1.2; celulosa 962.62. Composición de la premezcla de minerales (g kg⁻¹ premezcla): cloruro de cobalto 0.04; sulfato cúprico pentahidratado 2.5; sulfato ferroso 40; sulfato de magnesio heptahidratado 283.98; sulfato de magnesio monohidratado 6.5; yoduro de potasio 0.67; selenito de sodio 0.1; sulfato de zinc heptahidratado 131.93; celulosa 534.28. BS: base seca; MS: materia seca; PC: proteína cruda como nitrógeno; EE: extracto etéreo; FC: fibra cruda; CEN: cenizas; ELN: extracto libre de nitrógeno.

Evaluación de los parámetros de salud

Estudio hematológico

Se determinaron valores de referencia de salud por medio de la metodología descrita por Horowitz *et al.* (2010) recomendada por The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, guía C28-A3), con la técnica de Fagbuaro *et al.* (2016). Se utilizaron 50 tilapias sanas de distintas edades (10 - 120 g) en ayuno de 12 h, anestesiadas con esencia de clavo (30 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich) y se tomaron muestras de sangre de la aleta caudal (1.5 mL) con una aguja 21G en Vacutainer BD EDTA K2 (Reino Unido).

El recuento de glóbulos rojos (E) y hematocrito (Hto) se evaluaron con un analizador hematológico semiautomático XP300 Sysmex. Los niveles de hemoglobina (Hb) por fotometría, por el método libre del cianuro. Los índices eritrocitarios se calcularon por medio de las fórmulas utilizadas por Hahn-von-Hessberg (2014): volumen corpuscular medio (VCM)= (hematocrito (%) x 10) /recuento eritrocitario (x10⁶ mm⁻³), hemoglobina corpuscular media (HCM)= (hemoglobina (g dL⁻¹) x 10) /Recuento eritrocitario

($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$). Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHgCM)= hemoglobina (g dL^{-1}) $\times 100$ / hematocrito (%). Las proteínas totales (PT), albúmina (Alb), recuento de leucocitos (L) y glucosa (G) fueron obtenidos de acuerdo con Oluwalola *et al.* (2020). En los días 1, 30 y 60 del experimento, se tomaron muestras de sangre de los peces por cada tratamiento en vacutainers con anticoagulante y sin anticoagulante, de la forma descrita arriba. Las muestras sin anticoagulante se mantuvieron a 4 °C para su uso subsecuente. Las muestras con anticoagulante se analizaron por medio del estudio hematológico descrito.

Actividad de la lisozima

Se utilizó la metodología aplicada por Soares *et al.* (2018). Muestras de sangre sin anticoagulante se analizaron por medio de prueba comercial para lisozima (Sigma-Aldrich, LY0100). Las muestras de sangre (90 μL) de las tilapias se lisaron con *Micrococcus lysodeikticus* (células liofilizadas, Sigma-Aldrich Chemical, MO, EUA), a una concentración de 0.01 % p/v en buffer de reacción, y se incubaron a una temperatura de 25 °C a pH 6.24. El cambio en la absorbancia a 450 nm de 0.001 por mg de proteína equivale a una unidad de lisozima, la cual se expresó en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Actividad del complemento C3

Se determinó por medio de prueba comercial (SPINREACT -1102094, C3) con base en Chen *et al.* (2019). Se combinaron anticuerpos de la solución (R2) (suero de cabra, anti-C3 humana, pH 7.5, Azida sódica 0.95 g L^{-1}) con muestras de sangre de las tilapias que formaron compuestos insolubles detectados a través del cambio de absorbancia a 340 nm equivalente a la concentración de C3 en la muestra. Antes se realizó una curva de calibración y se utilizó como estándar la proteína calibradora C3 (SPINREAC 1102004) y NaCl (9 g L^{-1}) como diluyente a concentraciones 0.1, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.

Rendimiento productivo

Con el registro quincenal del peso y alimento proporcionado a los peces se determinaron los parámetros del rendimiento productivo a través de las fórmulas utilizadas por Abdel-Wahab *et al.* (2016). Ganancia de peso (GP)= peso final (g) – peso inicial (g), supervivencia (S) = $100 * (\text{número final} \div \text{número inicial})$, factor de conversión alimenticia (FCA) = alimento ingerido (g) \div peso ganado (g) y la tasa de eficiencia proteica (TEP) = ganancia de peso \div proteína consumida.

Análisis estadístico

Los valores hematológicos se analizaron con la prueba *t* de Student ($p \leq 0.05$) y la relación entre los índices hematológicos se probó por medio de un análisis de correlación simple. Los valores obtenidos de la actividad de la lisozima, actividad del C3 y desempeño productivo se analizaron por medio de un análisis de varianza de una vía ($p \leq 0.05$) y las diferencias entre los tratamientos se analizaron *post hoc* con Tukey ($p \leq 0.05$) en SPSS (IBM) Modeler 17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad de agua en todos los tratamientos se mantuvo dentro de los rangos deseables para la tilapia del Nilo de acuerdo con El-Sayed (2020). Los valores de las variables monitoreadas en el agua no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en ninguno de los parámetros temperatura 27.4 ± 1.14 °C, pH 7.11 ± 0.32 ni demanda de oxígeno 6.9 mg L⁻¹.

Evaluación de parámetros de salud

Estudio hematológico

A pesar de que la tilapia es cultivada en todo el mundo, en Latinoamérica los reportes sobre parámetros hematológicos para tilapias sanas son escasos (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011); razón por la cual fueron determinados en este estudio (Cuadro 2). Hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos y los distintos porcentajes de suplementación. Los valores incrementaron en función del porcentaje de suplementación en todos los tratamientos. Como se esperaba, los valores de los testigos MOS fueron más altos, destacaron M20 (E 1.7 mm³, Hb 7.9 g dL⁻¹, Hto 18.4% , VCM 102 fL, HCM 35.1 pg, CMHgC 33.5 g dL⁻¹, L 6750 mm³, PT 7.4 g L⁻¹, ALB 4.0 g L⁻¹, G 56 mg L⁻¹) seguido de U20 y L20 (E 1.6 y 1.4 mm³, Hb 6.9 y 5.8 g dL⁻¹, Hto 17.10 y 16.5% , VCM 98.4 y 96.2 fL, HCM 33.8 y 31.7 pg, CMHgC 32.7 y 31.3 g dL⁻¹, L 6300 y 5900 mm³, PT 6.3 y 6.0 g L⁻¹, ALB 4.3 y 4.2 g L⁻¹, G 55 y 56 mg L⁻¹, respectivamente) (Cuadro 2).

Los valores de los parámetros hematológicos estuvieron dentro del intervalo de referencia, lo cual significó que los tratamientos utilizados no afectaron la salud de los peces; estimuló la producción de E y con ella la producción de Hb y promovió una oxigenación óptima en la sangre y el aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. Excepto el valor de la Hb de la dieta M20, por arriba del intervalo de referencia. Hernández *et al.* (2020) explican que debido a que los E contienen la Hb (proteína transportadora del oxígeno en la sangre) niveles por arriba indican deficiencia de oxígeno en la sangre y problemas para la asimilación de los nutrientes del alimento. Los resultados de Hb difieren con lo reportado por Bittencourt *et al.* (2003) (10.5 g dL⁻¹) y Reda *et al.* (2016) (5.4 g dL⁻¹) para *O. niloticus*. El-Hawarry (2012) y Oluwalola *et al.* (2020) que las diferencias sanguíneas se dan en función del estado fisiológico de los peces, su procedencia, factores de calidad de agua y tratamientos de estudio.

Los E, Hb y Hto tuvieron una correspondencia proporcional con los índices eritrocitarios VCM (tamaño), HCM (carga media de hemoglobina) y CMHgC (color de la hemoglobina) indicaron que no hubo alteraciones y están dentro de los niveles de salud reportados por Fagbuaro *et al.* (2016). El Hto fue 3 veces la concentración de la Hb, lo cual coincidió con lo referido por El-Hawarry (2012). La producción de L fue promovida tanto por los MOS como por *Lemna gibba* y *Ulva lactuca* en función del incremento de suplementación en las dietas experimentales sin causar afectaciones ya que todos los valores estuvieron dentro del intervalo de referencia. De acuerdo con Oluwalola *et al.* (2020) los leucocitos participan en las respuestas inmunitarias al combatir agentes extraños. Hahn-Von-Hessberg *et al.* (2011) y Hernández *et al.* (2020) observaron que

Cuadro 2. Estudio hematológico y sus intervalos de referencia de los juveniles de tilapia del Nilo alimentados con las distintas dietas experimentales.

	M0	M10	M15	M20	Intervalo referencia
E (mm ³)	1.3 ± 0.03b	1.5 ± 0.06b	1.7 ± 0.05a	1.7 ± 0.03a	1.1 – 1.8
Hb (g dL ⁻¹)	4.6 ± 0.03d	5.7 ± 0.05c	6.8 ± 0.02b	7.9 ± 0.05a	3.3 – 7.7
Hto (%)	12.7 ± 0.03d	14.6 ± 0.03c	17.3 ± 0.03b	18.4 ± 0.04a	11.0 – 19.0
VCM (fL)	90.0 ± 0.05d	93.0 ± 0.07c	96.0 ± 0.04b	102.0 ± 0.05a	76.5 – 104
HCM (pg)	28.5 ± 0.05c	31.2 ± 0.07b	33.3 ± 0.05b	35.1 ± 0.05a	22.5 – 37.5
CMHgC (g dL ⁻¹)	28.2 ± 0.08d	29.5 ± 0.05c	31.6 ± 0.08b	33.5 ± 0.07a	27.1 – 33
L (mm ³)	5150 ± 0.05d	6200 ± 0.05c	6600 ± 0.02b	6750 ± 0.04a	4000 – 6900
PT (g L ⁻¹)	4.5 ± 0.09d	5.9 ± 0.05c	6.3 ± 0.05b	7.4 ± 0.03a	3.4 – 7.9
ALB (g L ⁻¹)	2.3 ± 0.05d	2.7 ± 0.05c	3.1 ± 0.5b	4.0 ± 0.06a	2.2 – 5.0
G (mg L ⁻¹)	55.0 ± 0.03a	54.0 ± 0.03a	55.0 ± 0.03a	56.0 ± 0.02a	47.0 – 59.0
	U0	U10	U15	U20	
E (mm ³)	1.3 ± 0.05c	1.4 ± 0.03c	1.5 ± 0.03b	1.6 ± 0.03a	
Hb (g dL ⁻¹)	4.6 ± 0.03d	4.8 ± 0.05c	5.6 ± 0.05b	6.9 ± 0.02a	
Hto (%)	11.9 ± 0.03d	13.6 ± 0.02c	15.6 ± 0.04b	17.10 ± 0.03a	
VCM (fL)	89.3 ± 0.04d	91.5 ± 0.05c	94.2 ± 0.05b	98.4 ± 0.07a	
HCM (pg)	28.4 ± 0.03d	29.6 ± 0.04c	31.3 ± 0.04b	33.8 ± 0.04a	
CMHgC (g dL ⁻¹)	29.0 ± 0.9c	29.3 ± 0.50c	29.8 ± 0.04b	32.7 ± 0.08a	
L (mm ³)	5200 ± 0.07d	5850 ± 0.04c	6100 ± 0.06b	6300 ± 0.05a	
PT (g L ⁻¹)	4.4 ± 0.03c	4.5 ± 0.03c	5.2 ± 0.05b	6.3 ± 0.05a	
ALB (g L ⁻¹)	2.4 ± 0.05c	3.1 ± 0.05b	3.7 ± 0.04a	4.3 ± 0.04a	
G (mg L ⁻¹)	55.0 ± 0.04a	55.0 ± 0.04a	56.0 ± 0.03a	55.0 ± 0.03a	
	L0	L10	L15	L20	
E (mm ³)	1.3 ± 0.03b	1.3 ± 0.05b	1.4 ± 0.03a	1.4 ± 0.02a	
Hb (g dL ⁻¹)	4.5 ± 0.02c	4.6 ± 0.02c	5.0 ± 0.05b	5.8 ± 0.02a	
Hto (%)	12.0 ± 0.03c	14.1 ± 0.06b	14.6 ± 0.06 b	16.5 ± 0.02a	
VCM (fL)	90.1 ± 0.03d	91.5 ± 0.05c	93.5 ± 0.05b	96.2 ± 0.08a	
HCM (pg)	28.1 ± 0.06c	28.4 ± 0.03c	30.6 ± 0.04b	31.7 ± 0.06a	
CMHgC (g dL ⁻¹)	28.4 ± 0.04d	29.1 ± 0.06c	29.9 ± 0.05b	31.3 ± 0.05a	
L (mm ³)	4975 ± 0.06c	5100 ± 0.05b	5800 ± 0.05a	5900 ± 0.06a	
PT (g L ⁻¹)	4.6 ± 0.05c	4.8 ± 0.02c	5.3 ± 0.06b	6.0 ± 0.05a	
ALB (g L ⁻¹)	2.3 ± 0.04d	3.4 ± 0.05c	3.7 ± 0.05b	4.2 ± 0.05a	
G (mg L ⁻¹)	56.0 ± 0.03a	55.0 ± 0.03a	55.0 ± 0.03a	56.0 ± 0.03a	

± es la desviación estándar (n=3). Los valores promedio con superíndice distinto en la misma fila son significativos ($p \leq 0.05$). E: eritrocitos, Hb: hemoglobina, Hto: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media, CMHgC: concentración de hemoglobina corpuscular media, L: leucocitos, PT: proteínas totales, ALB: albúmina, G: glucosa.

los valores leucocitarios difieren en cada estudio debido a las condiciones ambientales y metodológicas de cada investigación. Los valores de PT (albúmina, proteína del hígado y globulina) estuvieron dentro del intervalo de referencia. No difirieron entre

tratamientos (MOS, U y L) (Cuadro 2); sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los niveles de PT, a mayor porcentaje de inclusión en las dietas experimentales.

Lo anterior indica que el uso de estos suplementos en la alimentación de los juveniles de tilapia del Nilo puede reducir problemas hepáticos y nutricionales (Fagbuaro *et al.*, 2016). Niveles fuera del intervalo de referencia se asocian con infecciones, deficiencias, nutricionales y estrés (Reda *et al.*, 2016 y Oluwalola *et al.*, 2020). Cabe mencionar que las PT influyen positiva o negativamente según su valor en los niveles de G, ya que las proteínas son la principal fuente de energía y juegan un papel importante en el mantenimiento de la glucosa de la sangre (Yildirim *et al.*, 2009 y Oluwalola *et al.*, 2020). Los valores de ALB y de G en los tratamientos de este estudio fueron distintos a los obtenidos por Fagbuaro *et al.* (2016) aunque estuvieron dentro del intervalo de referencia, lo cual indicó que los nutrientes de las dietas experimentales fueron absorbidos satisfactoriamente y que las dietas tuvieron una cantidad satisfactoria de proteína para los peces (El-Hawarry, 2012). Hernández *et al.* (2020) y Onyia *et al.* (2015) indicaron que la bioquímica sérica en los peces puede ser influenciada por varios factores como la temperatura del agua, el alimento, la edad de los peces, sexo, genética, tratamientos y condiciones de cautiverio.

Actividad de la lisozima y actividad del complemento C3

La lisozima en los peces es un indicador de las funciones inmunes inespecíficas, funciona como una opsonina y activador del sistema de complemento y la fagocitosis (Cerezuela *et al.*, 2012). El sistema del complemento es componente del sistema inmunológico formado por numerosas proteínas y todas las vías generan el factor C3, encargado de regular la respuesta inmune inespecífica y adaptativa (Chen *et al.*, 2019). Las actividades de la lisozima y del C3 se incrementaron en forma proporcional al crecimiento de las tilapias, el porcentaje de suplementación y los días transcurridos de experimentación; de manera que fueron más evidentes al día 60 en todos los tratamientos, aunque con diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las actividades fueron mayores en U20 (269 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzima y 122 mg dL^{-1} , respectivamente) que en L20 (256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzima y 116 mg dL^{-1} , respectivamente) pero no respecto al testigo M20 (310 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 139 mg dL^{-1} , respectivamente) (Figuras 1 y 2). Con la consideración del valor de M20 como el 100% de efecto máximo en la actividad de la lisozima y del C3, se observó que con la dieta U20 se alcanzó 86 y 88% de la actividad máxima, y con L20, 82 y 83% respectivamente.

El comportamiento de los tratamientos *U. lactuca* y *L. gibba* fue similar al testigo MOS, con incremento sobre las actividades de la lisozima y del complemento C3 que influyó sobre los parámetros hematológicos, principalmente leucocitos. Los resultados fueron similares a los obtenidos por Soares *et al.* (2018) quienes con 0.2 y 0.4 % de Glucan MOS en peces Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) obtuvieron un incremento del estallido respiratorio de leucocitos y de la lisozima. Los resultados obtenidos están dentro del intervalo obtenido por Cerezuela *et al.* (2012) quienes utilizaron microalgas y demostraron mejoras en la respuesta inmunitaria de peces. Esos autores explicaron que la

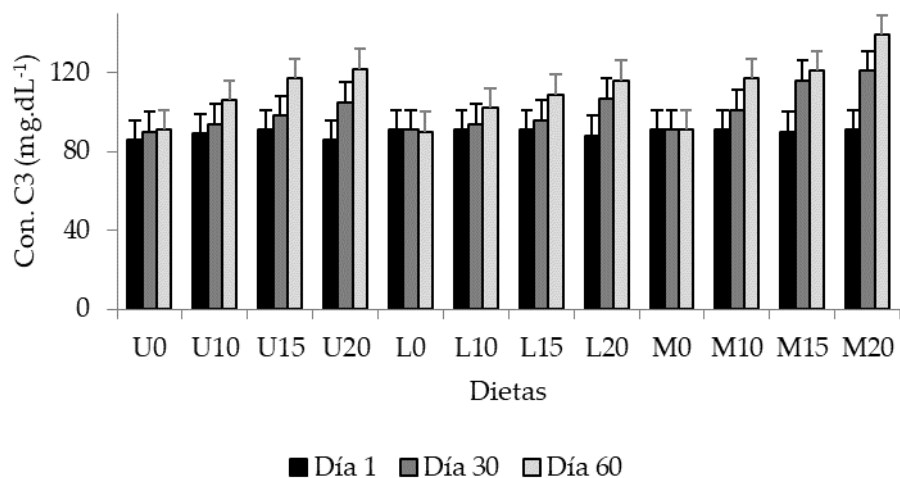


Figura 1. Comparación de la actividad del complemento C3 correspondiente a las dietas experimentales y los días transcurridos.

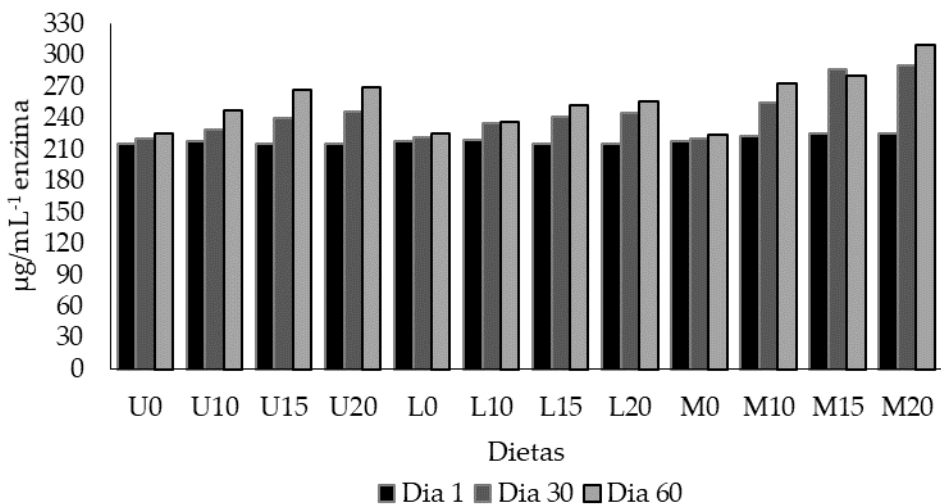


Figura 2. Comparación de la concentración de lisozima correspondiente a las dietas experimentales y los días transcurridos.

actividad de la lisozima varía según la edad, tamaño de los peces, calidad de agua y grado de exposición a los tratamientos.

Lin *et al.* (2011) demostraron un incremento de la actividad de la lisozima y la fagocitosis con MOS en *Cyprinus carpio*. La promoción de las actividades de la lisozima y del complemento C3 puede estar relacionada con la composición de las plantas acuáticas ricas en polisacáridos y antioxidantes en sus paredes celulares. *U. lactuca* contiene ulvanos, polisacáridos sulfatados asociados con funciones de inmunomodulación,

antibacteriales y antifúngicas entre otras (Hentati *et al.*, 2020). En tanto que el género *Lemna* contiene una gran variedad de polisacáridos galacturonanos, proteínas y compuestos fenólicos (Zhao *et al.*, 2014). Hubo una relación directamente proporcional de la actividad del complemento C3 con los leucocitos, puede ser que estos son estimulados por los polisacáridos en ambas plantas acuáticas. Chen *et al.* (2019) refirieron que los leucocitos forman la primera línea de defensa y forma un complejo de ataque contra cuerpos extraños que activa el complemento C3.

Desempeño productivo

Las dietas suplementadas con *L. gibba* y *U. lactuca* fueron altamente aceptadas por las tilapias del Nilo, Yildirim *et al.* (2009) indicaron que probablemente es por su olor y sabor succulento. El peso promedio final de los peces alimentados con las dietas suplementadas con *L. gibba* y *U. lactuca* fue mayor ($p \leq 0.05$) que sus controles (L0 y U10, respectivamente) y las dietas del testigo MOS. La dieta L15 presentó los mejores valores de desempeño productivo (PF 131 g, TEP 3.08 y FCA 1.5) seguida de la dieta U15 (127 g, 3.11 y 1.78, respectivamente) y el testigo M15 (112 g, 270 y 1.6, respectivamente). En todos los tratamientos la supervivencia fue del 100 % (Cuadro 3). No obstante que con la dieta U20 se obtuvieron los mejores resultados de salud a nivel celular y humoral, el crecimiento se vio afectado negativamente. Abdel-Wahab *et al.* (2016) explicaron que la disminución del crecimiento con niveles altos de harina de *Ulva* (30 %) podría deberse al alto contenido de fibra y sus posibles efectos sobre la digestibilidad de la proteína y la materia seca. La variación de los componentes químicos en las plantas

Cuadro 3. Comparación de los parámetros zootécnicos de los juveniles de tilapia del Nilo alimentados con las dietas experimentales (manano-oligosacáridos, *Ulva lactuca* y *Lemna gibba*) con distintos porcentajes de suplementación (0, 10,15 y 20).

	PI (g)	PF (g)	S (%)	TEP	FCA
M0	9.37 ± 0.25	104.03 ± 1.50c	100	2.71 ± 0.04c	1.42 ± 0.03c
M10	9.43 ± 0.31	110.17 ± 1.02b	100	2.88 ± 0.03b	1.45 ± 0.05c
M15	9.43 ± 0.32	113.77 ± 1.56b	100	2.98 ± 0.04b	1.55 ± 0.05b
M20	9.40 ± 0.20	119.37 ± 2.15a	100	3.14 ± 0.06a	1.60 ± 0.06a
U0	9.37 ± 0.25	103.03 ± 1.56c	100	2.68 ± 0.04c	1.42 ± 0.03a
U10	9.37 ± 0.23	111.97 ± 2.63b	100	2.93 ± 0.08b	1.52 ± 0.05b
U15	9.30 ± 0.20	127.03 ± 1.72a	100	3.36 ± 0.05a	1.38 ± 0.03b
U20	9.40 ± 0.10	123.93 ± 2.70a	100	3.27 ± 0.08a	1.64 ± 0.02b
L0	9.33 ± 0.12	104.37 ± 1.98c	100	2.71 ± 0.05c	1.42 ± 0.03a
L10	9.23 ± 0.15	110.33 ± 1.66b	100	2.89 ± 0.05b	1.52 ± 0.02b
L15	9.33 ± 0.25	104.37 ± 1.98c	100	2.72 ± 0.05c	1.40 ± 0.02c
L20	9.40 ± 0.17	117.83 ± 1.31a	100	2.95 ± 0.05a	1.59 ± 0.05c

± es la desviación estándar (n=3). Los valores promedio con el mismo nivel de suplementación y superíndice distinto en la misma columna son significativos ($p \leq 0.05$). PI: peso inicial; PF: peso promedio final; S: supervivencia; TEP: tasa de eficiencia proteica; FCA: factor de conversión alimenticia.

acuáticas como *U. lactuca* está influenciada por el ambiente donde se encuentran (Suryaningrum y Samsudin, 2020).

Las dietas con MOS no tuvieron efecto sobre el crecimiento de los peces, lo cual coincide con lo reportado por Soares *et al.* (2018), quienes explicaron que el efecto de MOS sobre el crecimiento en peces depende de la especie a la que se suministre, el tiempo de aplicación y la temperatura del ambiente. El mejor desempeño productivo de L15 se debió en parte a la contribución de proteína y aminoácidos de las plantas acuáticas, principalmente lisina y metionina que favorecen el crecimiento (Yildirim *et al.*, 2009; Aguilera *et al.*, 2018) (Cuadro 4). La proteína tanto de *L. gibba* como de *U. lactuca* fue utilizada como fuente de energía para el crecimiento. *L. gibba* ha demostrado contribuir al crecimiento de varias especies de peces cuando se sustituye parte de la harina de pescado (El-Sayed, 2020). González *et al.* (2013) reportaron un mayor crecimiento de alevines de tilapia al incluir en la dieta 12 % de *Lemna trinervis*. El-Shafai *et al.* (2004) reemplazaron 20 a 40 % de la harina de pescado con harina de *Lemna minnor* en forma fresca y deshidratada, ambas favorecieron el crecimiento, la TEP y el mejor FCA (1.4) en la tilapia. *U. lactuca* también ha demostrado promover el crecimiento al incluirla en 20 a 30 % en la dieta del bagre africano *Clarias gariepinus* (Abdel-Wahab *et al.*, 2016) y en 5 y 10 % en peces juveniles *Scatophagus argus* (Yangthong y Ruensirikul, 2020). En la dieta de tilapia se ha incluido en 10 %, aunque se sugiere una inclusión hasta 20 %, con resultados satisfactorios en el crecimiento, la utilización del alimento y la tasa de supervivencia (Suryaningrum y Samsudin, 2020).

Cuadro 4. Composición química (base seca) y aminoácidos presentes en *Ulva lactuca* y *Lemna gibba*.

Componente	<i>Lemna gibba</i>	<i>Ulva lactuca</i>
Cenizas %	20.10	33.07
Proteína cruda %	21.5	17.2
Lípidos %	4.45	1.7
Extracto libre de nitrógeno %	32.4	38.34
Composición de aminoácidos		
Arginina	0.003	0.004
Histidina	0.001	0.001
Isoleucina	1.569	4.57
Leucina	0.003	9.33
Lisina	22.33	9.24
Metionina	8.57	5.92
Treonina	0.21	4.76
Valina	2.23	4.01
Alanina	27.80	9.77
Glicina	1.76	6.11

(Aguilera *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Todas las dietas suplementadas con *Lemna gibba* y *Ulva lactuca* mostraron un efecto sobre los parámetros celulares (estudio hematológico) y humorales evaluados (actividad de la lisozima y del complemento C3), respecto a las dietas control (L0 y U0). No obstante, el efecto estadístico fue mayor en L20 y U20. De acuerdo con el estudio hematológico *U. lactuca* y *L. gibba* contribuyeron para un mejor transporte de oxígeno en la sangre, incremento de leucocitos, incremento de la actividad de la lisozima y del C3, sin afectar la calidad nutricional de la dieta ni afectar la salud de los peces. La dieta U20 mostró el efecto significativo mayor sobre los parámetros de salud y L15 mostró los mejores resultados productivos.

U. lactuca y *L. gibba* pueden utilizarse como ingrediente funcional en una proporción del 15 % para la elaboración de alimentos de juveniles de tilapia del Nilo, sus efectos son favorables en la salud y el crecimiento. *U. lactuca* puede incluirse en la dieta de juveniles de tilapia hasta 20 %, debido a que favorece una mayor actividad de la lisozima y del complemento C3, con verificación previa del contenido de la fibra de *U. lactuca* que varía en función de su hábitat y puede promover un crecimiento negativo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por los recursos económicos aportados y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), la Universidad del Papaloapan y su equipo técnico por las facilidades brindadas durante el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- Abdel-Wahab AAW, El-Sayed MIY, Nasser AA. 2016. Potential use of green macroalgae *Ulva lactuca* as a feed supplement in diets on growth performance, feed utilization and body composition of the African catfish, *Clarias gariepinus*. Saudi Journal of Biological Sciences 23 (3): 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.11.010>
- Aguilera Morales ME, Canales Martínez M, Ávila González E, Flores Ortíz CM. 2018. Nutrients and bioactive compounds of the *Lemna gibba* and *Ulva lactuca* as possible ingredients to functional foods. Latin American Journal of Aquatic Research 46 (4): 709–716. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-8>
- Beltrán de Heredia, MR. 2016. Alimentos funcionales. Farmacia profesional 30 (2): 12–14.
- Bittencourt NL, Molinari LM, Scoaris DO, Pedroso RB, Nakamura CV, Nakamura TU, Filho BA, Filho BP. 2003. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. Acta Scientiarum: Biological Sciences 25 (2): 385–388.
- Cerezuela R, Guardiola FA, Meseguer J, Esteban MA. 2012. Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae: effects on the immune system. Fish Physiology Biochemical 38 (6): 1729–1739. <https://dx.doi.org/10.1007/s10695-012-9670-9>
- Chen DD, Li JH, Yao YY, Zhang YA. 2019. *Aeromonas hydrophila* suppresses complement pathways via degradation of complement C3 in bony fish by metalloprotease. Fish and Shellfish Immunology 94: 739–745. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.057>
- Código Sanitario para Animales Acuáticos. 2019. Organización mundial de sanidad animal (OIE). <https://www.oie.int/es/normas/codigo-acuatico/acceso-en-linea/> (Recuperado: diciembre 2021).
- El-Hawarry WN. 2012. Biochemical and non-specific immune parameters of healthy Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their interspecific hybrid (male *O. aureus* × female *O. niloticus*) maintained in semi-intensive culture system. Online Journal of Animal and Feed Research 2 (1): 84–88.

- El-Sayed A-F M. 2020. Tilapia Culture. 2nd Edition. Academic Press: Oxfordshire, U.K. 348 p. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-04085-5>
- El-Shafai SA, El-Gohary FA, Verreth JAJ, Schrama JW, Gijzen HJ. 2004. Apparent digestibility coefficient of duckweed (*Lemna minor*), fresh and dry for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research* 35 (6): 574–586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01055.x>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2019. Contribución de la acuicultura a la erradicación del hambre, la obtención de suministros alimentarios y la promoción de buenas prácticas higiénicas y dietéticas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Comité de pesca, subcomité de acuicultura. Trondheim (Noruega). COFI:AQ/X/2019/6/Rev.1. 18 p. <http://www.fao.org/3/na220es/na220es.pdf> (Recuperado: septiembre 2021).
- Fagbuaro O, Oladimeji IA, Adeyinka FA. 2016. Hematological and serum biochemical profile of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* from Ero dam in Ikun Ekiti, Ekiti state Nigeria. *American Journal of Research Communication* 4 (4): 192–205. http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2016/04/Fagbuaro_Vol44.pdf [ISSN: 2325-4076] (Recuperado: noviembre 2021).
- González S R, Romero C O, Valdivié N M, Ponce P J. 2013. Lenteja de agua una opción en dietas para tilapia roja. *Revista AquaTIC* 38: 85–93.
- Hahn-von-Hessberg C, Grajales-Quintero A, Gutiérrez-Jaramillo AV. 2011. Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas. *Veterinaria y Zootecnia* 5 (1): 47–61.
- Hentati F, Tounsi L, Djomdi D, Pierre G, Delattre C, Ursu AV, Fendri I, Abdelkafi S, Michaud P. 2020. Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules* 25 (14): 3152. <https://doi.org/10.3390/molecules25143152>
- Hernández C, Olmeda-Guerrero L, Chávez-Sánchez MC, Ibarra-Castro L, Gaxiola-Cortés G, Martínez-Cárdenas L. 2020. Nutritional evaluation of canola meal as fish meal replacement for juvenile spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*): Effects on growth performance, hematological parameters, body composition, and nutrient digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 269: 114683. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114683>
- Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, Pesce A, Sine HE, Zakowski J. 2010. EP28-A3c: Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. 3rd Edition. Wayne, PA, USA. 59 p.
- Lin S, Pan Y, Luo L, Luo L. 2011. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* Koi). *Fish and Shellfish Immunology* 31 (6): 788–794. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.013>
- NRC (National Research Council). 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academy Press: Washington, DC, USA. 392 p. <https://doi.org/10.17226/13039>
- Oluwalola OI, Fagbenro OA, Adebayo OT. 2020. Haematological and serum biochemical profiles of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* from different culture enclosures. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 8 (3): 489–493.
- Onyia LU, Diyaware MY, Michael KG, Musa M, Ochokwu IJ. 2015. Comparison of haematological indices, blood group and genotype of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and *Clarias anguillaris* (Linnaeus, 1758). *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 10 (5): 392–399. <https://doi.org/10.3923/jfas.2015.392.399>
- Reda RM, Mahmoud R, Selim KM, El-Araby IE. 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 50: 255–262. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.040>
- Soares MP, Oliveira FC, Cardoso IL, Urbinati EC, Meldau de Campos C, Hisano H. 2018. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 73: 133–140. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.046>

- Suryaningrum LH, Samsudin R. 2020. Nutrient digestibility of green seaweed *Ulva* meal and the influence on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emirates Journal of Food and Agriculture* 32 (7): 488–494. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i7.2131>
- Tirado-Estrada G, Ramos-Mijangos LM, Miranda-Romero LA, Tirado-González DN, M. Salem AZM, Mlambo V, Medina-Cuéllar SE, González-Reyes M, Barababosa P A. 2018. Potential impacts of dietary *Lemna gibba* supplements in a simulated ruminal fermentation system and environmental biogas production. *Journal of Cleaner Production* 181: 555–561. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.120>
- Yangthon M, Ruensirikul J. 2020. Feed intake stimulation of juvenile spotted scat (*Scatophagus argus* Linnaeus, 1766) using dietary seaweed supplementation (*Ulva* sp.). *Aquaculture* 529: 735626. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735626>
- Yildirim Ö, Ergün S, Yaman S, Türker A. 2009. Effects of two seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a feed additive in diets on growth performance, feed utilization, and body composition of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15 (3): 455–460.
- Yuji-Sado R, Raulino-Domanski F, Freitas PF, Baioco-Sales F. 2015. Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). *Latin American Journal of Aquatic Research* 43 (5): 944–952. <https://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-14>
- Zhao X, Moates GK, Wellner N, Collins SRA, Coleman MJ, Waldron KW. 2014. Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). *Carbohydrate Polymers* 111: 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.079>
- Zhou QC, Buentello JA, Gatlin III DM. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309 (1-4): 253–257. <https://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.003>

Agrociencia

DEEP LITTER PIG PRODUCTION SYSTEM AS A SUSTAINABLE ALTERNATIVE FOR SMALL FARMERS

Miguel Ángel Solís-Tejeda¹, Fabiola Lango-Reynoso², Pablo Díaz-Rivera¹, Jorge Aguilar-Ávila³, Alberto Asiain-Hoyos¹, Ponciano Pérez-Hernández^{1*}

¹ Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Carretera Federal Xalapa-Veracruz km 88.5, Tepetates, Manlio F. Altamirano, Veracruz, México. C. P. 91690.

² Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Boca del Río. Carretera Federal Veracruz-Córdoba km 12, Boca del Río, Veracruz, México. C. P. 94290.

³ Universidad Autónoma Chapingo. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial. Carretera Federal México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

* Author for correspondence: pperez@colpos.mx

ABSTRACT

Small backyard farmers produce pigs mainly on concrete floors, which generates wastewater rich in nitrogenous substances created by the continuous washing of the sheds. The objective of this study was to integrate a systematic review of the information on the deep litter pig production system (SPCCP) as an environmentally sustainable alternative for small farmers in Mexico. The SPCCP uses a layer of absorbent organic matter on which the animals are kept. This technology is considered economical to implement, as it requires less infrastructure. The height of the bedding that favours the transformation of organic matter is 50 to 60 cm. Agricultural by-products such as plant debris or stubble can be used for bedding. The productive parameters of pigs in deep litter (CP) are adequate, with lower labour costs, and the animals have more time to eat, drink and play, which improves animal welfare. The product obtained from the deep bed at the end of the productive cycle has desirable properties to regenerate degraded soils or to enrich soils and can be used in agricultural crops. The SPCCP is simple and efficient, the infrastructure and equipment required are more economical; this production system improves feed conversion and daily weight gain, and benefits animal health and comfort. Since this system does not require washing the sheds, it reduces labour, as well as water needs, and does not generate wastewater. Therefore, the SPCCP complies with technical, financial, environmental, and animal welfare characteristics; it is an alternative for small backyard producers.

Keywords: water savings, deep litter materials, litter bedding compost, animal welfare.

INTRODUCTION

Pork meat is in high demand worldwide. However, its production has an impact on the environment, especially traditional pig farming, which generates greenhouse gases, acidifies soils and causes eutrophication in natural wetlands (Ottosen *et al.*, 2021).

Citation: Solís-Tejeda MA, Lango-Reynoso F, Díaz-Rivera P, Aguilar-Ávila J, Asiain-Hoyos A, Pérez-Hernández P. 2022. Deep litter pig production system as a sustainable alternative for small farmers. *Agrociencia*. 56(6): 1104-1132. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2755>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: May 19, 2022.
Approved: August 07, 2022.
Published in Agrociencia:
October 27, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



In Mexico in 2021, 1 523 540 Mg of pork carcasses were produced. The state of Veracruz is the fifth largest producer with 137 602 Mg. As a complement, it is estimated that 1 025 000 Mg were imported in the same year, which cast an opportunity to increase the supply of the product in the country (SIAP, 2021). To achieve this production, the Livestock Development Program (Fomento Ganadero) created in 2014 provided economic incentives for the expansion of farms in communities of high and very high marginalization. This increased the number of backyard pig production farms (IICA, 2016).

Pig production in Mexico is usually done in traditional systems (TS) on a firm cement floor; this characteristic prevails in small backyard producers. The TS generates continuous wastewater from washing the sheds. Swine wastewater contains urine, excrement, food waste and various cleaning chemicals. This water is indiscriminately discharged untreated into soils, water bodies or drains not designed for this type of discharge. Small backyard pig producers are not officially identified, and since they do not have wastewater treatment systems, it can be assumed that they do not comply with regulations (Solís-Tejeda *et al.*, 2021a). The current Mexican standards that regulate wastewater discharges in Mexico are NOM-001-SEMARNAT-2021 and NOM-002-SEMARNAT-1996 (Solís-Tejeda *et al.*, 2021b).

In order to avoid impact on the environment, especially to water bodies, land evaluation models are designed for pig farming. With these models it is technically possible to design land management programs and to minimize the impact on water bodies (Bautista-Zuñiga and Aguilar-Duarte, 2021). However, it is difficult to limit the establishment of small backyard farms, although their size is not yet considered to have a significant impact, they have increased in number in some Mexican towns in recent years (Solís-Tejeda *et al.*, 2021b).

The interest in reducing the polluting effect of pig farming worldwide has led to the development of precision livestock systems. The purpose of these systems is to improve efficiency in the supply of inputs, reduce waste and improve sustainability. An alternative to achieve that is to implement automatized monitoring and control systems that allow the evaluation of production, reproduction, health, animal welfare and environmental impact in real-time. With this technology, it is possible to provide the optimal amount of nutrients that the individual animal requires, considering the immediate changes in animal needs, and reducing waste to the environment (Rauw *et al.*, 2020). This form of production can reduce up to 37 % the global warming potential, 21 % of land acidification, and 22 % eutrophication of freshwater bodies (Ottosen *et al.*, 2021). However, high investment and the need for training make it difficult for this technology to reach small backyard producers.

Biodigesters can reduce methane (CH₄) production and provide electric power to farms; however, they do not recover investment costs, so producers lose interest in them. In addition, biodigesters do not contribute to the reduction of water consumption and pollution (Pérez-Espejo and Cervantes-Hernández, 2018).

Pig production contributes various nitrogen products to natural water bodies, including nitrates and nitrites (Solís-Tejeda *et al.*, 2021b). Nitrogen products cause

eutrophication in water bodies and their high concentration in air and soil cause environmental imbalances. However, nitrogen is an indispensable part of living beings and is the key element for agricultural fertilization; it is found in abundance in the excrement of animals such as pigs. Crop fertilization with organic products, such as pig faeces, is an opportunity to reduce the use of chemical fertilizers, while reducing nitrogen inputs into the environment (Ndue and Pál, 2022).

Backyard TS pig farms in Mexico are characterized by being a fraction of the producer family household. This type of small farms has basic productive infrastructure such as sheds with concrete, block, brick or wood walls, a solid cement floor; tin roofs; scarce equipment, and untreated direct drainage to municipal drains or paddocks (Santos-Barrios *et al.*, 2017; Solís-Tejeda *et al.*, 2021a). It is possible to adapt those TS to SPCCP. The CP is a vegetal substrate that replaces the concrete pavement where the organic nitrogen from animal urine and faeces decompose onto an *in situ* compost. This process results in a compost with agricultural characteristics (Rondón *et al.*, 2014). However, it is necessary to compile and order the information that has been generated on pig production in CP in order to identify its potential and facilitate its technological transfer to the small scale pig producers.

Since it is hypothesized that CP improves animal welfare and reduces the environmental impact of pig farming, without affecting the productive behaviour of pigs. Therefore, the objective of the study was to integrate a systematic review of the information on the deep litter pig production system (SPCCP) as an environmentally sustainable alternative for small producers in Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Information for this systematic review was extracted from Google Scholar, Scielo and Scopus databases. The search terms used in English and Spanish were deep litter pig production (58 results), and deep litter pig composting (1160 results).

As exclusion criteria, it was decided to consider not only scientific articles, but also books, book chapters and updated official pages of the Mexican government that complied with certain quality criteria.

In addition, the “snowball” methodology was used where one literature led to others (Munn *et al.*, 2018). Literature from the last ten years was prioritized; however, older works were accepted according to the relevance of information generated for this review.

The selected articles were grouped into the following topics: CP characteristics, productive parameters of pigs in CP, organic matter degradation process, contribution of CP to water conservation and animal welfare.

RESULTS AND DISCUSSION

The CP is a technology used for the production of various farm animals, including pigs; it consists of using a layer of absorbent organic debris as a support on which the animals are kept. On this material the animals deposit their excrement and urine during

the entire productive cycle. The microorganisms responsible for the decomposition of organic matter grow on the substrate and decompose animal excrement, urine and food residues, very similar to a composting process. The rate at which the litter composting process occur depends on the substrate, nutrient availability and temperature (Campiño-Espinosa and Ocampo, 2007).

This pig production technology is considered not expensive to implement, as it requires less infrastructure than floor-based TS. It is possible to reuse and adapt disused production facilities through small adjustments with materials from the region (Cruz *et al.*, 2010).

The CP use in swine production originated in China in the 1970s. It is adopted in Europe, United States, Venezuela, Mexico, among other countries; where it is an environmental-friendly production alternative. This system does not require washing the floor of the sheds, thus avoiding the generation of contaminated wastewater, the presence of flies and unpleasant odours in the farms (Robert-Pullés *et al.*, 2010).

The SPCCP reduces operating costs, solves the problem of excreta and slurry generation, and promotes better animal welfare. All of which results in the improvement of their productive parameters and meat quality. Therefore, this system is considered an option to achieve technical, economical and environmental feasibility, along with animal welfare in swine production (Li *et al.*, 2017).

Density, feeding programs and production management in SPCCP are similar to TS management. However, with SPCCP technology, financial and environmental advantages are obtained due to lower feed conversion (FC) and the absence of wastewater. Hence, SPCCP is a feasible alternative to be adopted in small-scale pig production (Cruz and Almaguel, 2013). The decrease in feed consumption and FC is due to the fact that pigs require less energy in CP systems than in floor systems in order to regulate their temperature.

Characteristics of deep litter for pig production

The basis of this system is to raise the animals on a substrate of plant debris called bedding. The necessary height of the bedding to favour the transformation process of organic matter is between 50 and 60 cm (Rondón *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2017; Caicedo *et al.*, 2021). For this purpose, it is feasible to use agricultural by-products such as plant debris or stubble, which are bulking agents with low moisture content and high organic carbon content (Bernal *et al.*, 2008). The amount in kg of CP per animal varies according to the material and height to be managed. For example, for a height of 50 cm, 107.32 kg of grass hay or 84.15 kg of rice husk should be provided (Rondón *et al.*, 2014).

For the choice of bedding material, the comfort of the animals should be considered. The friction of the material is important to avoid slipping and bumping. High or low abrasiveness and hardness may cause hoof deformities, asymmetric growth and injuries. The material should lack sharp edges that can penetrate the skin and should have good insulation and thermal conduction that favour the natural posture of the

animals (Lensink *et al.*, 2013). Some materials studied as CP in swine production are presented in Table 1.

Campiño-Espinoza and Ocampo (2007) evaluated two densities of CP material, 350 and 450 kg per animal, with empty oil palm bunches; they concluded that the higher the amount of material, the higher the temperature, which favours biooxidative processes. In addition, SPCCP has been tested in a dual maternity pen. For this purpose, dried sugarcane bagasse, rice plants, corn plants, hay and wood shavings were used as bedding materials. In-calf mortality was recorded below 3 %, and weaning weights of 7 kg were obtained at 26 days after birth (Cruz *et al.*, 2017).

Other materials that can be efficient for the establishment of CP are hay, rice or coffee husks, corn husks, dry sugarcane bagasse, wheat straw, soybean straw or a mixture of these. It is important to consider that the materials must be dry (Cruz *et al.*, 2011). However, it is necessary to consider factors such as ammonium emission that may vary according to the bedding material. Rondón *et al.* (2014) found that a bed of grass hay can emit 6.59 mg m⁻³ of ammonium; while a bed of rice husk 2.31 mg m⁻³. The fibrous tissue of grass hay absorbs more ammonium-rich urine and accelerates the composting of the bedding hay itself. This results in a greater emission of ammonium into the environment. Therefore, rice husks are considered an excellent material, with adequate particle size for the composting process occurring at CP. In contrast, grass hay provides more useful nutrients for agriculture because rice hulls are made up of cellulose, lignin, and minerals such as silica.

The shavings, as bedding material, store moisture and dirt. Moisture in CP promotes the formation of *Listeria monocytogenes* spore-forming bacteria and *Escherichia coli*, among others. These pathogens can be harmful to animals (Johanssen *et al.*, 2018). Pine wood shavings contain resins that inhibit bacterial growth, which can affect the composting process (Lensink *et al.*, 2013); because of this it is not highly recommended for the purpose.

Table 1. Materials used and height of deep litter evaluated in pig production.

Material	Bedding height (cm)	Author
80 % cane bagasse, 20 % grass	55	Cruz <i>et al.</i> , 2010; 2011
Grass hay	55	Cruz <i>et al.</i> , 2010
Grass hay	60	Tepper <i>et al.</i> , 2012
Grass hay	55	Cruz and Almaguel, 2013
Grass hay	50	Rondón <i>et al.</i> , 2014
Rice husk	50	Rondón <i>et al.</i> , 2014
Grass hay	50 y 55	Cruz <i>et al.</i> , 2017
Star grass hay	50	Cruz <i>et al.</i> , 2017
Pangola hay	50	Cruz <i>et al.</i> , 2017
50 % sugarcane bagasse, and 50 % star grass hay	50	Cruz <i>et al.</i> , 2017
50 % King Grass, 30 % sugarcane bagasse, and 20 % star grass hay	50	Cruz <i>et al.</i> , 2017

It is important to consider the size of the plant particle. A particle of 5 mm in length favours the composting process in the CP and bacteria formation is minimized (Li *et al.*, 2017). This improves urine infiltration and air circulation through the bedding. Also, the pigs stir up the small particles easily when rooting. The continuous movement of the bedding oxygenates the material and hinders undesirable fermentation of organic matter; as well as limits the development of parasites and pathogens (Rondón *et al.*, 2014).

Bedding has a life span, which depends on the material from which it was made, among other factors. Although for cost reasons we try to keep the same bed as long as possible, its duration will depend on the degradation of the material. For example, a bed made with wheat straw can be maintained for three fattening periods with positive results, while those made with sugarcane bagasse are usually changed at the end of each production cycle (Arango *et al.*, 2012). In addition, it has been observed that pigs in the SPCCP tend to define three zones in a pen: the dirty zone, where most of their depositions occur; the wet zone, close to the water intakes; and the clean zone, which is the space used for resting (Campiño-Espinosa and Ocampo, 2007).

As the production process progresses, the pigs move the CP material from the clean to the dirty zone, highlighting the limits of the zones as opposed to traditional production (Rondón *et al.*, 2014). This should be monitored, and the material required should be supplied to ensure the height of the bedding. On the other hand, the safety of the bedding material should be considered. Siroca *et al.* (2019) reported a case of poisoning of 50 pigs on a commercial farm by consumption of material contaminated with diquat, among the intended CP material. Diquat is an herbicide used for drying clover.

Production parameters of pigs in the deep litter system (CP).

It is also important to consider the number of animals in the shed, as the animal load determines the amount of nitrogen-rich organic matter that will be produced. Animal densities in the SPCCP are similar to those in the concrete-floored TS (Cruz *et al.*, 2011; Cruz and Almaguel, 2013; Rondón *et al.*, 2014). The productive parameters of pigs in the SPCCP demonstrate an adequate productive viability at high densities (Table 2). The results by Cruz *et al.* (2010) showed a better productive performance of pigs in the SPCCP compared to the TS. Pigs in CP decreased feed intake as well as energy requirements; the authors showed that CP improved FC between 0.25 and 0.21 compared to TS, and DWG was 14 g d⁻¹ higher compared to TS. This differs from the study by Arango *et al.* (2012) who found no difference in DWG or FC between systems; however, daily feed intake was 300 g d⁻¹ lower per animal in the fattening phase. In addition, the TS presented a high morbidity of 27.7 %, in contrast to 16.6 % of the animals developed on hay bedding, and 11.1 % of the animals produced on bedding of a mixture of 80 % bagasse and 20 % hay. The results are consistent with the SPCCP evaluated by Cruz *et al.* (2011) who presented FC indicators of 0.12, and DWG of 23 g d⁻¹ higher than those in TS with concrete floor. They also agree with Cruz and

Table 2. Productive indicators of pigs in the deep litter system.

Productive indicators							Author
AA	AD	FC (kg)	DWG (g)	IW (kg)	FW (kg)	PT (d)	
1.50	0.67	2.69	652	24.86	96.58	110	Campiño-Espinoza and Ocampo, 2007
1.35	0.74	2.71	611	24.86	92.04	110	Campiño-Espinoza and Ocampo, 2007
1.44	0.69	3.38	740	21.21	99.60	106	Cruz <i>et al.</i> , 2010
1.44	0.69	3.42	739	21.18	99.51	106	Cruz <i>et al.</i> , 2010
1.40	0.71	2.84	727	22.60	95.30	100	Cruz <i>et al.</i> , 2011
4.50	0.22	1.76	745	22.27	43.19	28	Tepper <i>et al.</i> , 2012
1.44	0.69	3.08	747	-	-	-	Cruz and Almaguel, 2013
1.37	0.73	-	-	30.00	110.00	90	Rondón <i>et al.</i> , 2014
1.40	0.71	3.42	739	21.18	99.51	106	Cruz <i>et al.</i> , 2017
1.40	0.71	3.40	650	21.18	99.00	120	Cruz <i>et al.</i> , 2017

AA: available area, m² per animal, AD: animal density, number of animals per m², FC: feed conversion, DWG: daily weight gain, IW: initial weight, FW: final weight, PT: production time.

Almaguel (2013) who recorded a morbidity of 22.2 % in the CP, in contrast to 55.5 % morbidity and one dead animal in the TS.

Cruz *et al.* (2017) recorded the growth of pigs in the SPCCP in three private farms. The values obtained by the producers were on average a FC of 3.4, a DWG of 650 g d⁻¹, and a final weight of 99 kg for 120 d. Also, they provided records on the development of a herd from weaning with 8.2 kg in the SPCCP. The latter animals reached 95 kg with a DWG of 600 g d⁻¹. The CP residue was used as fertilizer on the crops in the farm.

Aké-Chalé *et al.* (2014) found no significant differences in the number of piglets alive and weaned at 28 d for pig wombs in TS, and with corn stubble CP. However, the initial (22 g) and weaning weights (1.12 kg) of piglets were higher. Hurtado *et al.* (2021) developed nonlinear statistical models for pig production on rice husk and corn stubble CP. These models can predict swine herd development; in this way it is possible to determine in advance the physiological needs of the animals. The models reflect the feeding requirements and growth decline when the maximum genetic standard is reached. This helps to achieve accurate production of pigs at CP.

Regarding SPCCP carcass characteristics, according to the literature review by Caicedo *et al.* (2021), the meat yield of pigs produced in CP did not indicate significant difference compared to those produced in TS. The 110 kg finishing pigs had 21.8 mm backfat, 41.3 cm² of chop, 51.1 % lean meat, and 74.9 % carcass yield; in contrast to the TS pigs which had 20.8 mm backfat, 43 cm² of chop, 52.1 % lean meat, and 75.8 % carcass yield. However, the labour cost per animal care was reduced by a quarter with CP and animals spend 133 % more time eating, drinking and playing (Honeyman and Harmon, 2003), which could benefit animal welfare.

Kidega *et al.* (2021) found that inoculating daily a solution of indigenous microorganisms from the decomposition of the bottom of the CP onto the litter material reduced the litter temperature. This resulted in a reduction of backfat in the neck of the animals by 1.7 cm, and 1.8 cm above their shoulders compared to the TS. The effect of inoculated litter bed on fat reduction in swine agrees with Zhou *et al.* (2014) who reported 2.19 % less fat and 1.96 % more lean meat for pigs on a sawdust and straw CP at 5:7 ratio inoculated with Saccharomycetes, *Bacillus subtilis* and Actinomycetes in contrast to TS.

Degradation process of organic matter in deep litter during the stay of pigs.

During pigs farming, the material composing the CP on the shed is subjected to a bioxidative process (in the presence of oxygen). Bacteria, fungi and other microorganisms that arise in organic decomposition partially mineralize and humify (generate humus) the excrement, urine and bedding material. This results in a stable product with desirable properties for the regeneration of degraded soils or the enrichment of cultivated soils (Figure 1) (Bernal *et al.*, 2008).

Composting occurs in two stages, the first or mesophilic stage is determined by the concentration of nutrients and microorganisms, generally carbohydrate degraders. The microorganisms present in the faeces degrade the nutrients available in the fibrous substrate and in the food remains. In the second or thermophilic stage, microbial activity generates a rise in compost temperature. The speed of this process and the temperature differ between the zones of the bed. The clean zone has the highest temperature up to 52 °C, followed by the wet zone at 48 °C, and the dirty zone at 43 °C. During this phase, due to thermal action, the number of present microorganisms, such as *Pseudomonas* and *Flexibacter*, is reduced (Campiño-Espinosa and Ocampo, 2007). Because of the heterogeneity of the process, in terms of the humidity and temperature reached, it is not possible to guarantee an appropriate sterilization of the substrate.

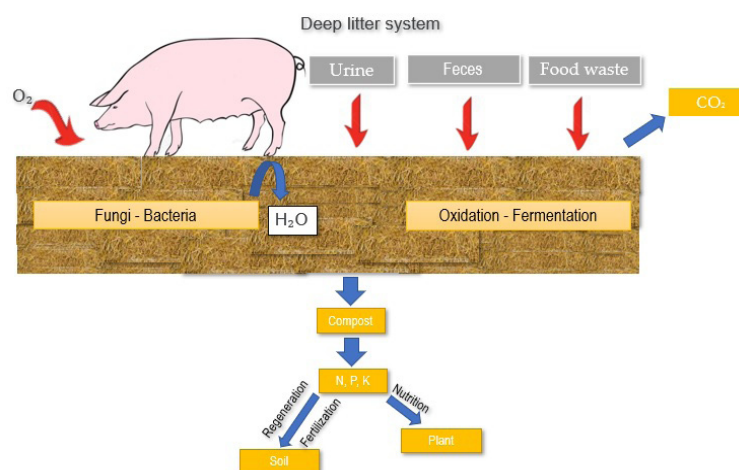


Figure 1. Compost generation from deep litter.

In addition, Rober-Pullés *et al.* (2010) recommended that the system requires sanitary surveillance for its safe implementation, in order to control the presence in the substrate of faecal coliforms, fungi and yeasts, viable mesophilic aerobes and the possible presence of unstudied pathogens. For such reasons, this process should be considered as pre-composting and the product should undergo a proper composting process, in accordance with Standard NMX-AA-180-SCFI-2018, for its safe use in agricultural systems. Finally, there is the cooling and maturation stage, or maturity and stability of the resulting compost, in which fungi and yeasts develop. In this phase, the presence of members of the bacterial families Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae, Brevibacteriaceae (Actinobacteria) and Bacillaceae (Firmicutes) is correlated. These microorganisms are associated with the degradation and mineralization of organic matter for the generation of humic substances (Vásquez-Castro and Millones-Chanamé, 2021).

For the development of the composting phases of the bedding materials, the relationship of the substrate with the microorganisms is very important. The composition of the microbial communities that develop will depend on the physicochemical parameters of the organic matter. Thus, fungi of the genera *Ascomycota*, *Basidiomycota*, and *Zygomycota* have been identified in pig excrement and rice straw compost, while *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*, and *Mucoromycota* were found in a mixture of pig excrement with fine coal gasification slag (Vásquez-Castro and Millones-Chanamé, 2021).

Organic nitrogen contained in animal excrement and urine is degraded by microorganisms into ammonium (NH_4^+). Part of the nitrogen is released to the environment as ammonia gas (NH_3) or continues its oxidation through the nitrification-denitrification process to nitrous oxide (N_2O) or dinitrogen (N_2), which are released to the environment as gases (Figure 2). Nitrogen volatilizes up to 77 % as NH_3 and N_2 . Nitrogen loss will depend on factors such as initial litter concentration, moisture, C:N ratio, and the oxygenation generated mainly by animal movement on the litter (Maeda *et al.*, 2011).

The end result of the CP substrates decomposing is a stabilized mixture of nutrients for agriculture. For example, the properties of a grass hay bed are 9.75 % crude protein, 30.99 % crude fibre, 0.52 % crude fat, 9.29 % ash, 1.55 % nitrogen, and 0.65 % phosphorus (Rondón *et al.*, 2014).

The addition of organic residues, in particular pig excreta, has shown to improve soil quality indicators. It is possible to improve carbon and nitrogen levels, in addition to humic substances. Humic substances interact with the soil, and improve its structure and fertility (Ventura *et al.*, 2018). Adding CP output to the soil may be a feasible strategy for the regeneration and enrichment of agricultural soils.

Regarding gaseous pollution, Zhou *et al.* (2014) found that NH_3 emission in the CP (3.3 mg m^{-3}) is lower than in the TS (19.8 mg m^{-3}). The same occurs with CO_2 produced in the CP (1443.3 mg m^{-3}) in contrast to the solid floor system (3223.3 mg m^{-3}).

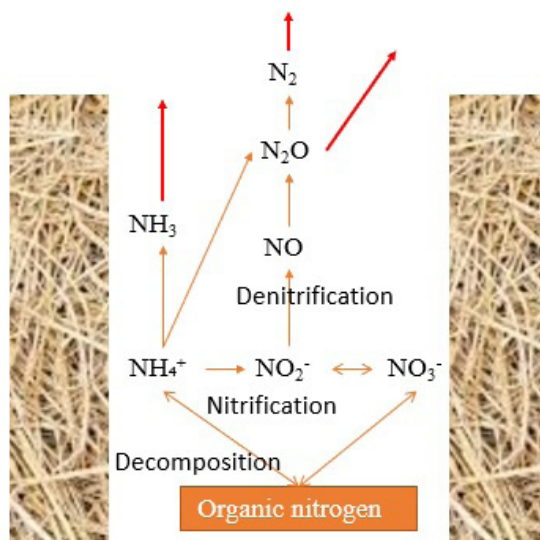


Figure 2. Organic nitrogen degradation process in deep litter production system (Modified from Maeda *et al.*, 2011).

Contribution of deep litter to water care

Water is an indispensable element for pigs, representing 50 % of the body of a finishing animal. Water consumption ($L d^{-1}$) in pigs differs by physiological stage: a lactating sow with litter consumes 30.4, developing and finishing pigs 15.2, pregnant sows 22.8, and boars 30.43 (García-Contreras *et al.*, 2012). In addition, the TS with concrete floor requires water daily for cleaning the floors of the sheds. This expense is difficult to estimate in small-scale (backyard) producers, since there is a large standard deviation between farm consumptions (Solís-Tejeda *et al.*, 2021a). One of the advantages of the SPCCP is the total water saved for a non-frequent shed washing.

The water consumption saved by the SPCCP in contrast to the concrete floor TS has been estimated. Cruz *et al.* (2010) estimated water savings of 2.45 m^3 water per animal. In a 104 d trial, Cruz and Almaguel (2013) saved 2.36 m^3 of water per animal. In turn, Cruz *et al.* (2017) estimated the water savings by SPCCP at 4.91 m^3 per animal.

The result of water consumption for cleaning the sheds is wastewater containing various pollutants, such as nitrogen derivatives, which is often discharged into water bodies without treatment (Solís-Tejeda *et al.*, 2021a). Cruz *et al.* (2010) quantified the pollution generated by wastewater from the TS and contrasted it with the SPCCP. The swine wastewater generated in the floor system has a high organic matter content quantified as chemical oxygen demand (COD) of 49 383.33 $mg L^{-1}$ and biological oxygen demand (BOD) of 24 166.67 $mg L^{-1}$; in addition to 3.9×10^4 most probable number (MPN) $(100)^{-1}$ faecal coliforms, 1.9×10^4 colony forming units (CFU) ml^{-1} *Salmonella* sp. and helminth eggs. These indicators remain absent in the SPCCP after two production cycles, 106 d in total.

Animal welfare in deep litter pig production system

Globally, awareness and interest in animal welfare is increasing (Cruz *et al.*, 2017; Fernandez *et al.*, 2018). Producers are responsible for providing welfare to pigs. Therefore, various ethical, productive and economic opinions have been generated about intensive production systems. Intensive production has ignored this interest under the pretext of increasing the amount of food available; animals are subjected to stress and medications for their control (Caicedo *et al.*, 2021).

In intensive production on concrete floors, stress in pigs has resulted in aggression among herd members, with the emergence of tail biting and various injuries. CP has succeeded in avoiding these social disorders at high production densities of 1.4 m² per animal. Pigs in CP show a more natural and relaxed attitude. They use the bedding material for rooting, and play can be perceived among them (Cruz *et al.*, 2011). On the other hand, with CP humidity is avoided, and the incidence of respiratory diseases is reduced. Limb injuries due to falls are also avoided, as well as hoof softening due to humidity (Cruz and Almaguel, 2013).

Flies are often a problem for producers, the surrounding community, and the pigs (Caicedo *et al.*, 2021). Flies can be vectors of disease. The increase in temperature of the bedding material during the composting process kills fly eggs and larvae, as well as other insects that cause injury to the animals. Rice husk bedding has shown to be more effective in reducing parasites compared to grass hay bedding and traditional floor management (Rondón *et al.*, 2014).

In general, skin diseases in pigs caused by ectoparasites are common and affect animal welfare; in addition, they cause reduced growth rates, affect FC, and increase morbidity and mortality. The SPCCP benefits animal health; to achieve this it is necessary to keep CP dry and renew the entire bedding before saturation by faeces. A CP saturated with faeces benefits the reproduction and transmission of parasites such as sarcoptic mange (Fernandez *et al.*, 2018).

Another advantage of CP is that it provides comfort to the animals by raising their temperature during cold days. The dry and warm substrate improves welfare in contrast to a wet and cold floor. This feature improves the occupancy rate of the pens and provides a larger desirable area for the animals to lie down (Milera-Rodriguez, 2022). However, it is a factor to consider on hot days, where it will be necessary to ventilate the area for the welfare of the animals (Cruz *et al.*, 2011).

CONCLUSIONS

Deep litter pig production is a simple and efficient technology. It is possible to use various agricultural by-products, available in the region where the farms are established, as bedding material. The infrastructure and equipment required for this production system are less expensive than in the traditional concrete floor system.

Productive indicators such as feed conversion and daily weight gain are higher in the deep litter production system in equal time and density than those in the traditional backyard system. There is no need to wash the sheds, labour is reduced, as well as

water requirements, and no wastewater is generated. According to the literature analysed, the animals show more natural behaviours, and stress is avoided. At the end of the productive cycle, the bedding is an excellent product that can be used in agriculture.

The deep litter meets technical, financial, environmental and animal welfare characteristics for its adoption by small-scale backyard pig producers with traditional systems in Mexico. However, for its efficient technology transfer to producers, it is necessary the study of its function in the different climatic regions of the Mexican tropics, as well as to provide information on available materials for the making of deep litter beds appropriate for each region.

REFERENCES

- Aké-Chalé JA, González-Canché IÁ, González-Araujo C, Giacomán-Vallejos G, Sanginés-García JR. 2014. Comportamiento reproductivo de cerdas gestantes en un sistema de cama profunda y su efecto sobre el ambiente. *Revista Científica FCV LUZ* 26 (3): 239–247.
- Arango CFE, Alvarez HE, Hurtado NVL. 2012. Análisis comparativo de la ceba de cerdos en un sistema de cama profunda y piso de concreto en una granja comercial de Villavicencio, Colombia. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos* 3 (1): 36–56. <https://doi.org/10.22579/22484817.592>
- Bautista-Zuñiga F, Aguilar-Duarte Y. 2021. Evaluación de la aptitud de tierras para el desarrollo de la porcicultura a escala regional en Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 24 (1): 1–13.
- Bernal MP, Alburquerque JA, Moral R. 2008. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology* 100: 5444–5453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>
- Caicedo W, Ramos D, Zhunaula V. 2021. Management of the deep bedding system in pig farming: An alternative to improve production and animal welfare in the Ecuadorian Amazon. *MDPI sciforum* 1–4. <https://sciforum.net/manuscripts/11236/manuscript.pdf> (Retrieved: February 2022).
- Campiño-Espinosa GP, Ocampo DA. 2007. Comportamiento de la temperatura de la cama profunda de cerdos de engorde utilizando racimos vacíos de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. *Orinoquia* 11: 65–74.
- Cruz ME, Almaguel GRE, Maderos CM, Ly J. 2010. Uso de camas profundas en el sistema de engorde de cerdos en el sector campesino en Cuba. *Zootecnia Tropical* 28: 183–191.
- Cruz ME, Almaguel GRE, Ramiro E, Ly J. 2011. Evaluación del bienestar animal de cerdos en crecimiento ceba alojados en sistema de cama profunda. *Revista Electrónica de Veterinaria* 12: 1–9.
- Cruz ME, Almaguel GRE. 2013. Tecnología de cama profunda para producción porcina. *Agricultura Orgánica* 3: 30–33.
- Cruz ME, Almaguel RE, Mederos CM, González C, Sáez Y, Breña L, Ortiz CV, Espinosa N, Ramírez J, Camejo E, Bolaño A, González E, González MC, Rodríguez R, Rivadeneira CM, Capote G, Gómez F, Becerra JD, Ricardo O, Ríos M, Robert M, Espinosa MC, Ly J, Ramos C, López M. 2017. Evaluación y extensión de la tecnología de camas profundas en los sistemas de producción porcina del sector campesino y cooperativo en Cuba. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 24 (1): 19–24.
- Fernández JG, Trujillo M, Pereira M, González A. 2018. Sarna sarcóptica en cerdos criados en cama profunda. Reporte de caso. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 65 (3): 282–288. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v65n3.76465>
- García-Contreras AC, Ortega YDL, Yagüe AP, González JG, Artiga CG. 2012. Alimentación práctica del cerdo. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 6 (1): 21–50. https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2012.v6.n1.38718

- Honeyman MS, Harmon JD. 2003. Performance of finishing pigs in hoop structures and confinement during winter and summer. *Journal of Animal Science* 81 (7): 1663–1670. <https://doi.org/10.2527/2003.8171663x>
- Hurtado EA, Cueva-Navia T, Barba-Capote C. 2021. La modelización del crecimiento de los cerdos bajo un sistema de cama profunda. *Ciencia UNEMI* 14 (36): 1–11. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss36.2021pp1-11p>
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2016. Evaluación de diseño programa fomento ganadero. SAGARPA-CONEVAL. <https://www.agricultura.gob.mx/sites/default/files/sagarpa/document/2018/10/09/1454/09102018-s-260-programa-de-fomento-ganadero.pdf> (Retrieved: February 2022).
- Johanssen JRE, Sorheim KM, Strom T, Brunberg EI. 2018. Bedding hygiene, cleanliness and lying behaviour for heifers housed on Wood chip or straw deep bedding. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A–Animal Science* 68 (2): 103–111. <https://doi.org/10.1080/09064702.2019.1601763>
- Kidega K, Aliro T, Mugonola B, Ndyomugenyi EK, Okello-Uma I. 2021. Effect of different floor types on growth performance of pigs and carcass back-fat thickness. *London Journal of Research in Science: Natural and Formal* 21: 47–54.
- Lensink BJ, Ofner-Schröck E, Ventorp M, Zappavigna P, Flaba J, Georg H, Bizeray-Filoché D. 2013. Lying and walking surfaces for cattle, pigs and poultry and their impact on health, behavior and performance. *In: Livestock housing: Modern management to ensure optimal health and welfare of farm animals*. Aland A, Banhazi T. (eds.); Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, pp. 75–92. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-771-4>
- Li J, Wang J, Wang F, Wang A, Yan P. 2017. Evaluation of gaseous concentrations, bacterial diversity and microbial quantity in different layers of deep litter system. *Animal Bioscience* 30 (2): 275–283. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0282>
- Maeda K, Hanajima D, Toyoda S, Yoshida N, Morioka R, Osada T. 2011. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost. *Microbial Biotechnology* 4 (6): 700–709. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00236.x>
- Milera-Rodríguez MC. 2022. Contribución del manejo de cerdas en pastoreo a la resiliencia de los sistemas porcinos. *Pastos y Forrajes* 45: 1–12.
- Munn Z, Peters MDJ, Stern C, Tufanaru C, McArthur A, Aromataris E. 2018. Systematic review or scoping review? Guidance for authors when choosing between a systematic or scoping review approach. *BMC Medical Research Methodology* 143 (18): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12874-018-0611-x>
- Ndue K, Pál G. 2022. Life Cycle Assessment Perspective for Sectoral Adaptation to Climate Change: Environmental Impact Assessment of Pig Production. *Land* 11: 827–844. <https://doi.org/10.3390/land11060827>
- Ottosen M, Mackenzie GS, Filipe JAN, Misiura MM, Kyriazakis I. 2021. Changes in the environmental impacts of pig production systems in Great Britain over the last 18 years. *Agricultural Systems* 189: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103063>
- Pérez-Espejo RH, Cervantes-Hernández GI. 2018. Estrategias de mitigación. El programa de biodigestores en Yucatán, México. *Península* 13 (2): 235–262
- Rauw WM, Rydhmer L, Kyriazakis I, Overland M, Gilbert H, Dekkers JC, Hermes S, Bouquet A, Gomez-Izquierdo E, Louveau I, Gomez-Raya L. 2020. Prospects for sustainability of pig production in relation to climate change and novel feed resources. *Journal of Science of Food Agriculture* 100: 3575–3586. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10338>
- Robert-Pullés M, Agramonte HM, Cruz AM, Cruz ME. 2010. Evaluación microbiológica del sistema de cama profunda en la crianza porcina. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas* 41: 1–10.
- Rondón YMR, Humberto E, Araque M, Farfán CJL, Mora F. 2014. Efecto de dos tipos de material de cama profunda sobre la carga parasitaria de cerdos en crecimiento y engorde alojados en cama profunda. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 55: 42–52.
- Santos-Barrios L, Martínez-Castañeda FE, Gómez-Demetrio W, Sánchez-Vera E, Ruiz-Torres M. 2017. Percepciones de bienestar social relacionadas con la producción de cerdos de traspatio

- en zonas peri-urbanas. Universidad Autónoma del Estado de México: Ciudad de México. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/104760>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Resumen Nacional. http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp (Retrieved: February 2022).
- Siroka Z, Svoboda M, Svobodova Z, Nalgi I. 2019. A case of diquat poisoning in pigs. *Veterinárni Medicina* 64 (11): 505–511. <https://doi.org/10.17221/87/2019-VETMED>
- Solís-Tejeda MÁ, Lango-Reynoso F, Castañeda-Chávez MR, Ruelas-Monjardin LC. 2021a. Analysis of the environmental impact generated by backyard swine production in Tepetlán, Veracruz, Mexico. *Agrorproductividad* 14: 1–7. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i6.1875>
- Solís-Tejeda MÁ, Lango-Reynoso F, Díaz-Rivera P, Aguilar-Ávila J, Asiain-Hoyos A, Pérez-Hernández P. 2021b. Constructed wetlands as alternatives for swine sustainability. *Agroproductividad* 14 (12): 181–188. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i12.2146>
- Tepper R, González C, Figueroa R, Araque H, Sulbarán L. 2012. Efecto de la alimentación con recursos alternativos sobre la cría de cerdos en cama profunda. *Avances en Investigación Agropecuaria* 16 (2): 23–34.
- Vásquez-Castro E, Millones-Chanamé C. 2021. Una revisión sobre la diversidad microbiana y su rol en el compostaje aerobio. *Aporte Santiaguino* 14 (2): 253–275. <https://doi.org/10.32911/as.2021.v14.n2.822>
- Ventura B, Loss A, Giumbelli L, Ferreira G, Bueno A, Lourenzi C, Comin J, Brunetto G. 2018. Carbono, nitrógeno y sustancias húmicas en agregados biogénicos y fisiogénicos de un suelo con historia de 10 años de aplicaciones sucesivas de desechos porcinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 21 (2): 329–343.
- Zhou C, Hu J, Zhang B, Tan Z. 2014. Gaseous emissions, growth performance and pork quality of pigs housed in deep-litter system compared to concrete-floor system. *Animal Science Journal* 86 (4): 422–427. <https://doi.org/10.1111/asj.12311>

SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CERDOS EN CAMA PROFUNDA COMO ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA PEQUEÑOS PRODUCTORES

Miguel Ángel Solís-Tejeda¹, Fabiola Lango-Reynoso², Pablo Díaz-Rivera¹, Jorge Aguilar-Ávila³, Alberto Asiain-Hoyos¹, Ponciano Pérez-Hernández^{1*}

¹ Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Carretera Federal Xalapa-Veracruz km 88.5, Tepetates, Manlio F. Altamirano, Veracruz, México. C. P. 91690.

² Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Boca del Río. Carretera Federal Veracruz-Córdoba km 12, Boca del Río, Veracruz, México. C. P. 94290.

³ Universidad Autónoma Chapingo. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial. Carretera Federal México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

* Autor para correspondencia: pperez@colpos.mx

RESUMEN

Los pequeños productores de traspatio efectúan la producción de cerdo principalmente en piso firme de cemento, lo que genera aguas residuales ricas en sustancias nitrogenadas creadas por el continuo lavado de las zahurdas. El objetivo de este estudio fue integrar una revisión sistemática de la información sobre el sistema de producción de cerdos en cama profunda (SPCCP) como alternativa ambientalmente sostenible para pequeños productores en México. El SPCCP utiliza una capa de material orgánico absorbente, sobre la cual se mantienen los animales. Esta tecnología se considera económica para su implementación, pues requiere menos infraestructura. La altura de la cama que favorece la transformación de la materia orgánica es de 50 a 60 cm. Para elaborar la cama se pueden utilizar subproductos agrícolas como biomasa vegetal o rastrojos. Los parámetros productivos de cerdos en cama profunda (CP) son adecuados, con menor costo de mano de obra y los animales tienen más tiempo en comer, beber y jugar, lo que mejora su bienestar. El producto obtenido de la cama profunda al final del ciclo productivo cuenta con propiedades deseables para regenerar suelos degradados o enriquecer suelos y pueden usarse en cultivos agrícolas. El SPCCP es sencillo y eficiente, la infraestructura y equipo requerido son más económicos, mejora la conversión alimenticia y la ganancia diaria de peso, beneficia la sanidad y el confort de los animales. Debido a que con este sistema no se requiere lavar las zahurdas, se disminuye el trabajo, reducen las necesidades de agua y no genera aguas residuales. Por lo anterior, el SPCCP cumple con características técnicas, financieras, ambientales y de bienestar animal, y es una alternativa para pequeños productores de traspatio.

Palabras clave: ahorro de agua, materiales para cama profunda, compostaje de la cama, bienestar animal.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la carne de cerdo tiene una alta demanda. Sin embargo, es una actividad que impacta al medio ambiente; sobre todo la porcicultura tradicional que genera

Citation: Solís-Tejeda MA, Lango-Reynoso F, Díaz-Rivera P, Aguilar-Ávila J, Asiain-Hoyos A, Pérez-Hernández P. 2022. Sistema de producción de cerdos en cama profunda como alternativa sostenible para pequeños productores. *Agrociencia*. 56(6): 1104-1132. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2755>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: May 19, 2022.
Approved: August 07, 2022.
Published in Agrociencia:
October 27, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



gases de efecto invernadero, así como acidifica suelos y causa eutrofización en humedales naturales (Ottosen *et al.*, 2021).

En México en 2021, se produjeron 1 523 540 Mg de carne de cerdo en canal. El estado de Veracruz es el quinto productor más importante con 137 602 Mg. Como complemento a lo anterior, se estima una importación de 1 025 000 Mg en el mismo año, lo cual refleja una oportunidad para aumentar la oferta del producto en el país (SIAP, 2021). Para alcanzar esta producción, con el Programa Fomento Ganadero creado en 2014 se otorgaron incentivos económicos para la ampliación de granjas en comunidades de alta y muy alta marginación. Lo anterior aumentó el número de granjas de producción de cerdo de traspatio (IICA, 2016).

La producción de cerdo en México suele realizarse en sistemas tradicionales (ST) sobre piso firme de cemento; esta característica prevalece en los pequeños productores de traspatio. Los ST generan aguas residuales de forma continua por el lavado de las zahurdas. Las aguas residuales porcinas contienen orina, excremento, residuos de alimentos y diversos químicos de limpieza. Estas aguas se descargan sin tratar indiscriminadamente en suelos, cuerpos de agua o drenajes no diseñados para este tipo de descargas. Los pequeños productores de cerdos de traspatio no están identificados de manera oficial, y al no tener sistemas para el tratamiento de aguas residuales se puede asumir que incumplen la normativa (Solís-Tejeda *et al.*, 2021a). Las normas vigentes que regulan las descargas de aguas residuales en México son la NOM-001-SEMARNAT-2021 y la NOM-002-SEMARNAT-1996 (Solís-Tejeda *et al.*, 2021b).

Para evitar el impacto al medio, en especial a los cuerpos de agua, se han diseñado modelos de evaluación de tierra para la porcicultura. Con estos modelos es posible técnicamente diseñar programas de ordenamiento territorial y minimizar el impacto a los cuerpos de agua (Bautista-Zuñiga y Aguilar-Duarte, 2021). Sin embargo, es difícil limitar el establecimiento de las granjas pequeñas de traspatio que, aunque por su tamaño no se considera que impacten significativamente, ha aumentado su número en algunos pueblos de México en años recientes (Solís-Tejeda *et al.*, 2021b).

El interés por disminuir el efecto contaminante de la porcicultura a nivel mundial ha llevado al desarrollo de sistemas de ganadería de precisión. El propósito de estos sistemas es mejorar la eficiencia en el suministro de insumos, disminuir los desechos y mejorar la sustentabilidad. Una alternativa para lograr lo anterior, es contar con sistemas de monitoreo y control continuo automatizado que permita la evaluación de la producción, reproducción, sanidad, bienestar animal e impacto ambiental en tiempo real. Con esta tecnología es posible proporcionar la cantidad de nutrientes óptima que el animal en lo individual requiere, considerar los cambios inmediatos de necesidades para el animal y disminuir los desechos al ambiente (Rauw *et al.*, 2020). Con esta forma de producción es posible reducir hasta el 37 % en el potencial de calentamiento global, 21 % del potencial de acidificación terrestre, y 22 % en el potencial de eutrofización de los cuerpos de agua dulce (Ottosen *et al.*, 2021). Sin embargo, la inversión alta y la necesidad de capacitación complican que esta tecnología pueda llegar hasta los pequeños productores de traspatio.

Los biodigestores pueden reducir la producción de metano (CH₄) y proporcionar energía eléctrica a las granjas; sin embargo, no se recuperan los costos de inversión y los productores pierden interés en ellos. Además, los biodigestores no contribuyen a la reducción del consumo y contaminación de agua (Pérez-Espejo y Cervantes-Hernández, 2018).

La producción de cerdo aporta diversos productos del nitrógeno a los cuerpos de agua naturales, entre los cuales se encuentran los nitratos y nitritos (Solís-Tejeda *et al.*, 2021b). Los productos del nitrógeno ocasionan eutrofización en los cuerpos de agua y su concentración alta en aire y suelo ocasiona desequilibrios ambientales. No obstante, el nitrógeno es parte indispensable en los seres vivos y es el elemento clave para la fertilización agrícola y se encuentra en abundancia en el excremento de animales como el cerdo. La fertilización de cultivos con productos orgánicos, como las heces fecales de cerdo, es una oportunidad para la disminución de fertilizantes químicos, a la vez de reducir el aporte de nitrógeno al medio ambiente (Ndue y Pál, 2022).

Las granjas de cerdos con ST de traspatio en México se caracterizan por ser una fracción de la casa de la familia productora. Este tipo de pequeñas granjas cuentan con infraestructura productiva básica como zahurdas con paredes de concreto, block, ladrillo o madera; piso firme de cemento; techos de lámina; escaso equipamiento y desagües directos sin tratamiento, a drenajes municipales o potreros (Santos-Barrios *et al.*, 2017; Solís-Tejeda *et al.*, 2021a). Es posible adaptar esos ST a SPCCP. La CP es un sustrato vegetal que sustituye al firme de concreto en donde el nitrógeno orgánico que proviene de la orina y heces fecales de los animales forma una composta *in situ*. Este proceso tiene como resultado un abono con características agrícolas (Rondón *et al.*, 2014). Sin embargo, es necesario recopilar y ordenar la información que se ha generado sobre la producción de cerdos en CP para identificar sus potencialidades y facilitar su transferencia tecnológica a los pequeños productores en campo.

Con base en la hipótesis, que la CP permite mejorar el bienestar animal y reducir el impacto ambiental de la porcicultura sin afectar el comportamiento productivo de los cerdos; el objetivo del estudio fue integrar una revisión sistemática de la información sobre el sistema de producción de cerdos en cama profunda (SPCCP) como alternativa ambiental sostenible para pequeños productores en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

La información de esta revisión sistemática se extrajo de las bases de datos Google Scholar, Scielo y Scopus. Los términos de búsqueda utilizados en inglés y español fueron producción de cerdo en cama profunda (58 resultados), compostaje de cama profunda para cerdos (1160 resultados).

Como criterio de exclusión se determinó considerar no sólo artículos científicos, sino también libros, capítulos de libros y páginas oficiales actualizadas del gobierno de México que mostraran ciertos criterios de calidad.

Además, se utilizó la metodología “bola de nieve” en donde una bibliografía nos llevó a otras (Munn *et al.*, 2018). Se priorizó la literatura de los últimos diez años; sin embar-

go, se aceptaron trabajos más antiguos de acuerdo con la relevancia de información generada para esta revisión.

Los artículos seleccionados se agruparon en los temas: características de la CP, parámetros productivos de los cerdos en la CP, proceso de degradación de la materia orgánica, aporte de la CP al cuidado del agua y al bienestar animal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La CP es una tecnología utilizada para la producción de diversos animales de granja, entre ellos el cerdo; consiste en la utilización de una capa de material orgánico absorbente como soporte, sobre el cual se mantienen los animales. Sobre este material los animales depositan su excremento y orina durante todo el ciclo productivo. Los microorganismos encargados de la descomposición de la materia orgánica crecen en el sustrato y descomponen las excretas, orina y residuos de alimentos de los animales, muy similar a un proceso de compostaje. La velocidad en la que el proceso de compostaje de la cama se efectúa depende del sustrato, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura (Campiño-Espinosa y Ocampo, 2007).

Esta tecnología de producción de cerdo se considera económica para su implementación, pues requiere menos infraestructura que el ST sobre piso. Es posible reutilizar y adaptar instalaciones productivas en desuso por medio de pequeñas adecuaciones con materiales de la región (Cruz *et al.*, 2010).

El uso de la CP en la producción de cerdos se originó en China en la década de los 70s. Se ha adoptado en Europa, Estados Unidos de América, Venezuela, México, entre otros países, donde es una alternativa de producción amigable con el medio ambiente. Este sistema no requiere se lave el piso de las zahurdas, por lo tanto, se evita la generación de aguas residuales contaminadas, la presencia de moscas y malos olores en las explotaciones (Robert-Pullés *et al.*, 2010).

El SPCCP reduce los costos operativos, resuelve el problema de la generación de excretas y purines, y promueve un bienestar mayor a los animales. Todo lo cual resulta en la mejora de sus parámetros productivos y la calidad de su carne. Por lo anterior se considera una opción para lograr la viabilidad técnica, económica y ambiental; a la par del bienestar animal en la producción de cerdos (Li *et al.*, 2017).

La densidad, programas de alimentación y el manejo productivo en SPCCP son similares al manejo con ST. Sin embargo, con tecnología SPCCP se obtienen ventajas financieras y ambientales por una menor conversión alimenticia (CA) y la ausencia de aguas residuales. Por lo anterior, el SPCCP es una alternativa factible de adoptar en producciones de cerdo en pequeña escala (Cruz y Almaguel, 2013). La disminución del consumo de alimento y CA se debe a que los cerdos requieren menos energía en los sistemas con CP que con piso para poder regular su temperatura.

Características de la cama profunda para la producción de cerdos

El fundamento de este sistema es criar a los animales sobre un sustrato de materia vegetal denominado cama. La altura de la cama necesaria para favorecer el proceso de transformación de la materia orgánica es de entre 50 y 60 cm (Rondón *et al.*, 2014;

Cruz *et al.*, 2017; Caicedo *et al.*, 2021). Para ello es viable la utilización de subproductos agrícolas como biomasas o rastrojos que son agentes de carga con bajo contenido de humedad y alto contenido de carbono orgánico (Bernal *et al.*, 2008). La cantidad en kg de CP por animal varía de acuerdo con el material y altura que se determine manejar. Por ejemplo, para una altura de 50 cm se debe suministrar 107.32 kg de heno de gramíneas o 84.15 kg de cascarilla de arroz (Rondón *et al.*, 2014).

Para la elección del material de la cama se debe considerar la comodidad de los animales. La fricción del material es importante para evitar resbalones y golpes. La abrasividad y dureza altas o bajas provocan deformaciones en pezuñas, crecimiento asimétrico y lesiones. El material debe carecer de bordes afilados que puedan penetrar la piel y debe tener buen aislamiento y conducción térmica que favorezca la postura natural de los animales (Lensink *et al.*, 2013). Algunos materiales estudiados como CP en la producción porcina se presentan en el Cuadro 1.

Campiño-Espinoza y Ocampo (2007) evaluaron dos densidades de material de CP, 350 y 450 kg por animal, con racimos vacíos de palma de aceite; concluyeron que a mayor cantidad de material se presenta una mayor temperatura, lo cual favorece los procesos biooxidativos. Además, se ha probado el SPCCP en un corral dual de maternidad. Para ello, se utilizaron bagazo de caña seco, plantas de arroz, de maíz, heno y viruta de madera, como materiales de la cama. La mortalidad en cría se registró por debajo del 3 %, y se obtuvieron pesos al destete de 7 kg a los 26 días del nacimiento (Cruz *et al.*, 2017). Otros materiales que pueden ser eficientes para el establecimiento de la CP son: heno, cascarilla de arroz o de café, hojas de maíz, bagazo seco de caña de azúcar, paja de trigo, paja de soya o la mezcla de ellos. Es importante considerar que los materiales deben encontrarse secos (Cruz *et al.*, 2011). Sin embargo, hay que tener en cuenta factores como la emisión de amonio que puede variar de acuerdo con material de la cama. Rondón *et al.* (2014) encontraron que una cama de heno de gramíneas puede

Cuadro 1. Materiales utilizados y altura de la cama profunda evaluados en la producción de cerdos.

Material	Altura de la cama (cm)	Autor
80 % bagazo de caña, 20 % gramíneas	55	Cruz <i>et al.</i> , 2010; 2011
Heno de gramíneas	55	Cruz <i>et al.</i> , 2010
Heno de gramíneas	60	Tepper <i>et al.</i> , 2012
Heno de gramíneas	55	Cruz and Almaguel, 2013
Heno de gramíneas	50	Rondón <i>et al.</i> , 2014
Cascarilla de arroz	50	Rondón <i>et al.</i> , 2014
Heno de gramíneas	50 y 55	Cruz <i>et al.</i> , 2017
Heno de pasto estrella	50	Cruz <i>et al.</i> , 2017
Heno de pangola	50	Cruz <i>et al.</i> , 2017
50 % bagazo de caña y 50 % heno de pasto estrella	50	Cruz <i>et al.</i> , 2017
50 % King Grass, 30 % bagazo de caña y 20 % de heno de pasto estrella	50	Cruz <i>et al.</i> , 2017

emitir 6.59 mg m^{-3} de amonio; mientras que una cama de cascarilla de arroz 2.31 mg m^{-3} . El tejido fibroso del heno de gramíneas absorbe mayor cantidad de orina rica en amonio y acelera el compostaje del mismo heno de la cama. Lo anterior resulta en una mayor emisión de amonio al ambiente. Por lo anterior, se considera a la cascarilla de arroz como un material excelente, con tamaño adecuado de partícula, para el proceso de compostaje que se realiza en CP. En contraste, el heno de gramíneas provee más nutrientes útiles para la agricultura debido a que la cascarilla de arroz está constituida por celulosa, lignina y minerales como el sílice.

La viruta, como material de la cama, guarda la humedad y suciedad. La humedad en la CP promueve la formación de *Listeria monocytogenes* bacterias formadoras de esporas y *Escherichia coli*, entre otras. Estos patógenos pueden ser perjudiciales para los animales (Johanssen *et al.*, 2018). La viruta de pino contiene resinas que inhiben el desarrollo bacteriano, lo cual puede afectar el proceso de compostaje (Lensink *et al.*, 2013); debido a esto no es muy recomendable para el propósito.

Es importante considerar el tamaño de la partícula vegetal. Una partícula de 5 mm de longitud favorece el proceso de compostaje en la CP y se minimiza la formación de bacterias (Li *et al.*, 2017). Lo anterior mejora la infiltración de la orina y la circulación del aire a través de la cama. También, los cerdos al hozar revuelven las partículas pequeñas con facilidad. El movimiento continuo de la cama oxigena el material y dificulta la fermentación no deseable de la materia orgánica; así como limita el desarrollo de parásitos y patógenos (Rondón *et al.*, 2014).

La cama tiene un periodo de vida, el cual depende del material con que se elaboró entre otros factores. Aunque por costos se procura conservar una misma cama el mayor tiempo posible, su duración dependerá de la degradación del material. Por ejemplo, una cama elaborada con paja de trigo se puede mantener durante tres periodos de engorda con resultados positivos, mientras las elaboradas con bagazo de caña se suelen cambiar al final de cada ciclo de producción (Arango *et al.*, 2012). Además, se ha observado que los cerdos en el SPCCP tienden a definir tres zonas en un corral: la zona sucia, en donde ocurre la mayoría de las deposiciones; la zona húmeda, cercana a las tomas de agua; y la zona limpia, que es el espacio utilizado para descansar (Campiño-Espinosa y Ocampo, 2007).

Mientras avanza el proceso productivo, los cerdos mueven el material de la CP de la zona limpia a la sucia; lo cual resalta los límites de las zonas a diferencia de la producción tradicional (Rondón *et al.*, 2014). Esto debe monitorearse y se debe suministrar el material requerido que garantice la altura de la cama. Por otra parte, se debe considerar la inocuidad del material de la cama. Siroca *et al.* (2019) reportaron un caso de intoxicación de 50 cerdos en una granja comercial por consumo de material contaminado con diquat, entre el material destinado para la CP. El diquat es un herbicida utilizado para el secado del trébol.

Parámetros productivos de cerdos en el sistema de cama profunda (CP)

También es importante considerar el número de animales en la zahúrda, ya que la carga animal determina la cantidad de materia orgánica rica en nitrógeno que se pro-

ducirá. Las densidades de animales en el SPCCP son similares a las del ST con piso de concreto (Cruz *et al.*, 2011; Cruz y Almaguel, 2013; Rondón *et al.*, 2014). Los parámetros productivos de los cerdos en el SPCCP demuestran una viabilidad productiva adecuada en densidades altas (Cuadro 2).

Los resultados de Cruz *et al.* (2010) mostraron un mejor desempeño productivo de cerdos en el SPCCP en comparación con el ST. Los cerdos en CP disminuyeron el consumo de alimento al igual que las necesidades energéticas; los autores mostraron que la CP mejoró la CA entre 0.25 y 0.21 respecto al ST y la GDP fue 14 g d⁻¹ mayor en comparación con el ST. Esto difiere con el estudio de Arango *et al.* (2012) quienes no encontraron diferencia en la GDP ni en CA entre los sistemas; sin embargo, el consumo diario de alimento fue 300 g d⁻¹ menor por animal en la fase de engorda. Además, el ST presentó una morbilidad alta de 27.7 %, en contraste con el 16.6 % de los animales desarrollados sobre una cama de heno y el 11.1 % de los animales producidos en cama de una mezcla de 80 % bagazo y 20 % heno. Los resultados son consistentes con el SPCCP evaluado por Cruz *et al.* (2011) quienes presentaron indicadores de CA de 0.12, y GDP de 23 g d⁻¹ superiores a los de ST con piso de concreto. También coinciden con Cruz y Almaguel (2013) quienes registraron una morbilidad de 22.2 % en la CP, en contraste con el 55.5 % de morbilidad y un animal muerto en el ST.

Cruz *et al.* (2017) registraron el crecimiento de cerdos en el SPCCP en tres granjas de particulares. Los valores obtenidos por los productores fueron en promedio una CA de 3.4, una GDP de 650 g d⁻¹ y un peso final de 99 kg durante 120 d. También, proporcionaron registros sobre el desarrollo de una piara a partir del destete con 8.2 kg en el

Cuadro 2. Indicadores productivos de cerdos en el sistema de cama profunda.

Indicadores productivos							Autor
ÁD	DA	CA (kg)	GDP (g)	PI (kg)	PF (kg)	TP (d)	
1.50	0.67	2.69	652	24.86	96.58	110	Campiño-Espinoza and Ocampo, 2007
1.35	0.74	2.71	611	24.86	92.04	110	Campiño-Espinoza and Ocampo, 2007
1.44	0.69	3.38	740	21.21	99.60	106	Cruz <i>et al.</i> , 2010
1.44	0.69	3.42	739	21.18	99.51	106	Cruz <i>et al.</i> , 2010
1.40	0.71	2.84	727	22.60	95.30	100	Cruz <i>et al.</i> , 2011
4.50	0.22	1.76	745	22.27	43.19	28	Tepper <i>et al.</i> , 2012
1.44	0.69	3.08	747	-	-	-	Cruz and Almaguel, 2013
1.37	0.73	-	-	30.00	110.00	90	Rondón <i>et al.</i> , 2014
1.40	0.71	3.42	739	21.18	99.51	106	Cruz <i>et al.</i> , 2017
1.40	0.71	3.40	650	21.18	99.00	120	Cruz <i>et al.</i> , 2017

AD: área disponible, m² por animal, DA: densidad animal, número de animales por m², CA: conversión alimenticia, GDP: ganancia diaria de peso, PI: peso inicial, PF: peso final, TP: tiempo de producción.

SPCCP. Estos últimos animales alcanzaron los 95 kg con GDP de 600 g d⁻¹. El residuo de la CP se utilizó como abono en los cultivos de la finca.

Aké-Chalé *et al.* (2014) no encontraron diferencias significativas en el número de lechones vivos y destetados a los 28 d para vientres porcinos en ST y con CP de rastrojo de maíz. Sin embargo, el peso inicial (22 g) y al destete (1.12 kg) de los lechones fue superior. Hurtado *et al.* (2021) desarrollaron modelos estadísticos no lineales para la producción de cerdos en CP de cascarilla de arroz y rastrojos de maíz. Estos modelos pueden predecir el desarrollo de las pjaras; de esta manera es posible determinar con anticipación las necesidades fisiológicas de los animales. Los modelos reflejan las necesidades de alimentación y la disminución de crecimiento cuando se alcanza el máximo estándar genético. Esto ayuda a lograr una producción precisa de cerdos en CP.

En lo referente a las características de la canal del SPCCP, de acuerdo con la revisión bibliográfica de Caicedo *et al.* (2021), el rendimiento de la carne de cerdos producidos en CP no indicó diferencia significativa comparado con los producidos en ST. Los cerdos finalizados de 110 kg presentan 21.8 mm de grasa dorsal, 41.3 cm² de chuleta, 51.1 % de carne magra y 74.9 % de rendimiento de canal; en contraste con los cerdos en ST que presentaron 20.8 mm de grasa dorsal, 43 cm² de chuleta, 52.1 % de carne magra y 75.8 % de rendimiento de canal. Sin embargo, el costo de la mano de obra por el concepto de cuidado de los animales se redujo a una cuarta parte con las CP y los animales dedican 133 % más tiempo para comer, beber y jugar (Honeyman y Harmon, 2003), lo cual podría favorecer su bienestar.

Kidega *et al.* (2021) encontraron que al inocular diariamente una solución de microorganismos autóctonos provenientes de la descomposición del fondo de la CP sobre el material de la cama se redujo la temperatura de la cama. Lo anterior generó una reducción en la grasa dorsal del cuello de los animales de 1.7 cm y 1.8 por encima de los hombros de los animales en comparación con el ST. El efecto de la cama inoculada sobre la reducción de grasa en el cerdo coincide con Zhou *et al.* (2014) quienes reportaron 2.19 % menos grasa y 1.96 % más carne magra, para cerdos con CP de aserrín y paja en proporción 5:7 inoculada con Sacaromycetes, *Bacillus subtilis* y Actinomycetes en contraste con el ST.

Proceso de degradación de la materia orgánica en la cama profunda durante la estancia de los cerdos

Durante la producción de los cerdos, el material que compone la CP en la zahúrda es sometido a un proceso bioxidativo (en presencia del oxígeno). Las bacterias, hongos y otros microorganismos que surgen en la descomposición orgánica mineralizan y humifican (generan humus) parcialmente el excremento, la orina y el material de la cama. Lo anterior, logra como resultado un producto estable con propiedades deseables para la regeneración de suelos degradados o el enriquecimiento de suelos de cultivo (Figura 1) (Bernal *et al.*, 2008).

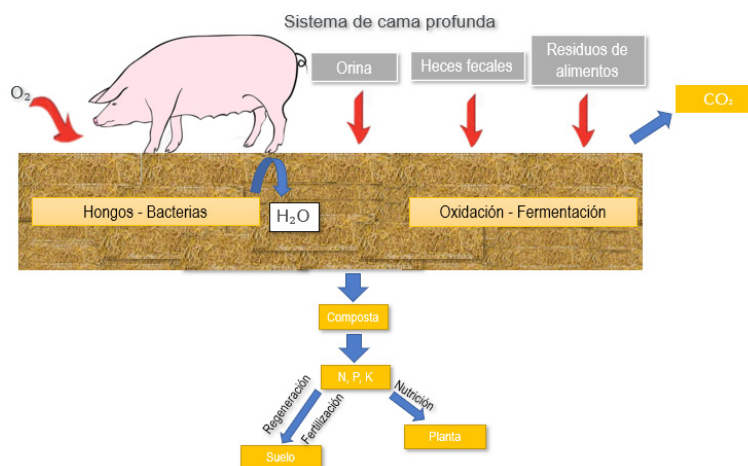


Figura 1. Generación de composta a partir de la cama profunda.

El compostaje se realiza en dos etapas, la primera o mesofílica, se determina por la concentración de nutrientes y microorganismos, generalmente degradadores de carbohidratos; los microorganismos presentes en las heces degradan los nutrientes disponibles en el sustrato fibroso y en los restos de alimentos. En la segunda etapa, o termófila, la actividad microbiana genera una elevación en la temperatura de la composta. La velocidad de este proceso y la temperatura difieren entre las zonas de la cama. En la zona limpia se presenta la temperatura más alta hasta 52 °C, seguida por la zona húmeda de 48 °C y la sucia de 43 °C. Durante esta fase se reduce el número de los microorganismos, como *Pseudomonas* y *Flexibacter*, presentes por la acción térmica (Campiño-Espinosa y Ocampo, 2007).

Debido a la heterogeneidad del proceso, en lo referente a la humedad y temperatura alcanzadas, no es posible garantizar una esterilización apropiada del sustrato. Además, Rober-Pullés *et al.* (2010) recomendaron que el sistema requiere de una vigilancia sanitaria para su implementación segura, para controlar la presencia en el sistema de coliformes fecales, hongos y levaduras, aerobios mesófilos viables y la posible presencia de patógenos no estudiados. Por estas razones, este proceso debe considerarse como un pre-compostaje y el producto debería someterse a un proceso propio de compostaje de acuerdo con la Norma NMX-AA-180-SCFI-2018, para su utilización segura en los sistemas agrícolas. Finalmente, se presenta la etapa de enfriamiento y maduración, o madurez y estabilidad de la composta resultante, en la cual se desarrollan hongos y levaduras. En esta fase se correlaciona la presencia de miembros de las familias de bacterias Pseudonocardiaaceae, Streptomycetaceae, Brevibacteriaceae (Actinobacteria) y Bacillaceae (Firmicutes). Estos microorganismos se asocian con la degradación y mineralización de la materia orgánica para la generación de las sustancias húmicas (Vásquez-Castro y Millones-Chanamé, 2021).

Para el desarrollo de las fases de compostaje de los materiales de la cama es muy importante la relación del sustrato con los microorganismos. La composición de las

comunidades microbianas que se desarrollen dependerá de los parámetros fisicoquímicos de la materia orgánica. Así, en composta de excremento de cerdo y paja de arroz se han identificado hongos de los géneros *Ascomycota*, *Basidiomycota*, y *Zygomycota*; mientras que en una mezcla de excremento de cerdo con escoria fina de gasificación de carbón se hallaron *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota* y *Mucoromycota* (Vásquez-Castro y Millones-Chanamé, 2021).

El nitrógeno orgánico contenido en el excremento y orina de los animales se degrada por los microorganismos en amonio (NH_4^+). Parte del nitrógeno, se libera al ambiente como gas de amoníaco (NH_3), o continúa su oxidación a través del proceso de nitrificación-desnitrificación hasta óxido nitroso (N_2O) o dinitrógeno (N_2), que se liberan al ambiente como gases (Figura 2). El nitrógeno se volatiliza hasta un 77 % como NH_3 y N_2 . La pérdida de nitrógeno dependerá de factores como la concentración inicial de la cama, la humedad, la relación C:N, y la oxigenación generada principalmente por el movimiento de los animales sobre la cama (Maeda *et al.*, 2011).

El resultado final de la descomposición de los sustratos de la CP es una mezcla estabilizada de nutrientes para la agricultura. Por ejemplo, una cama de heno de gramíneas tiene como propiedades: proteína cruda 9.75 %, fibra cruda 30.99 %, grasa cruda 0.52 %, ceniza 9.29 %, nitrógeno 1.55 % y fósforo 0.65 % (Rondón *et al.*, 2014).

La adición de residuos orgánicos, en particular las excretas de cerdo, ha demostrado mejorar los indicadores de calidad del suelo. Es posible mejorar los niveles de carbono y nitrógeno, además de las sustancias húmicas. Las sustancias húmicas interactúan con el suelo, y mejoran su estructura y fertilidad (Ventura *et al.*, 2018). Agregar al suelo el resultado de la CP puede ser una estrategia factible para la regeneración y el enriquecimiento de suelos agrícolas.

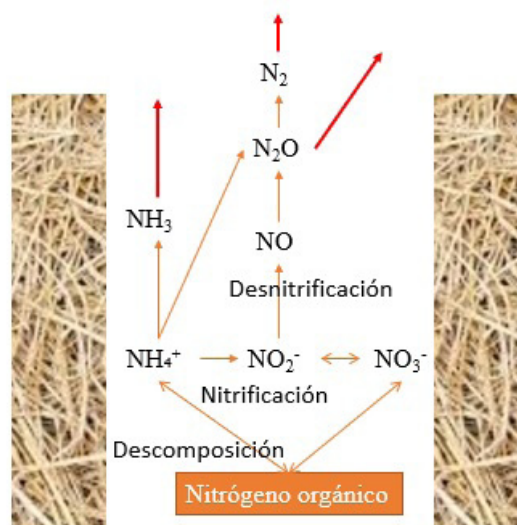


Figura 2. Proceso de degradación del nitrógeno orgánico en el sistema de producción en cama profunda (Modificado de Maeda *et al.*, 2011).

Respecto a la contaminación gaseosa, Zhou *et al.* (2014) encontraron que la emisión de NH_3 en la CP (3.3 mg m^{-3}) es menor que en el ST (19.8 mg m^{-3}). Lo mismo ocurre con el CO_2 producido en la CP (1443.3 mg m^{-3}) en contraste con el sistema de piso firme (3223.3 mg m^{-3}).

Aporte de la cama profunda en el cuidado del agua

El agua es un elemento indispensable para los cerdos, representa el 50 % del cuerpo de un animal finalizado. El consumo de agua (L d^{-1}) en el cerdo difiere por etapa fisiológica: una cerda lactante con camada consume 30.4, cerdos en desarrollo y en finalización 15.2, cerdas gestantes 22.8 y verracos 30.43 (García-Contreras *et al.*, 2012). Además, el ST con piso de concreto requiere agua diariamente para la limpieza de los pisos de las zahurdas. El gasto por este concepto es difícil de estimar en productores de traspatio, ya que existe una gran desviación estándar entre los consumos de las granjas (Solís-Tejeda *et al.*, 2021a). Una de las ventajas del SPCCP es el ahorro total de agua por concepto de un lavado de zahurdas menos frecuente.

Se ha estimado el consumo de agua ahorrado por el SPCCP en contraste con el ST en piso de concreto. Cruz *et al.* (2010) estimaron ahorrar 2.45 m^3 de agua por animal. En un ensayo de 104 d Cruz y Almaguel (2013) ahorraron 2.36 m^3 de agua por animal. A su vez, Cruz *et al.* (2017) estimaron el ahorro de agua por el SPCCP en 4.91 m^3 por animal.

El resultado del consumo de agua para la limpieza de las zahurdas es agua residual con un contenido de diversos contaminantes, como los derivados del nitrógeno, que muchas veces se vierte a los cuerpos de agua sin tratamiento (Solís-Tejeda *et al.*, 2021a). Cruz *et al.* (2010) cuantificaron la contaminación generada por aguas residuales del ST y la contrastaron con el SPCCP. El agua residual porcina generada en el sistema con piso cuenta con un alto contenido de materia orgánica cuantificada como demanda química de oxígeno (DQO) de $49\,383.33 \text{ mg L}^{-1}$ y demanda biológica de oxígeno (DBO) de $24\,166.67 \text{ mg L}^{-1}$; además de 3.9×10^4 número más probable (NMP) (100)⁻¹ coliformes fecales, 1.9×10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) ml^{-1} *Salmonella* sp. y huevos de helmintos. Estos indicadores permanecen ausentes en el SPCCP después de dos ciclos de producción en 106 d en total.

Bienestar animal en el sistema de producción de cerdos en cama profunda

A nivel mundial se incrementa la conciencia e interés por el bienestar animal (Cruz *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2018). Los productores son responsables de proporcionar bienestar a los cerdos. Por lo que se han generado diversas opiniones éticas, productivas y económicas sobre los sistemas de producción intensiva. La producción intensiva ha ignorado este interés con el pretexto de aumentar la cantidad de alimentos disponibles, los animales se someten a estrés y medicamentos para su control (Caicedo *et al.*, 2021).

En la producción intensiva en piso de concreto, el estrés en los cerdos ha dado como resultado la agresividad entre los animales de la piara, aparecen la caudofagia y

diversas lesiones. La CP ha logrado evitar estos desórdenes sociales en densidades altas de producción de 1.4 m² por animal. Los cerdos en CP muestran una actitud más natural y relajada. Utilizan el material de la cama para hozar, y se pueden percibir jugueteo entre ellos (Cruz *et al.*, 2011). Por otro lado, en la CP se evita la humedad y se disminuye la incidencia de enfermedades respiratorias. También se evitan las lesiones de las extremidades por caídas y ablandamiento de pezuñas por humedad (Cruz y Almaguel, 2013).

Las moscas suelen ser un problema para los productores, la comunidad que rodea a las instalaciones y para los cerdos (Caicedo *et al.*, 2021). Las moscas pueden ser vectores de enfermedades. El aumento de temperatura del material de la cama durante el proceso de compostaje mata a los huevos y larvas de moscas, al igual que otros insectos que ocasionan lesiones a los animales. La cama de cascarilla de arroz ha demostrado ser más efectiva en la reducción de parásitos en comparación con la cama de heno de gramíneas y el manejo tradicional en piso (Rondón *et al.*, 2014).

En general, las enfermedades en la piel de los cerdos causadas por ectoparásitos son comunes y afectan el bienestar animal; además, ocasionan reducción de las tasas de crecimiento, afectan la CA, y aumentan la morbilidad y mortalidad. El SPCCP beneficia la sanidad de los animales; para lograrlo, es necesario mantener la CP seca y renovar la totalidad de la cama antes de la saturación por heces fecales. Una CP saturada de heces fecales beneficia la reproducción y transmisión de parásitos como la sarna sarcóptica (Fernández *et al.*, 2018).

Otra ventaja de la CP es que proporciona confort a los animales al elevar su temperatura durante los días fríos. El sustrato seco y tibio mejora el bienestar en contraste con un piso húmedo y frío. Esta característica mejora la tasa de ocupación de los corrales y aporta una mayor área deseable a los animales para echarse (Milera-Rodríguez, 2022). Sin embargo, es un factor de consideración en días calurosos, en donde será necesario ventilar el área para el bienestar de los animales (Cruz *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

La producción de cerdo en cama profunda es una tecnología sencilla y eficiente. Es posible utilizar diversos subproductos agrícolas, disponibles en la región en donde se establezcan las granjas, como material de la cama. La infraestructura y equipo requerido para esta forma de producción son más económicos que en el sistema tradicional con piso de concreto.

Los indicadores productivos como conversión alimenticia y ganancia diaria de peso son superiores en el sistema de producción con cama profunda en igualdad de tiempo y densidad que en el sistema tradicional de traspatio. No se requiere lavar las zahurdas, disminuye el trabajo, se reducen las necesidades de agua y no se generan aguas residuales. Según la literatura analizada los animales presentan comportamientos más naturales y se evita el estrés. Al final del ciclo productivo, la cama es un excelente producto que se puede utilizar en cultivos agrícolas.

La cama profunda cumple con características técnicas, financieras, ambientales y de bienestar animal para su adopción por pequeños productores de cerdo de traspatio con sistema tradicional en México. Sin embargo, para su eficiente transferencia tecnológica a los productores es necesario estudiar su comportamiento en las distintas regiones climáticas del trópico mexicano; así como facilitar la información de materiales disponibles para la elaboración de camas profundas apropiadas por región.

REFERENCIAS

- Aké-Chalé JA, González-Canché IÁ, González-Araujo C, Giacomán-Vallejos G, Sanginés-García JR. 2014. Comportamiento reproductivo de cerdas gestantes en un sistema de cama profunda y su efecto sobre el ambiente. *Revista Científica FCV LUZ* 26 (3): 239–247.
- Arango CFE, Alvarez HE, Hurtado NVL. 2012. Análisis comparativo de la ceba de cerdos en un sistema de cama profunda y piso de concreto en una granja comercial de Villavicencio, Colombia. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos* 3 (1): 36–56. <https://doi.org/10.22579/22484817.592>
- Bautista-Zuñiga F, Aguilar-Duarte Y. 2021. Evaluación de la aptitud de tierras para el desarrollo de la porcicultura a escala regional en Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 24 (1): 1–13.
- Bernal MP, Albuquerque JA, Moral R. 2008. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology* 100: 5444–5453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>
- Caicedo W, Ramos D, Zhunaula V. 2021. Management of the deep bedding system in pig farming: An alternative to improve production and animal welfare in the Ecuadorian Amazon. *MDPI sciforum* 1–4. <https://sciforum.net/manuscripts/11236/manuscript.pdf> (Recuperado: febrero 2022).
- Campiño-Espinosa GP, Ocampo DA. 2007. Comportamiento de la temperatura de la cama profunda de cerdos de engorde utilizando racimos vacíos de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. *Orinoquia* 11: 65–74.
- Cruz ME, Almaguel GRE, Maderos CM, Ly J. 2010. Uso de camas profundas en el sistema de engorde de cerdos en el sector campesino en Cuba. *Zootecnia Tropical* 28: 183–191.
- Cruz ME, Almaguel GRE, Ramiro E, Ly J. 2011. Evaluación del bienestar animal de cerdos en crecimiento ceba alojados en sistema de cama profunda. *Revista Electrónica de Veterinaria* 12: 1–9.
- Cruz ME, Almaguel GRE. 2013. Tecnología de cama profunda para producción porcina. *Agricultura Orgánica* 3: 30–33.
- Cruz ME, Almaguel RE, Mederos CM, González C, Sáez Y, Breña L, Ortiz CV, Espinosa N, Ramírez J, Camejo E, Bolaño A, González E, González MC, Rodríguez R, Rivadeneira CM, Capote G, Gómez F, Becerra JD, Ricardo O, Ríos M, Robert M, Espinosa MC, Ly J, Ramos C, López M. 2017. Evaluación y extensión de la tecnología de camas profundas en los sistemas de producción porcina del sector campesino y cooperativo en Cuba. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 24 (1): 19–24.
- Fernández JG, Trujillo M, Pereira M, González A. 2018. Sarna sarcóptica en cerdos criados en cama profunda. Reporte de caso. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 65 (3): 282–288. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v65n3.76465>
- García-Contreras AC, Ortega YDL, Yagüe AP, González JG, Artiga CG. 2012. Alimentación práctica del cerdo. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 6 (1): 21–50. https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2012.v6.n1.38718
- Honeyman MS, Harmon JD. 2003. Performance of finishing pigs in hoop structures and confinement during winter and summer. *Journal of Animal Science* 81 (7): 1663–1670. <https://doi.org/10.2527/2003.8171663x>
- Hurtado EA, Cueva-Navia T, Barba-Capote C. 2021. La modelización del crecimiento de los cerdos bajo un sistema de cama profunda. *Ciencia UNEMI* 14 (36): 1–11. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss36.2021pp1-11p>
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2016. Evaluación de diseño programa fomento ganadero. SAGARPA-CONEVAL. <https://www.agricultura.gob.mx/sites/default/files/sagarpa/document/2018/10/09/1454/09102018-s-260-programa-de-fomento-ganadero.pdf> (Recuperado: febrero 2022).

- Johanssen JRE, Sorheim KM, Strom T, Brunberg EI. 2018. Bedding hygiene, cleanliness and lying behaviour for heifers housed on Wood chip or straw deep bedding. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A-Animal Science* 68 (2): 103–111. <https://doi.org/10.1080/09064702.2019.1601763>
- Kidega K, Aliro T, Mugonola B, Ndyomugenyi EK, Okello-Uma I. 2021. Effect of different floor types on growth performance of pigs and carcass back-fat thickness. *London Journal of Research in Science: Natural and Formal* 21: 47–54.
- Lensink BJ, Ofner-Schröck E, Ventorp M, Zappavigna P, Flaba J, Georg H, Bizeray-Filoché D. 2013. Lying and walking surfaces for cattle, pigs and poultry and their impact on health, behavior and performance. *In: Livestock housing: Modern management to ensure optimal health and welfare of farm animals*. Aland A, Banhazi T. (eds.); Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, pp. 75–92. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-771-4>
- Li J, Wang J, Wang F, Wang A, Yan P. 2017. Evaluation of gaseous concentrations, bacterial diversity and microbial quantity in different layers of deep litter system. *Animal Bioscience* 30 (2): 275–283. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0282>
- Maeda K, Hanajima D, Toyoda S, Yoshida N, Morioka R, Osada T. 2011. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost. *Microbial Biotechnology* 4 (6): 700–709. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00236.x>
- Milera-Rodríguez MC. 2022. Contribución del manejo de cerdas en pastoreo a la resiliencia de los sistemas porcinos. *Pastos y Forrajes* 45: 1–12.
- Munn Z, Peters MDJ, Stern C, Tufanaru C, McArthur A, Aromataris E. 2018. Systematic review or scoping review? Guidance for authors when choosing between a systematic or scoping review approach. *BMC Medical Research Methodology* 143 (18): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12874-018-0611-x>
- Ndue K, Pál G. 2022. Life Cycle Assessment Perspective for Sectoral Adaptation to Climate Change: Environmental Impact Assessment of Pig Production. *Land* 11: 827–844. <https://doi.org/10.3390/land11060827>
- Ottosen M, Mackenzie GS, Filipe JAN, Misiura MM, Kyriazakis I. 2021. Changes in the environmental impacts of pig production systems in Great Britain over the last 18 years. *Agricultural Systems* 189: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103063>
- Pérez-Espejo RH, Cervantes-Hernández GI. 2018. Estrategias de mitigación. El programa de biodigestores en Yucatán, México. *Península* 13 (2): 235–262.
- Rauw WM, Rydhmer L, Kyriazakis I, Overland M, Gilbert H, Dekkers JC, Hermesch S, Bouquet A, Gomez-Izquierdo E, Louveau I, Gomez-Raya L. 2020. Prospects for sustainability of pig production in relation to climate change and novel feed resources. *Journal of Science of Food Agriculture* 100: 3575–3586. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10338>
- Robert-Pullés M, Agramonte HM, Cruz AM, Cruz ME. 2010. Evaluación microbiológica del sistema de cama profunda en la crianza porcina. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas* 41: 1–10.
- Rondón YMR, Humberto E, Araque M, Farfán CJL, Mora F. 2014. Efecto de dos tipos de material de cama profunda sobre la carga parasitaria de cerdos en crecimiento y engorde alojados en cama profunda. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 55: 42–52.
- Santos-Barrios L, Martínez-Castañeda FE, Gómez-Demetrio W, Sánchez-Vera E, Ruiz-Torres M. 2017. Percepciones de bienestar social relacionadas con la producción de cerdos de traspatio en zonas peri-urbanas. *Universidad Autónoma del Estado de México: Ciudad de México*. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/104760>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Resumen Nacional. http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp (Recuperado: febrero 2022).
- Siroka Z, Svoboda M, Svobodova Z, Nalgl I. 2019. A case of diquat poisoning in pigs. *Veterinarni Medicina* 64 (11): 505–511. <https://doi.org/10.17221/87/2019-VETMED>
- Solís-Tejeda MÁ, Lango-Reynoso F, Castañeda-Chávez MR, Ruelas-Monjardin LC. 2021a. Analysis of the environmental impact generated by backyard swine production in Tepetlán, Veracruz, Mexico. *Agrorproductividad* 14: 1–7. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i6.1875>
- Solís-Tejeda MÁ, Lango-Reynoso F, Díaz-Rivera P, Aguilar-Ávila J, Asiain-Hoyos A, Pérez-Hernández P. 2021b. Constructed wetlands as alternatives for swine sustainability. *Agrorproductividad* 14 (12): 181–188. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i12.2146>
- Tepper R, González C, Figueroa R, Araque H, Sulbarán L. 2012. Efecto de la alimentación con recursos alternativos sobre la cría de cerdos en cama profunda. *Avances en Investigación Agropecuaria* 16 (2): 23–34.

- Vásquez-Castro E, Millones-Chanamé C. 2021. Una revisión sobre la diversidad microbiana y su rol en el compostaje aerobio. *Aporte Santiaguino* 14 (2): 253–275. <https://doi.org/10.32911/as.2021.v14.n2.822>
- Ventura B, Loss A, Giumbelli L, Ferreira G, Bueno A, Lourenzi C, Comin J, Brunetto G. 2018. Carbono, nitrógeno y sustancias húmicas en agregados biogénicos y fisiogénicos de un suelo con historia de 10 años de aplicaciones sucesivas de desechos porcinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 21 (2): 329–343.
- Zhou C, Hu J, Zhang B, Tan Z. 2014. Gaseous emissions, growth performance and pork quality of pigs housed in deep-litter system compared to concrete-floor system. *Animal Science Journal* 86 (4): 422–427. <https://doi.org/10.1111/asj.12311>

Agrociencia

MICROPROPAGATION OF AGAVE (*Agave potatorum* Zucc.) THROUGH DIRECT ORGANOGENESIS

Marco Antonio **Ramírez-Mosqueda**¹, Rocío Guadalupe **Cárcomo-Corona**¹,
Daniel **Aguilar-Jiménez**², Jericó Jabín **Bello-Bello**^{3*}

¹ Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94953.

² Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Programa Educativo de Agrobiotecnología. Prolongación Reforma No. 168, Barrio de Santiago Mihuacán, Izúcar de Matamoros, Puebla, México. C. P. 74420.

³ CONACYT-Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94953

* Author for correspondence: jericobello@gmail.com

ABSTRACT

Populations of *Agave potatorum* Zucc. have been overexploited from their habitat for the commercial production of mezcal, a traditional Mexican liquor. Since micropropagation is the only method for cloning selected genotypes of this species, this study aimed to establish an efficient protocol for the *in vitro* propagation of *A. potatorum* using individual shoots. During the propagation stage, we evaluated the interaction between different concentrations of the cytokinin benzylaminopurine (BAP: 0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹) and the auxin indole acetic acid (IAA: 0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹). Additionally, we evaluated the interaction between different concentrations of the auxins naphthaleneacetic acid (NAA: 0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹) and IAA (0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹) during the *in vitro* rooting stage. In the propagation stage, the highest number of shoots was obtained with the combinations of 3.0 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ IAA, 1.5 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ IAA, and 3.0 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ IAA, which yielded 9.87, 9.73, and 9.73 shoots per explant, respectively. In the rooting stage, the best shoot development was observed in the control treatment and when only 3.0 mg L⁻¹ IAA was supplemented. Finally, after the rooting stage, plantlets were acclimatized and grown in the field, yielding a 98-100 % survival rate. In conclusion, the propagation protocol proposed in this study results in propagules suitable for establishment in the field.

Keywords: mezcal agave, interaction between growth regulators, propagules, *in vitro* propagation.

INTRODUCTION

In Mexico, most species of the genus *Agave* are of ecological, economic, and cultural importance. The Mexican territory is home to 150 of the 200 *Agave* species worldwide (Delgado-Lemus *et al.*, 2014a; Rangel-Landa *et al.*, 2015). Unfortunately, the intensive extraction of wild agave plants for tequila, mezcal, and pulque production has negatively impacted wild populations (Rangel-Landa *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015).

Citation: Ramírez-Mosqueda MA, Cárcomo-Corona RG, Aguilar-Jiménez D, Bello-Bello JJ. 2022. Título en minúsculas de la Micropropagation of Agave (*Agave potatorum* Zucc.) through Direct Organogenesis. *Agrociencia*. 56(6): 133-1154. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2823>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: June 02, 2022.
Approved: September, 05 2022.
Published in Agrociencia:
September 20, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



Agave potatorum Zucc., locally known as “maguey”, is a species endemic to the Tehuacán Valley, a region stretching across the states of Oaxaca and Puebla in central Mexico. This species is traditionally used to produce mezcal, a distilled beverage produced under Designation of Origin in seven Mexican states (Colunga-García *et al.*, 2007; Delgado-Lemus *et al.*, 2014b). Wild *A. potatorum* plants are harvested from forests just before sexual reproduction, causing severe ecological damage to their population (Félix-Valdez *et al.*, 2015; Enríquez-del Valle *et al.*, 2016a). Although not currently listed in any risk category by the Official Mexican Standard NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010), *A. potatorum* may be classified as a species subjected to special protection in the future, given the intensive extraction to which it is currently subjected, its long flowering time to produce seeds (10-30 years) (Blancas *et al.*, 2010; Rangel-Landa *et al.*, 2015), and its nil asexual reproduction.

The main alternative for improving agave productivity is the selection, *in vitro* micropropagation, and the subsequent plantation establishment of elite individuals (Luna-Luna *et al.*, 2017; Aguilar and Rodríguez, 2018; Monja-Mio *et al.*, 2019). However, this approach requires developing efficient species-specific micropropagation protocols. Studies on the micropropagation of *A. potatorum* for the supply of propagules are scarce (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008; Enríquez-del Valle *et al.*, 2016b; Luna-Luna *et al.*, 2017; Correa-Hernandez *et al.*, 2022), and some of the available protocols are not entirely efficient in semisolid medium. Therefore, the objective of this study was to establish an protocol for the efficient micropropagation of *A. potatorum*, with the ultimate goal of achieving sustainable management and avoiding further deterioration of wild populations.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and *in vitro* establishment

We used 1-year-old agave plants (*Agave potatorum* Zucc.) obtained from the community of San Diego La Mesa in Puebla, Mexico. Plants were stripped of leaves, and the apices were collected. These were washed with soap and water and transported to the laboratory. Then, apices were immersed in a solution of 100 mL of commercial soap plus two drops of Tween 20® for 5 minutes, followed by five rinses with distilled water and immersion in 70 % ethanol (v/v) for 3 minutes. Afterwards, explants were immersed in a commercial 15 % (v/v) sodium hypochlorite (NaClO) solution (a.i. 6 %) for 15 minutes. Finally, explants were washed twice with sterile distilled water. Apical buds (0.50 cm length) were excised with a scalpel and cultured in test tubes (22 × 220 mm) containing 15 mL of MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 3 % (w/v) sucrose, 5.0 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP, Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA) (Hernández-Castellano *et al.*, 2020), 100.0 mg L⁻¹ of ascorbic acid (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA), and 50.0 mg L⁻¹ of cysteine (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA). After adjusting the pH to 5.8 with 0.1 N sodium hydroxide (NaOH), 0.55 % (w/v) agar was incorporated into the medium (Phytotechnology Laboratories, KS, USA). Thirty-five milliliters of culture

medium were transferred to 500 mL glass flasks and autoclaved at 120 °C and 115 kPa for 15 min. Two apical buds per flask were incubated at 24 ± 2 °C with 8 h darkness and 16 h light photoperiods by using photon flux ($40\text{--}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from fluorescent lamps).

Shoot multiplication

After six months of cultivation (three subcultures of two months each), shoots measuring 2 cm in length with three or four leaves were used as explants and cultured in MS medium supplemented with 3 % (w/v) sucrose and supplemented with increasing concentrations of the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP: 0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹) and the auxin indole acetic acid (IAA: 0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA). The same culture medium, sterilization method, and incubation conditions described above were used to evaluate the shoot multiplication stage. Thirty-five mL of culture medium were transferred into 500 mL glass flasks. After 60 days of culture, we assessed the number of shoots per explant, shoot length, number of roots, and root length.

In vitro rooting

Shoots of 2 cm in length with no roots were used to evaluate the interaction between different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA: 0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA), and indole acetic acid (IAA: 0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹). The same culture medium, sterilization method, and incubation conditions described above were used. Thirty-five mL of culture medium were transferred into 500 mL glass flasks. After 60 days of culture, we assessed shoot length, number of leaves, number of roots, and root length.

Acclimatization

After the rooting stage, rooted shoots were transferred to 72-cell trays containing a sterile substrate mixture of soil, peat moss (Premier, Rivière-du-Loup, CAN), and agrolite (Agrolita, Tlalnepantla de Baz, MX) (1:1:1 v/v). Plantlets were cultivated under greenhouse conditions (50 % shade, 30 ± 5 °C, 60 ± 5 % RH, relative humidity), watered twice a week, and received foliar fertilization (Grogreen® Campbell Co. De Rochelle, Ill, USA) (1 mg L⁻¹) weekly. After 30 days of acclimatization, the survival rate (plant survival percentage) was computed. Subsequently, plantlets were transferred to 38-cell trays containing unsterilized substrate mixture and under natural light with a photon flux of $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Finally, plants were transferred to field conditions in a plot at Izúcar de Matamoros, Puebla, Mexico, under a drip irrigation system.

Experimental Design and Statistical Analysis

A completely randomized experimental design was used, with a two-factor arrangement for the propagation (BAP × IAA) and rooting (NAA × IAA) stages. For the *in vitro* establishment, two apical buds were placed by flask; a total of 50 explants

were used. During the shoot multiplication stage, 25 explants per treatment, with five explants per culture flask, were used. For the acclimatization process, 144 shoots were used (two trays of 72-cell trays). An analysis of variance (ANOVA) was performed, with means compared with Tukey's test ($p \leq 0.05$). All experiments were performed in duplicate. Data analysis was carried out in SPSS (Version 22 for Windows).

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro establishment and shoot multiplication

After 60 days of culture, a 100 % of shoot regeneration response was observed in the *in vitro* establishment process (direct formation of adventitious shoots). No contamination was observed during *in vitro* establishment. For shoot multiplication, significant differences were observed between the different BAP × IAA treatments. Additionally, an interaction was observed in the two-factor analysis for the number of shoots per explant, number of roots, and root length. On the other hand, no interaction was observed for shoot length (Table 1). The highest number of adventitious shoots was obtained by direct regeneration with 3.0 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ IAA, 3.0 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ IAA, and 1.5 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ IAA, which yielded 9.83, 9.73, and 8.33 shoots per explant, respectively. In contrast, the lowest number of shoots was produced when only IAA was supplemented to the culture medium, resulting in less than two shoots per explant (Figure 1A-C). Regarding shoot length, the highest values were obtained with the control treatment and when only IAA was supplemented. In contrast, the shortest shoots occurred with 1.5 mg L⁻¹ BAP and 1.5 mg L⁻¹ + 1.5 mg L⁻¹ IAA. The highest number of roots was observed with 1.5 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ IAA

Table 1. Shoot multiplication of *Agave potatorum* after 60 days of culture in different concentrations of BAP and IAA.

BAP (mg L ⁻¹)	IAA (mg L ⁻¹)	Response (%)	Number of shoots per explant	Shoot length (cm)	Number of roots per explant	Root length (cm)
0.00	0.00	100±0.00 a	1.60±0.19 d*	5.51±0.11 a	2.87±0.19 b	4.80±0.15 a
0.00	1.50	100±0.00 a	1.87±0.19 d	5.43±0.10 a	3.0±0.17 b	4.94±0.19 a
0.00	3.00	100±0.00 a	1.93±0.23 d	5.55±0.13 a	2.93±0.18 b	4.91±0.18 a
1.50	0.00	100±0.00 a	6.80±0.31 c	4.73±0.12 b	1.40±0.21 c	2.14±0.30 c
1.50	1.50	100±0.00 a	8.33±0.32 b	4.67±0.14 b	4.27±0.28 a	3.51±0.10 b
1.50	3.00	100±0.00 a	9.73±0.33 a	5.20±0.14 ab	4.33±0.29 a	3.57±0.09 b
3.00	0.00	100±0.00 a	7.73±0.30 bc	4.95±0.15 ab	0.93±0.21 c	0.55±0.23 d
3.00	1.50	100±0.00 a	9.73±0.37 a	4.95±0.15 ab	0.80±0.20 c	0.46±0.13 d
3.00	3.00	100±0.00 a	9.87±0.38 a	4.95±0.18 ab	1.07±0.23 c	0.73±0.15 d
Factors				<i>p</i> -value		
BAP			0.00	0.00	0.00	0.00
IAA			0.00	0.16	0.00	0.00
BAP × IAA			0.00	0.23	0.00	0.00

*Values represent mean ± SE (Standard Error). Means with different letters per column are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

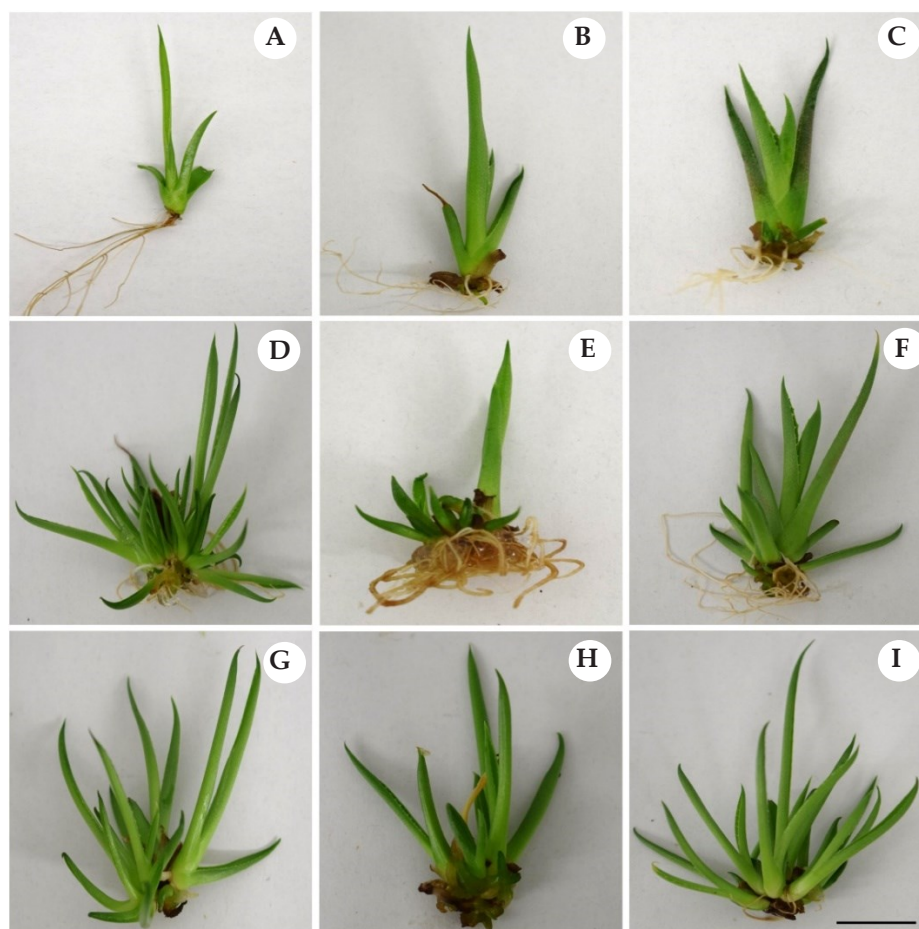


Figure 1. Effect of BAP and IAA concentration on *in vitro* propagation of *Agave potatorum*. A: 0 mg L⁻¹ BAP + 0 mg L⁻¹ IAA, B: 0 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ IAA, C: 0 mg L⁻¹ BAP + 3 mg L⁻¹ IAA, D: 1.5 mg L⁻¹ BAP + 0 mg L⁻¹ IAA, E: 1.5 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ IAA, F: 1.5 mg L⁻¹ BAP + 3 mg L⁻¹ IAA, G: 3 mg L⁻¹ BAP + 0 mg L⁻¹ IAA, H: 3 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ IAA and I: 3 mg L⁻¹ BAP + 3 mg L⁻¹ IAA. Bar= 1 cm.

and 1.5 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ IAA, with 4.27 and 4.33 roots per explant, respectively (Figure 1D-F). The lowest number of roots was observed with 1.5 mg L⁻¹ and 3.0 mg L⁻¹ BAP, either alone or in combination with IAA, with less than 1.4 roots per explant. As for root length, the highest value was recorded in the control treatment and with IAA alone. The lowest root length was observed under supplementation with only 1.5 mg L⁻¹ and with the combinations of 3.0 mg L⁻¹ + 1.5 mg L⁻¹ and 3.0 mg L⁻¹ + 1.5 mg L⁻¹ IAA, yielding roots measuring less than 1 cm in length (Figure 1G-I).

Our study established an efficient protocol for the micropropagation of *A. potatorum*. However, there is insufficient information about the *in vitro* propagation of this species. Domínguez-Rosales *et al.* (2008) obtained 6.9 shoots per explant by supplementing the

culture medium with 3 mg L⁻¹ of Kinetin (KIN). Pérez-Molphe-Balch et al. (2012) obtained 7.8 shoots per explant using 3.0 mg L⁻¹ of KIN, which differs from the 9.87 shoots per explant obtained in this study with the 3.0 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ IAA. The cytokine-auxin interaction is commonly used for the micropropagation of agave species (Domínguez-Rosales et al., 2008; Us-Camas et al., 2017; Aguilar and Rodríguez, 2018; Rodríguez-Garay and Rodríguez-Domínguez, 2018; Sara et al., 2020). The interaction between plant growth regulators has a synergistic or antagonistic effect on in vitro morphogenesis and meristem cell development (Su et al., 2011; Faisal et al., 2018; Gupta et al., 2020). Our results indicate synergism, evidenced by the higher number of shoots per explant, number of roots, and root length. Enríquez-del Valle et al. (2016b) reported that 1.0 mg L⁻¹ of BAP fosters the in vitro propagation of *A. potatorum*. However, this report did not mention the number of shoots per explant produced.

In vitro rooting

Significant differences were observed between the different combinations and concentrations of NAA and IAA. In addition, an interaction was observed in the two-factor analysis for shoot length. On the other hand, no interaction was observed for number of leaves, number of roots, and root length (Table 2). The greatest shoot length was observed in the control treatment and when only 1.5 mg L⁻¹ or 3.0 mg L⁻¹ of IAA were supplemented, resulting in shoots of 5.04, 5.31, and 5.77 cm in length (Figure 2A-C); the smallest length was obtained by adding 3.0 mg L⁻¹ NAA alone and 3.0 mg L⁻¹ NAA + 1.5 or 3.0 mg L⁻¹ IAA, which produced shoots 2.1 cm long. As for the number

Table 2. *In vitro* rooting and survival during acclimatization of *Agave potatorum* after 60 days of culture in different concentrations of NAA and IAA.

NAA (mg L ⁻¹)	IAA (mg L ⁻¹)	Response (%)	Shoot length (cm)	Number of leaves	Number of roots	Root length (cm)	Survival (%)
0.00	0.00	100±0.00 a	5.04±0.29 a*	3.87±0.19 a	3.87±0.83 a	7.03±0.35 a	99.33±0.66 a
0.00	1.50	100±0.00 a	5.31±0.34 a	3.87±0.19 a	3.93±0.70 a	6.82±0.43 a	99.33±0.66 a
0.00	3.00	100±0.00 a	5.77±0.35 a	3.73±0.21 a	4.20±0.77 a	6.91±0.43 a	99.33±0.66 a
1.50	0.00	0.00 b	3.85±0.18 b	2.80±0.20 b	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
1.50	1.50	0.00 b	3.07±0.18 bc	2.73±0.18 b	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
1.50	3.00	0.00 b	3.0±0.15 bc	2.80±0.20 b	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
3.00	0.00	0.00 b	2.19±0.13 c	1.60±0.13 c	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
3.00	1.50	0.00 b	2.15±0.16 c	1.53±0.13 c	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
3.00	3.00	0.00 b	2.19±0.12 c	1.47±0.13 c	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
Factors			<i>p</i> -value				
IAA		0.000	0.574	0.828	0.460	0.937	1.000
NAA		1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.615
IAA × NAA		1.000	0.015	0.984	0.539	0.992	1.000

*Values represent mean ± SE (Standard Error). Means with different letters per column are different (Tukey, *p* ≤ 0.05).

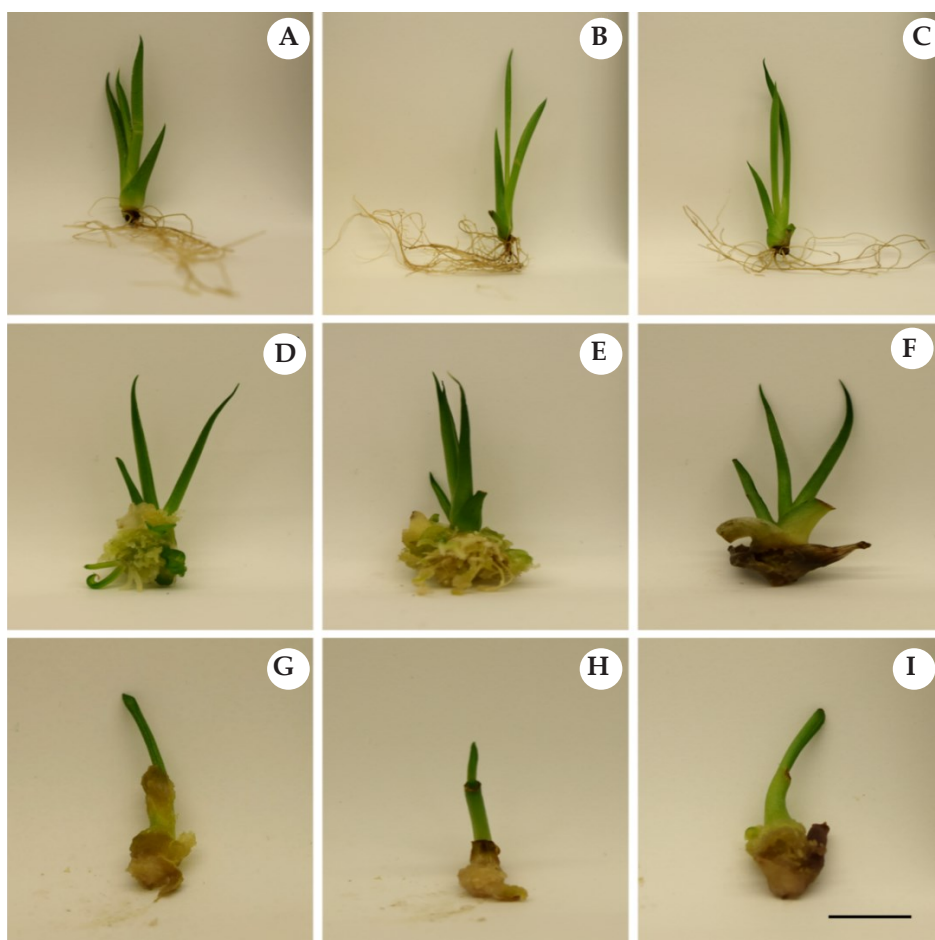


Figure 2. Effect of NAA and IAA concentrations on *in-vitro* rooting of *Agave potatorum*. A: 0 mg L⁻¹ NAA + 0 mg L⁻¹ IAA, B: 0 mg L⁻¹ NAA + 1.5 mg L⁻¹ IAA, C: 0 mg L⁻¹ NAA + 3 mg L⁻¹ IAA, D: 1.5 mg L⁻¹ NAA + 0 mg L⁻¹ IAA, E: 1.5 mg L⁻¹ NAA + 1.5 mg L⁻¹ IAA, F: 1.5 mg L⁻¹ NAA + 3 mg L⁻¹ IAA, G: 3 mg L⁻¹ NAA + 0 mg L⁻¹ IAA, H: 3 mg L⁻¹ NAA + 1.5 mg L⁻¹ IAA and I: 3 mg L⁻¹ NAA + 3 mg L⁻¹ IAA. Bar= 1 cm.

of leaves, the highest number of leaves was observed with the control treatment and with IAA alone, yielding 3.8 leaves per shoot on average. The lowest number of leaves per shoot was obtained by adding only 3.0 mg L⁻¹ NAA and with the combination of 3.0 mg L⁻¹ NAA + 1.5 or 3.0 mg L⁻¹ IAA, which produced 1.4 to 1.6 leaves per shoot. As for the number of roots, the highest number was observed in the control treatment and with IAA alone, with 3.8 to 4.2 roots per shoot; the remaining treatments produced no roots (Figure 2D-F). Regarding root length, the longest roots were resulted from the control treatment and IAA alone, with roots up to 7 cm in length; the remaining treatments produced no roots. It is worth mentioning that the combinations of 0 mg L⁻¹ IAA + 1.5 mg L⁻¹ NAA and 1.5 mg L⁻¹ IAA + 1.5 mg L⁻¹ NAA promoted the formation of callous tissue at the base of the explants (Figure 2G-I).

In this study, the auxin-auxin interactions did not show any root induction in *A. potatorum*. Shoots showed the greatest root production either with no auxin supplementation or by supplementing IAA alone. Enríquez-del Valle *et al.* (2016b) achieved 100 % *in vitro* rooted shoots of *A. potatorum* by adding 1.0 mg L⁻¹ indolebutyric acid (IBA) to the MS culture medium. However, these authors reported that all *A. potatorum* shoots formed adventitious roots, even in culture media with no auxin supplementation. On the other hand, Domínguez-Rosales *et al.* (2008) achieved 87 % rooted shoots in this same species using MS medium with no plant growth regulators (RCV).

In our study, we observed the formation of callus tissue with 1.5 mg L⁻¹ of NAA and with the combined treatment of 1.5 mg L⁻¹ of NAA + 1.5 mg L⁻¹ of IAA. The production of callus tissue in *Agave tequilana* Weber has been used to promote somatic embryogenesis (Delgado-Aceves *et al.*, 2019; Monja-Mio *et al.*, 2019). The formation of callus tissue during morphogenesis promotes somaclonal variation in the plants produced (Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2015). This type of variation is undesirable when the aim is massive propagation to preserve the genetic heritage of the parent materials (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008; Leva and Rinaldi, 2017). In the case of *A. potatorum*, one advantage is that the MS culture medium requires no auxin supplementation to promote root formation during micropropagation. Correa-Hernández *et al.* (2022), in *A. potatorum* during *in vitro* temporary immersion, found that explants had a scarce or no root system, and the shoots showed high survival percentages (95-98 %) in all treatments evaluated.

Acclimatization

In the acclimatization stage, all plantlets obtained from the rooting treatments had survival rates above 98 %. Figure 3 shows *ex vitro* plantlets transplanted to greenhouse and field conditions with a drip irrigation system.

The high survival rate (98-100 %) observed in our study contrasts with the studies of Domínguez-Rosales *et al.* (2008) and Enríquez-Del Valle *et al.* (2016a), who reported a

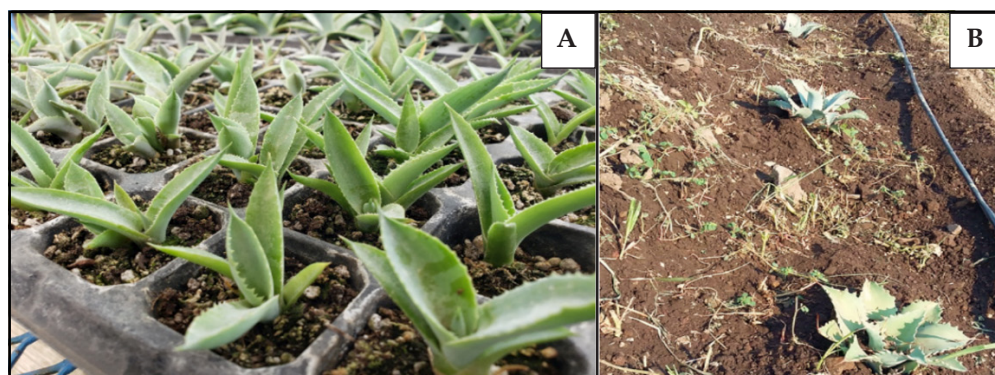


Figure 3. *Ex vitro* plants of *Agave potatorum*. A: Plants after four months of greenhouse acclimatization; B: Plants after four months in field conditions.

73 % survival for *A. potatorum* plants propagated *in vitro*. On the other hand, Enríquez-Del Valle *et al.* (2016b) did not report survival rates during acclimatization. In this study, the shoots obtained with all treatments achieved high survival rates irrespective of the presence or absence of roots. Survival during acclimatization is related to the plant vigor and a highly developed foliar system (Monja-Mio *et al.*, 2015; Martínez-Estrada *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2020). Additionally, the wax content and thickness of the cuticle in this species, coupled with the type of metabolism (CAM), allowed a high survival rate during the acclimatization process. There are also external factors regulating *ex vitro* survival, such as water content (irrigation), fertilization, type of substrate, and environmental conditions (light, temperature, and relative humidity, among others) (Hoang *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2020). Moreover, the anatomy and physiology of the genus *Agave*, together with appropriate greenhouse management, probably contributed to the adequate development of plantlets *ex vivo* without affecting their survival. Luna-Luna *et al.* (2017) observed that high fertigation during the acclimatization stage ensures the optimal development of *A. potatorum* plants obtained *in vitro*.

CONCLUSIONS

This study established an efficient protocol for the micropropagation of *Agave potatorum*, as evidenced by the high survival rates of regenerated plants. The interaction of 1.5 mg L⁻¹ of BAP and 3.0 mg L⁻¹ of IAA is effective for the shoot multiplication of this species, resulting in a greater number of shoots per explant. While the culture medium without NAA and IAA is suitable for promoting rooting *in vitro*. This research will contribute to the development of propagules intended to establish plantations. These plantations will prevent the intensive exploitation of wild populations, as this species will likely be subject to special protection by the official Mexican Standard NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010) in the foreseeable future.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Correa-Hernández L. for her technical support. No funding was received.

REFERENCES

- Aguilar D, Rodríguez J. 2018. Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roez) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20: 124–131. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Blancas J, Casas A, Rangel-Landa S, Moreno AI, Torres I, Pérez-Negrón E, Solís L, Delgado A, Parra F, Arellanes Y, Cortés L, Lira R. 2010. Plant Management in the Tehuacán Valley. *Economic Botany* 64: 287–302. <https://doi.org/10.1007/s12231-010-9133-0>
- Colunga-García MP, Saavedra A, Eguiarte L, Zizumbo-Villareal D. 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. In *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Instituto Nacional de Ecología*. Yucatán, México.
- Correa-Hernández L, Baltazar-Bernal O, Sánchez-Páez R, Bello-Bello JJ. 2022. *In vitro* multiplication of agave tobala (*Agave potatorum* Zucc.) using Ebb-and-Flow bioreactor. *South African Journal of Botany* 147: 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.009>

- Delgado-Aceves L, Palacios H, Romo-Paz F, Portillo L. 2019. Micropropagation Systems in *Agave* spp: common errors. In Gutiérrez A (ed) Sustainable and Integrated use of Agave 1st edition. Zapopan, Jalisco, Mexico, pp: 51–54.
- Delgado-Lemus A, Torres I, Blancas J, Casas A. 2014a. Vulnerability and risk management of *Agave* species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10: 53. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4269-10-53>
- Delgado-Lemus A, Casas A, Téllez O. 2014b. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacan Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10: 63. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4269-10-63>
- Domínguez-Rosales M, Alpuche A, Vasco N, Pérez-Molphe E. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31: 317–322.
- Enríquez-del Valle J, Alcará S, Rodríguez G, Miguel M, Manuel C. 2016a. Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 1167–1177.
- Enríquez-del Valle J, Antonio-Luis K, Rodríguez-Ortiz G, Campos-Ángeles G. 2016b. Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants. *Ciencia e Investigación Agraria* 43: 263–272. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202016000200009>
- Faisal M, Ahmad N, Anis M, Alatar A, Wahtan A. 2018. Auxin-cytokinin synergism *in vitro* for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25: 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.09.009>
- Félix-Valdez LI, Vargas-Ponce O, Cabrera-Toledo D, Casas A, Cibrian-Jaramillo A, Cruz-Larios L. 2015. Effects of traditional management for mescal production on the diversity and genetic structure of *Agave potatorum* (Asparagaceae) in central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 63: 1255–1271. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0315-6>
- Gupta S, Kachhwaha S, Kothari S, Jain R. 2020. Synergistic effect of cytokinins and auxins enables mass clonal multiplication of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam): a wonder. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10065-0>
- Hernández-Castellano S, Garruna-Hernandez, R, Us-Camas R, Ku-Gonzalez A, De-la-Pena C. 2020. *Agave angustifolia* albino plantlets lose stomatal physiology function by changing the development of the stomatal complex due to a molecular disruption. *Molecular Genetics and Genomics* 295: 787–805. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01643-y>
- Hoang NN, Kitaya Y, Shibuya T, Endo R. 2020. Effects of supporting materials in *in vitro* acclimatization stage on *ex vitro* growth of wasabi plants. *Scientia Horticulturae* 261. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109042>
- Leva A, Rinaldi LMR. 2017. Somaclonal variation. In Thomas B, Murray B, Murphy D (ed) *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* 2nd edition. United States, pp: 468–473. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00150-7>
- Luna-Luna S, Enríquez-del Valle J, Rodríguez-Ortiz G, Carrillo-Rodríguez J, Velasco-Velasco V. 2017. Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatizadas de *Agave potatorum* Zucc. fertirrigadas en vivero. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40: 491–494.
- Martínez-Estrada E, Islas-Luna B, Pérez-Sato JA, Bello-Bello JJ. 2019. Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Scientia Horticulturae* 249: 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.053>
- Monja-Mio KM, Barredo PF, Herrera HG, Esqueda VM, Robert ML. 2015. Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae* 189: 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>
- Monja-Mio KM, Herrera-Alamillo MA, Sánchez-Teyer LF, Robert ML. 2019. Breeding Strategies to Improve Production of Agave (*Agave* spp.). In: Al-Khayri J, Jain S, Johnson D (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops*. Springer, Cham. pp: 319–362. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8_10

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth y bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pérez-Molphe-Balch E, Esparza M, Pérez M. 2012. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 279–287.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG. 2015. Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123: 657–664. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0868-2>
- Rangel-Landa S, Casas A, Dávila P. 2015. Facilitation of *Agave potatorum*: An ecological approach for assisted population recovery. *Forest Ecology and Management* 347: 57–74. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.03.003>
- Rodríguez-Garay B, Rodríguez-Domínguez JM. 2018. Micropropagation of Agave Species. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1815. Humana Press, New York, NY, pp: 151–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_8
- Sara H, René G, Rosa U, Us Camas R, Kú Gonzalez A, De la Peña C. 2020. *Agave angustifolia* albino plantlets lose stomatal physiology function by changing the development of the stomatal complex due to a molecular disruption. *Molecular Genetics and Genomics* 295: 787–805. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01643-y>
- SEMARNAT, 2010. NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y Fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. SEMARNAT, CDMX. (in Spanish)
- Su YH, Liu YB, Zhang XS. 2011. Auxin-Cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* 4: 616–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Torres I, Casas A, Vega E, Martínez-Ramos M, Delgado-Lemus A. 2015. Population Dynamics and Sustainable Management of Mescal Agaves in Central Mexico: *Agave potatorum* in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. *Economic Botany* 20. <https://doi.org/10.1007/s12231-014-9295-2>
- Us-Camas R, Castillo-Castro E, Aguilar-Espinosa M, Limones-Briones V, Rivera-Madrid R, Robert-Díaz M, De-la-Peña C. 2017. Assessment of molecular and epigenetic changes in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science* 263: 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.07.010>
- Vieira C, Carvalho F, Lima-Melo Y, Carvalho C, Lima M, Martins M, Silveira J. 2020. Integrative approach reveals new insights into photosynthetic and redox protection in *ex vitro* tobacco plantlets acclimatization to increasing light intensity. *Biotechnology Research and Innovation* 58. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2020.04.001>

MICROPROPAGACIÓN DE AGAVE (*Agave potatorum* Zucc.) MEDIANTE ORGANOGÉNESIS DIRECTA

Marco Antonio **Ramírez-Mosqueda**¹, Rocío Guadalupe **Cárcamo-Corona**¹,
Daniel **Aguilar-Jiménez**², Jericó Jabín **Bello-Bello**^{3*}

¹ Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94953.

² Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Programa Educativo de Agrobiotecnología. Prolongación Reforma No. 168, Barrio de Santiago Mihuacán, Izúcar de Matamoros, Puebla, México. C. P. 74420.

³ CONACYT-Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94953

* Autor para correspondencia: jericobello@gmail.com

RESUMEN

La producción de mezcal, un licor de origen mexicano, ha provocado la sobreexplotación de *Agave potatorum* Zucc. Actualmente, el único método para clonar genotipos específicos de *Agave* spp. es la micropropagación. Con este estudio, buscamos establecer un protocolo eficiente para la propagación de *A. potatorum* a partir de explantes individuales. Durante la etapa de multiplicación, evaluamos la interacción entre diferentes concentraciones de la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP: 0, 1.5 y 3.0 mg L⁻¹) y la auxina ácido indol acético (AIA: 0, 1.5 y 3.0 mg L⁻¹). También evaluamos la interacción entre diferentes concentraciones de las auxinas ácido naftalenacético (ANA: 0, 1.5 y 3.0 mg L⁻¹) y AIA (0, 1.5 y 3.0 mg L⁻¹) durante la etapa de enraizamiento. Observamos que, en la etapa de multiplicación, el mayor número de brotes se obtuvo con las combinaciones de 3.0 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ AIA, 1.5 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ AIA y 3.0 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ AIA, las cuales resultaron en 9.87, 9.73 y 9.73 brotes por explante, respectivamente. En cambio, durante el enraizamiento, los brotes con mejor desarrollo se produjeron en el tratamiento control y con 3.0 mg L⁻¹ AIA. Finalmente, después de la etapa de enraizamiento, las plántulas fueron aclimatizadas y cultivadas en campo, con una tasa de supervivencia del 98-100 %. En conclusión, el protocolo de propagación propuesto en este estudio produce propágulos aptos para el establecimiento en campo.

Palabras clave: agave mezcalero, interacción entre reguladores de crecimiento, propágulos, propagación *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

En México, la mayoría de las especies del género *Agave* tienen importancia ecológica, económica y cultural. El territorio mexicano alberga 150 de las 200 especies de *Agave* en el mundo (Delgado-Lemus *et al.*, 2014a; Rangel-Landa *et al.*, 2015). Desafortunadamente, la extracción intensiva de agaves silvestres para la producción de tequila, mezcal y pulque ha impactado negativamente estas poblaciones (Rangel-Landa *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015).

Citation: Ramírez-Mosqueda MA, Cárcamo-Corona RG, Aguilar-Jiménez D, Bello-Bello JJ. 2022. Micropropagación de agave (*Agave potatorum* Zucc.) mediante organogénesis directa.

Agrociencia. 56(6): 133-1154. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2823>

Editor in Chief:

Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: June 02, 2022.

Approved: September, 05 2022.

Published in *Agrociencia*:

September 20, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



Agave potatorum Zucc., localmente conocido como “maguey”, es una especie endémica del Valle de Tehuacán, una región que se extiende por los estados de Oaxaca y Puebla en la región central de México. Esta especie se utiliza tradicionalmente para producir mezcal, una bebida alcohólica destilada producida bajo la protección de Denominación de Origen en siete estados mexicanos (Colunga-García *et al.*, 2007; Delgado-Lemus *et al.*, 2014b). Las plantas silvestres de *A. potatorum* se recolectan de los bosques justo antes de la reproducción sexual, lo que provoca serios daños ecológicos a su población (Félix-Valdez *et al.*, 2015; Enríquez-del Valle *et al.*, 2016a). Aunque hoy en día *A. potatorum* no es considerada una especie en riesgo por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010), es posible que en un futuro sea clasificada como especie sujeta a protección especial debido a su sobreexplotación, largo periodo de floración para producir semillas (10–30 años) (Blancas *et al.*, 2010; Rangel-Landa *et al.*, 2015) y nula reproducción asexual.

La principal alternativa para mejorar la productividad de *Agave* spp. consiste en la selección, propagación *in vitro* y posterior establecimiento en campo de especímenes con características especiales (Luna-Luna *et al.*, 2017; Aguilar y Rodríguez, 2018; Monja-Mio *et al.*, 2019). Sin embargo, esta alternativa requiere el desarrollo de protocolos de micropropagación eficientes y específicos para cada especie. Los estudios sobre la micropropagación de *A. potatorum* para el suministro de propágulos son escasos (Dominguez-Rosales *et al.*, 2008; Enríquez-del Valle *et al.*, 2016b; Luna-Luna *et al.*, 2017; Correa-Hernández *et al.*, 2022). Además, algunos de los protocolos disponibles no son eficientes en medio semisólido. El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo eficiente para la micropropagación de *A. potatorum* y así alcanzar el manejo sustentable de esta especie sin afectar poblaciones silvestres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y establecimiento *in vitro*

Utilizamos plantas de *A. potatorum* Zucc., de un año de edad. Los especímenes fueron colectados en la comunidad de San Diego la Mesa en Puebla, México. Las plantas fueron despojadas de sus hojas, a partir de las cuales se colectaron los ápices. Los cuales se lavaron con agua y jabón y transportaron al laboratorio. Los ápices fueron sumergidos durante cinco minutos en una solución de 100 mL de jabón comercial con dos gotas de Tween 20[®]. Posteriormente, los ápices fueron enjuagados cinco veces con agua destilada y sumergidos en etanol al 70 % (v/v) durante tres minutos. Después, los explantes fueron sumergidos en una solución comercial de hipoclorito de sodio (NaClO) al 15 % (v/v) (i.a. 6 %) durante 15 minutos. Finalmente, los explantes fueron enjuagados dos veces con agua destilada estéril. Las yemas apicales (0.5 cm de longitud) fueron extraídas con ayuda de un bisturí y cultivadas en tubos de ensayo (22 × 220 mm) con 15 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 3 % (p/v), 5.0 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP, Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, EUA) (Hernández-Castellano *et al.*, 2020), 100.0 mg L⁻¹ de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, EUA) y 50.0 mg L⁻¹ de cisteína

(Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, EUA). Después de ajustar el pH a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, se incorporó agar al 0.55 % (p/v) al medio de cultivo (Phytotechnology Laboratories, KS, EUA). Posteriormente, se transfirieron 35 mL de medio de cultivo a frascos de vidrio de 500 mL, estos fueron esterilizados en autoclave a 120 °C y 115 kPa durante 15 min. Se cultivaron dos yemas apicales por frasco e incubaron a 24 ± 2 °C con fotoperiodos de 8 h de oscuridad y 16 h de luz usando flujo de fotones ($40\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de lámparas fluorescentes).

Multiplicación del explante

Después de seis meses de cultivo (tres subcultivos de dos meses cada uno), los brotes de 2 cm de longitud y tres o cuatro hojas fueron utilizados como explantes y cultivados en medio MS suplementado con sacarosa al 3 % (p/v) y concentraciones crecientes de la citoquinina BAP (0, 1.5 y 3.0 mg L⁻¹) y la auxina AIA (0, 1.5 y 3.0 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, EUA). Para la etapa de multiplicación se utilizó el mismo medio de cultivo y las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente. Se transfirieron 35 mL del medio de cultivo a frascos de vidrio con capacidad de 500 mL. Después de 60 días de cultivo, evaluamos el número de brotes por explante, la longitud de los brotes, el número de raíces y la longitud de raíces.

Enraizamiento *in vitro*

Los brotes de 2 cm de longitud sin raíces se utilizaron para evaluar la interacción entre diferentes concentraciones ácido naftalenacético (ANA: 0, 1.5 y 3.0 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, EUA) y ácido Indolacético (AIA: 0, 1.5 y 3.0 mg L⁻¹). Se utilizó el mismo medio de cultivo y las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente. Se transfirieron 35 mL del medio de cultivo a frascos de vidrio con capacidad de 500 mL. Después de 60 días de cultivo, evaluamos la longitud de los brotes, el número de hojas, el número de raíces y la longitud de raíces.

Aclimatización

Después de la etapa de enraizamiento, los brotes con raíces fueron transferidos a charolas de 72 cavidades con una mezcla estéril de tierra, musgo de turba (Premier, Rivière-du-Loup, CAN) y agrolita (Agrolita, Tlalnepantla de Baz, MX) (1:1:1 v/v). Las plántulas se cultivaron bajo condiciones de invernadero (50 % de sombra, 30 ± 5 °C, 60 ± 5 % de humedad relativa), fueron irrigadas dos veces a la semana y fertilizadas (Gro-green® Campbell Co. De Rochelle, Ill, EUA) (1 mg L⁻¹) una vez por semana. Después de 30 días de aclimatización, calculamos la tasa de supervivencia. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a charolas de 38 cavidades con la misma mezcla de sustrato, pero sin esterilizar, y expuestas a una irradiancia de luz natural de $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Finalmente, las plantas fueron transferidas a una parcela en Izúcar de Matamoros, Puebla, México, bajo un sistema de irrigación por goteo.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo bifactorial para las etapas de multiplicación (BAP × AIA) y enraizamiento (ANA × AIA). Para el establecimiento *in vitro*, se utilizó un total de 50 explantes, cinco explantes por frasco de cultivo. Durante la etapa de multiplicación, se utilizaron 25 explantes por tratamiento, con cinco explantes por frasco de cultivo. Para el proceso de aclimatación, se utilizaron 144 brotes (dos charolas de 72 cavidades). Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Todos los experimentos se realizaron por duplicado. El análisis de datos se realizó con el programa SPSS (Versión 22 para Windows).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro* y multiplicación del explante

El establecimiento *in vitro* del 100 % de los explantes de *A. potatorum*, evidenciado por la formación de brotes adventicios, se logró después de 60 días de cultivo. No se observaron contaminaciones durante el establecimiento *in vitro*. Durante la etapa de multiplicación del explante, se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de BAP × AIA. Además, el análisis bifactorial identificó que la interacción BAP × AIA estaba asociada con el número de brotes por explante, número de raíces y longitud de raíces. Por otra parte, no se observó ninguna interacción asociada con la longitud del brote (Cuadro 1). Los explantes con un mayor número de brotes adventicios; 9.83, 9.73 y 8.33 brotes por explante; se obtuvieron mediante regeneración directa con 3.0 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ AIA, 3.0 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ AIA y 1.5 mg

Cuadro 1. Multiplicación de explantes de *Agave potatorum* después de 60 días de cultivo en medio MS con diferentes concentraciones de BAP y AIA.

BAP (mg L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)	Respuesta (%)	Número de brotes por explante	Longitud de los brotes (cm)	Número de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)
0.00	0.00	100±0.00 a	1.60±0.19 d*	5.51±0.11 a	2.87±0.19 b	4.80±0.15 a
0.00	1.50	100±0.00 a	1.87±0.19 d	5.43±0.10 a	3.0±0.17 b	4.94±0.19 a
0.00	3.00	100±0.00 a	1.93±0.23 d	5.55±0.13 a	2.93±0.18 b	4.91±0.18 a
1.50	0.00	100±0.00 a	6.80±0.31 c	4.73±0.12 b	1.40±0.21 c	2.14±0.30 c
1.50	1.50	100±0.00 a	8.33±0.32 b	4.67±0.14 b	4.27±0.28 a	3.51±0.10 b
1.50	3.00	100±0.00 a	9.73±0.33 a	5.20±0.14 ab	4.33±0.29 a	3.57±0.09 b
3.00	0.00	100±0.00 a	7.73±0.30 bc	4.95±0.15 ab	0.93±0.21 c	0.55±0.23 d
3.00	1.50	100±0.00 a	9.73±0.37 a	4.95±0.15 ab	0.80±0.20 c	0.46±0.13 d
3.00	3.00	100±0.00 a	9.87±0.38 a	4.95±0.18 ab	1.07±0.23 c	0.73±0.15 d
Factores			Valor de <i>p</i>			
BAP			0.00	0.00	0.00	0.00
AIA			0.00	0.16	0.00	0.00
BAP × AIA			0.00	0.23	0.00	0.00

*Media ± EE (Error Estándar) Las medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

L^{-1} BAP + $1.5\text{ mg }L^{-1}$ AIA, respectivamente. En cambio, el menor número de brotes se obtuvo con AIA. Este tratamiento generó menos de dos brotes por explante (Figura 1A-C). En cuanto a la longitud del brote, los valores más altos se obtuvieron con el tratamiento control y con AIA. En cambio, los brotes más cortos se observaron con los tratamientos combinados de $1.5\text{ mg }L^{-1}$ BAP y $1.5\text{ mg }L^{-1}$ + $1.5\text{ mg }L^{-1}$ AIA. Los tratamientos $1.5\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $1.5\text{ mg }L^{-1}$ AIA y $1.5\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $3.0\text{ mg }L^{-1}$ AIA generaron el mayor número de raíces por explante, 4.27 y 4.33, respectivamente (Figura 1D-F). Los explantes tratados con $1.5\text{ mg }L^{-1}$ y $3.0\text{ mg }L^{-1}$ BAP, solo o combinado con AIA, produjeron el menor número de raíces, menos de 1.4 raíces por explante. En cuanto a la longitud de la raíz, el valor más alto se registró con el tratamiento control y con AIA. La longitud de raíz más corta se observó bajo la suplementación con solo $1.5\text{ mg }L^{-1}$ y

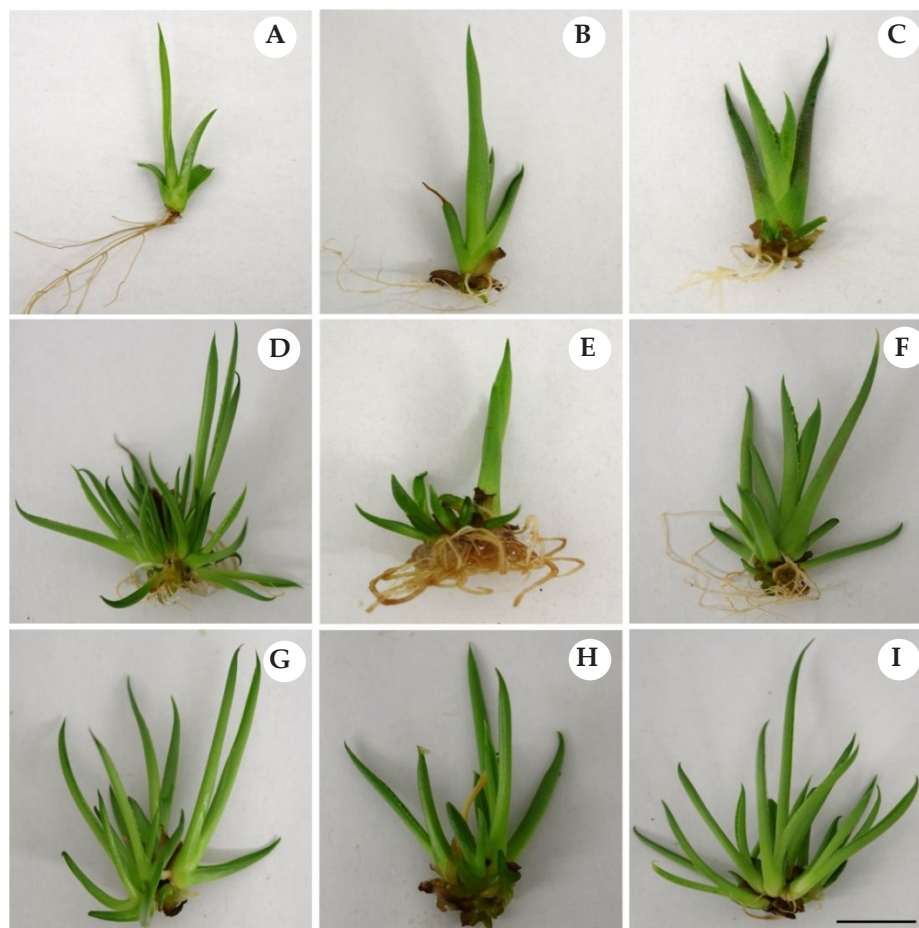


Figura 1. Efecto de las diferentes concentraciones BAP y AIA en la propagación *in vitro* de *Agave potatorum*. A: $0\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $0\text{ mg }L^{-1}$ AIA, B: $0\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $1.5\text{ mg }L^{-1}$ AIA, C: $0\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $3\text{ mg }L^{-1}$ AIA, D: $1.5\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $0\text{ mg }L^{-1}$ AIA, E: $1.5\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $1.5\text{ mg }L^{-1}$ AIA, F: $1.5\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $3\text{ mg }L^{-1}$ AIA, G: $3\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $0\text{ mg }L^{-1}$ AIA, H: $3\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $1.5\text{ mg }L^{-1}$ AIA e I: $3\text{ mg }L^{-1}$ BAP + $3\text{ mg }L^{-1}$ AIA. Barra = 1 cm

con el tratamiento combinado de 3.0 mg L⁻¹ + 1.5 mg L⁻¹ y 3.0 mg L⁻¹ + 1.5 mg L⁻¹ AIA, produciendo raíces que miden menos de 1 cm de longitud (Figura 1G-I).

Nuestro estudio estableció un protocolo eficiente para la micropropagación de *A. potatorum*. Sin embargo, pocos estudios han abordado la propagación in vitro de esta especie. Domínguez-Rosales et al. (2008) reportaron 6.9 brotes por explante al suplementar el medio de cultivo con 3 mg L⁻¹ de kinetina (KIN). Pérez-Molphe-Balch et al. (2012) obtuvieron 7.8 brotes por explante con 3.0 mg L⁻¹ KIN; lo cual contrasta con los 9.87 brotes por explante obtenidos en este estudio con 3.0 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ AIA. La interacción citoquinina-auxina se utiliza comúnmente para la micropropagación de *Agave* spp. (Domínguez-Rosales et al., 2008; Us-Camas et al., 2017; Aguilar y Rodríguez, 2018; Rodríguez-Garay y Rodríguez-Domínguez, 2018; Sara et al., 2020). Las interacciones entre reguladores de crecimiento pueden tener un efecto sinérgico o antagónico en la morfogénesis in vitro y el desarrollo de células meristemáticas (Su et al., 2011; Faisal et al., 2018; Gupta et al., 2020). Nuestros resultados indican sinergismo, lo cual queda evidenciado por el número significativamente elevado de brotes por explante, raíces y longitud de raíces. Enríquez-del Valle et al. (2016b) reportaron que 1.0 mg L⁻¹ BAP favorece la propagación in vitro de *A. potatorum*. Sin embargo, los autores no reportaron el número de brotes por explante.

Enraizamiento in vitro

Se observaron diferencias significativas entre las diferentes combinaciones y concentraciones de ANA y AIA. También se observó una interacción entre ANA y AIA en el análisis bifactorial para la longitud de los brotes. Por otra parte, no se observó ninguna interacción asociada con el número de hojas, número de raíces y longitud de raíces (Cuadro 2). La longitud de brote más grande se observó en el tratamiento control y

Cuadro 2. Enraizamiento in vitro y supervivencia durante la aclimatización de *Agave potatorum* después de 60 días de cultivo en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y AIA.

ANA (mg L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)	Respuesta (%)	Longitud de los brotes (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Supervivencia (%)
0.00	0.00	100±0.00 a	5.04±0.29 a*	3.87±0.19 a	3.87±0.83 a	7.03±0.35 a	99.33±0.66 a
0.00	1.50	100±0.00 a	5.31±0.34 a	3.87±0.19 a	3.93±0.70 a	6.82±0.43 a	99.33±0.66 a
0.00	3.00	100±0.00 a	5.77±0.35 a	3.73±0.21 a	4.20±0.77 a	6.91±0.43 a	99.33±0.66 a
1.50	0.00	0.00 b	3.85±0.18 b	2.80±0.20 b	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
1.50	1.50	0.00 b	3.07±0.18 bc	2.73±0.18 b	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
1.50	3.00	0.00 b	3.0±0.15 bc	2.80±0.20 b	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
3.00	0.00	0.00 b	2.19±0.13 c	1.60±0.13 c	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
3.00	1.50	0.00 b	2.15±0.16 c	1.53±0.13 c	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
3.00	3.00	0.00 b	2.19±0.12 c	1.47±0.13 c	0.00 b	0.00 b	98.33±1.66 a
Factores		Valor de p					
AIA		0.000	0.574	0.828	0.460	0.937	1.000
ANA		1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.615
AIA × ANA		1.000	0.015	0.984	0.539	0.992	1.000

*Media ± EE (Error Estándar) Las medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, p ≤ 0.05).

con solo 1.5 mg L⁻¹ o 3.0 mg L⁻¹ de AIA. Estos tratamientos generaron brotes de 5.04, 5.31 y 5.77 cm de longitud (Figura 2A-C). Los brotes de menor tamaño, 2.1 cm de largo, se observaron en el tratamiento con 3.0 mg L⁻¹ de ANA y 3.0 mg L⁻¹ ANA + 1.5 o 3.0 mg L⁻¹ de AIA. En cuanto al número de hojas, el valor más elevado se observó con el tratamiento control y con AIA, los cuales desarrollaron en promedio 3.8 hojas por explante. Los explantes con menor número de hojas, 1.4 a 1.6 hojas por explante, se obtuvieron al suplementar el medio de cultivo con 3.0 mg L⁻¹ de ANA y con la combinación de 3.0 mg L⁻¹ ANA + 1.5 o 3.0 mg L⁻¹ AIA. En cuanto a las raíces, los brotes con el mayor número de raíces por explante, 3.8 a 4.2 raíces por brote, y con las raíces más largas, hasta 7 cm de longitud, se obtuvieron con el tratamiento control y con AIA; los otros tratamientos no indujeron el desarrollo de raíces (Figura 2D-F). Notablemente,

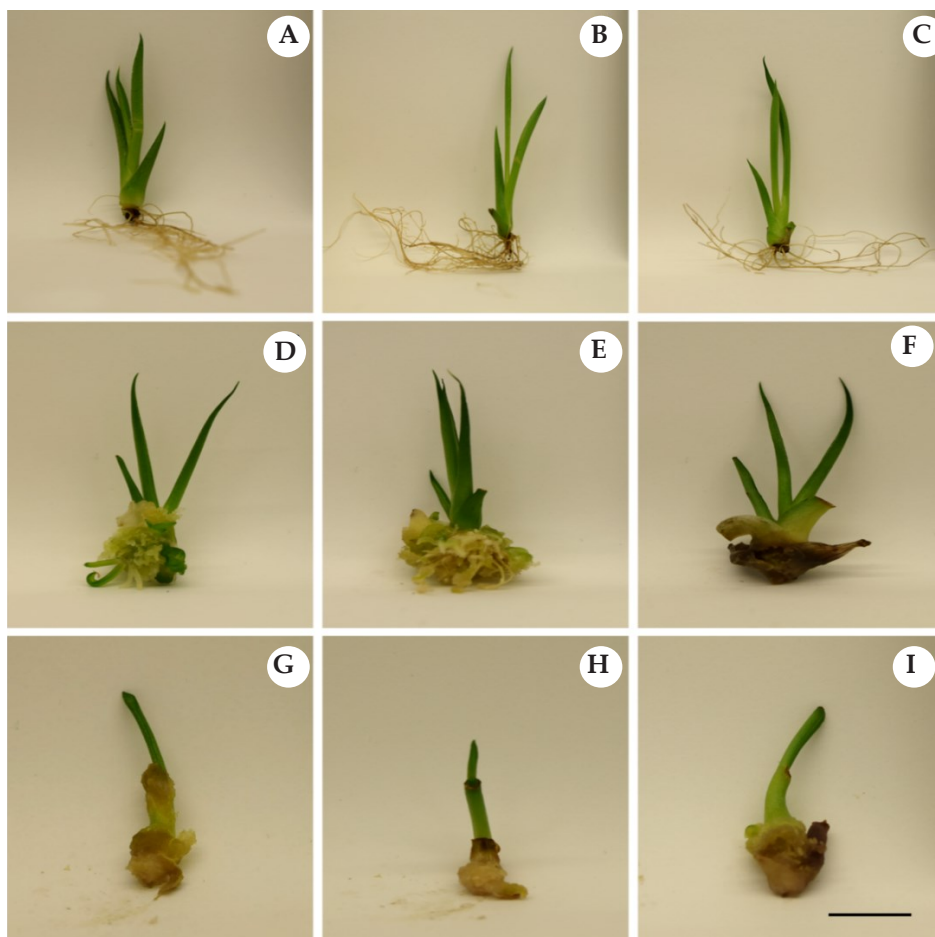


Figura 2. Efecto de las diferentes concentraciones ANA y AIA en el enraizamiento *in vitro* de *Agave potatorum*. A: 0 mg L⁻¹ ANA + 0 mg L⁻¹ AIA, B: 0 mg L⁻¹ ANA + 1.5 mg L⁻¹ AIA, C: 0 mg L⁻¹ ANA + 3 mg L⁻¹ AIA, D: 1.5 mg L⁻¹ ANA + 0 mg L⁻¹ AIA, E: 1.5 mg L⁻¹ ANA + 1.5 mg L⁻¹ AIA, F: 1.5 mg L⁻¹ ANA + 3 mg L⁻¹ AIA, G: 3 mg L⁻¹ ANA + 0 mg L⁻¹ AIA, H: 3 mg L⁻¹ ANA + 1.5 mg L⁻¹ AIA e I: 3 mg L⁻¹ ANA + 3 mg L⁻¹ AIA. Barra = 1 cm.

los tratamientos con 0 mg L^{-1} AIA + 1.5 mg L^{-1} ANA y 1.5 mg L^{-1} AIA + 1.5 mg L^{-1} ANA promovieron la formación de tejido calloso en la base de los explantes (Figure 2G-I). En este estudio, la combinación de auxinas no promovió la formación de raíces en *A. potatorum*. Los brotes mostraron la mayor producción de raíces con el tratamiento control o con AIA. Enríquez-del Valle *et al.* (2016b) observaron el desarrollo de raíces *in vitro* en 100 % de los brotes de *A. potatorum* con el tratamiento de 1.0 mg L^{-1} de ácido indolbutírico (AIB). Sin embargo, estos autores reportaron que todos los brotes desarrollaron raíces adventicias, incluso con el tratamiento control. Por otra parte, Domínguez-Rosales *et al.* (2008) obtuvieron un 87 % de enraizamiento con únicamente medio MS, sin reguladores de crecimiento vegetal.

En nuestro estudio, observamos la formación de tejido calloso con 1.5 mg L^{-1} de ANA y con la combinación de 1.5 mg L^{-1} de ANA + 1.5 mg L^{-1} de AIA. La producción de tejido calloso en *Agave tequilana* Weber se ha utilizado para promover la embriogénesis somática (Delgado-Aceves *et al.*, 2019; Monja-Mio *et al.*, 2019). La formación de tejido calloso durante la morfogénesis promueve la variación somaclonal de las plantas producidas (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2015). Este tipo de variación no es deseable cuando el objetivo es la propagación masiva para preservar la herencia genética de los materiales parentales (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008; Leva y Rinaldi, 2017). En el caso de *A. potatorum*, una ventaja es que el medio MS no requiere de auxinas para promover la formación de raíces durante la propagación. Durante la inmersión temporal *in vitro* de *A. potatorum*, Correa-Hernández *et al.* (2022) observaron que los explantes tenían un escaso o nulo sistema radical, al igual que un elevado porcentaje de supervivencia (95-98 %) en todos los tratamientos evaluados.

Aclimatización

En la etapa de aclimatización, todas las plántulas obtenidas de los diferentes tratamientos de enraizamiento presentaron tasas de supervivencia por arriba del 98 %. La Figura 3 muestra plántulas *ex vitro* trasplantadas a invernadero y campo bajo un sistema de irrigación por goteo.

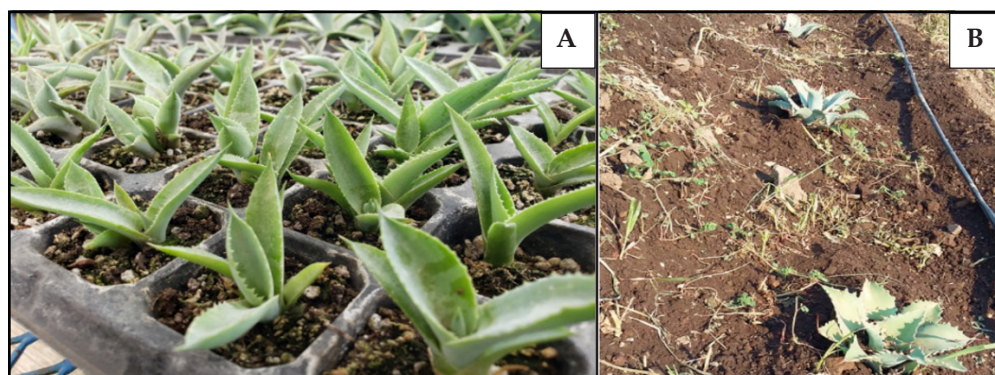


Figura 3. Plantas de *Agave potatorum ex vitro*. A: Plantas después de cuatro meses de aclimatización en invernadero; B: plantas después de cuatro meses en condiciones de campo.

La alta tasa de supervivencia (98-100 %) observada en este estudio contrasta con aquella reportada por Domínguez-Rosales *et al.* (2008) y Enríquez-Del Valle *et al.* (2016a), quienes reportaron una supervivencia del 73 % para las plantas de *A. potatorum* propagadas *in vitro*. Por otro lado, Enríquez-Del Valle *et al.* (2016b) no reportaron la tasa de supervivencia durante el periodo de aclimatación. En este estudio, los brotes obtenidos con todos los tratamientos alcanzaron altas tasas de supervivencia, independientemente de la presencia o ausencia de raíces. La supervivencia durante el periodo de aclimatación está relacionada con el vigor de la planta y un sistema foliar altamente desarrollado (Monja-Mio *et al.*, 2015; Martínez-Estrada *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2020). Aunado a esto, el contenido de ceras, el grosor de la cutícula y el tipo de metabolismo (CAM) de *A. potatorum* contribuyeron a la elevada tasa de supervivencia observada durante el proceso de aclimatación. Factores externos, como contenido de agua (irrigación), fertilización, tipo de sustrato y condiciones ambientales (luz, temperatura y humedad relativa), también regulan la supervivencia *ex vitro*. Además, la anatomía y fisiología del género *Agave*, junto con el manejo adecuado del invernadero, probablemente contribuyeron al desarrollo y supervivencia de las plántulas *ex vivo*. Luna-Luna *et al.* (2017) reportaron que la fertirrigación durante la aclimatación asegura el desarrollo óptimo de las plantas de *A. potatorum* obtenidas *in vitro*.

CONCLUSIONES

Este estudio estableció un protocolo eficiente para la micropropagación de *Agave potatorum*, lo cual queda evidenciado por las altas tasas de supervivencia de las plantas regeneradas. La interacción de 1.5 mg L⁻¹ BAP + 3.0 mg L⁻¹ AIA es efectiva para la multiplicación de explantes de esta especie, dando como resultado un mayor número de brotes por explante. Por otra parte, el medio de cultivo MS por sí solo, sin ANA ni AIA, promueve el enraizamiento *in vitro*. Este trabajo contribuirá al desarrollo de propágulos para el establecimiento de plantaciones. Las cuales evitarán la sobreexplotación de poblaciones silvestres, ya que es altamente probable que la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010) incluya a *A. potatorum* como una especie en riesgo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Correa-Hernández L. por el apoyo técnico proporcionado. No se recibió ningún apoyo económico para la realización de este estudio.

REFERENCIAS

- Aguilar D, Rodríguez J. 2018. Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. Revista Colombiana de Biotecnología 20: 124–131. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Blancas J, Casas A, Rangel-Landa S, Moreno AI, Torres I, Pérez-Negrón E, Solís L, Delgado A, Parra F, Arellanes Y, Cortés L, Lira R. 2010. Plant Management in the Tehuacán Valley. Economic Botany 64: 287–302. <https://doi.org/10.1007/s12231-010-9133-0>
- Colunga-García MP, Saavedra A, Eguiarte L, Zizumbo-Villareal D. 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. In Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Instituto Nacional de Ecología. Yucatán, México.

- Correa-Hernández L, Baltazar-Bernal O, Sánchez-Páez R, Bello-Bello JJ. 2022. *In vitro* multiplication of agave tobalá (*Agave potatorum* Zucc.) using Ebb-and-Flow bioreactor. South African Journal of Botany 147: 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.009>
- Delgado-Aceves L, Palacios H, Romo-Paz F, Portillo L. 2019. Micropropagation Systems in *Agave* spp: common errors. In Gutiérrez A (ed) Sustainable and Integrated use of Agave 1st edition. Zapopan, Jalisco, Mexico, pp: 51–54.
- Delgado-Lemus A, Torres I, Blancas J, Casas A. 2014a. Vulnerability and risk management of *Agave* species in the Tehuacán Valley, México. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 10: 53. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4269-10-53>
- Delgado-Lemus A, Casas A, Téllez O. 2014b. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacan Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 10: 63. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4269-10-63>
- Dominguez-Rosales M, Alpuche A, Vasco N, Pérez-Molphe E. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. Revista Fitotecnia Mexicana 31: 317–322.
- Enríquez-del Valle J, Alcará S, Rodríguez G, Miguel M, Manuel C. 2016a. Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7: 1167–1177.
- Enríquez-del Valle J, Antonio-Luis K, Rodríguez-Ortiz G, Campos-Ángeles G. 2016b. Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants. Ciencia e Investigación Agraria 43: 263–272. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202016000200009>
- Faisal M, Ahmad N, Anis M, Alatar A, Wahtan A. 2018. Auxin-cytokinin synergism *in vitro* for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. Saudi Journal of Biological Sciences 25: 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.09.009>
- Félix-Valdez LI, Vargas-Ponce O, Cabrera-Toledo D, Casas A, Cibrian-Jaramillo A, Cruz-Larios L. 2015. Effects of traditional management for mescal production on the diversity and genetic structure of *Agave potatorum* (Asparagaceae) in central Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution 63: 1255–1271. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0315-6>
- Gupta S, Kachhwaha S, Kothari S, Jain R. 2020. Synergistic effect of cytokinins and auxins enables mass clonal multiplication of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam): a wonder. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10065-0>
- Hernández-Castellano S, Garruna-Hernandez, R, Us-Camas R, Ku-Gonzalez A, De-la-Pena C. 2020. *Agave angustifolia* albino plantlets lose stomatal physiology function by changing the development of the stomatal complex due to a molecular disruption. Molecular Genetics and Genomics 295: 787–805. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01643-y>
- Hoang NN, Kitaya Y, Shibuya T, Endo R. 2020. Effects of supporting materials in *in vitro* acclimatization stage on *ex vitro* growth of wasabi plants. Scientia Horticulturae 261. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109042>
- Leva A, Rinaldi LMR. 2017. Somaclonal variation. In Thomas B, Murray B, Murphy D (ed) Encyclopedia of Applied Plant Sciences 2nd edition. United States, pp: 468–473. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00150-7>
- Luna-Luna S, Enríquez-del Valle J, Rodríguez-Ortiz G, Carrillo-Rodríguez J, Velasco-Velasco V. 2017. Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatizadas de *Agave potatorum* Zucc. fertirrigadas en vivero. Revista Fitotecnia Mexicana 40: 491–494.
- Martínez-Estrada E, Islas-Luna B, Pérez-Sato JA, Bello-Bello JJ. 2019. Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreaeanum* Lind. Scientia Horticulturae 249: 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.053>
- Monja-Mio KM, Barredo PF, Herrera HG, Esqueda VM, Robert ML. 2015. Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. Scientia Horticulturae 189: 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>
- Monja-Mio KM, Herrera-Alamillo MA, Sánchez-Teyer LF, Robert ML. 2019. Breeding Strategies to Improve Production of Agave (*Agave* spp.). In: Al-Khayri J, Jain S, Johnson D (eds) Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops. Springer, Cham, pp: 319–362. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8_10

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth y bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pérez-Molphe-Balch E, Esparza M, Pérez M. 2012. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 279–287.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG. 2015. Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123: 657–664. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0868-2>
- Rangel-Landa S, Casas A, Dávila P. 2015. Facilitation of *Agave potatorum*: An ecological approach for assisted population recovery. *Forest Ecology and Management* 347: 57–74. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.03.003>
- Rodríguez-Garay B, Rodríguez-Domínguez JM. 2018. Micropropagation of Agave Species. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1815. Humana Press, New York, NY, pp: 151–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_8
- Sara H, René G, Rosa U, Us Camas R, Kú Gonzalez A, De la Peña C. 2020. *Agave angustifolia* albino plantlets lose stomatal physiology function by changing the development of the stomatal complex due to a molecular disruption. *Molecular Genetics and Genomics* 295: 787–805. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01643-y>
- SEMARNAT, 2010. NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y Fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. SEMARNAT, CDMX.
- Su YH, Liu YB, Zhang XS. 2011. Auxin-Cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* 4: 616–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Torres I, Casas A, Vega E, Martínez-Ramos M, Delgado-Lemus A. 2015. Population Dynamics and Sustainable Management of Mescal Agaves in Central Mexico: *Agave potatorum* in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. *Economic Botany* 20. <https://doi.org/10.1007/s12231-014-9295-2>
- Us-Camas R, Castillo-Castro E, Aguilar-Espinosa M, Limones-Briones V, Rivera-Madrid R, Robert-Díaz M, De-la-Peña C. 2017. Assessment of molecular and epigenetic changes in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science* 263: 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.07.010>
- Vieira C, Carvalho F, Lima-Melo Y, Carvalho C, Lima M, Martins M, Silveira J. 2020. Integrative approach reveals new insights into photosynthetic and redox protection in *ex vitro* tobacco plantlets acclimatization to increasing light intensity. *Biotechnology Research and Innovation* 58. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2020.04.001>

Agrociencia

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF LEAFY GREEN VEGETABLES GROWN IN THE TOLUCA VALLEY

Rosa Laura Ocaña-de Jesús¹, Itzel Rojas-Puebla¹, Ana Tarín Gutiérrez-Ibáñez^{1*}, Jesús Ricardo Sánchez-Pale¹, Pedro Antonio García-Saucedo², Luz Raquel Bernal-Martínez¹

¹ Universidad Autónoma del Estado de México. Campus Universitario El Cerrillo. Facultad de Ciencias Agrícolas. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México, México. C. P. 50295.

² Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología Presidente Juárez. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, Uruapan, Michoacán, México. C. P. 60170.

* Author for correspondence: atarini@uaemex.mx

ABSTRACT

The intake of fresh fruits and vegetables has increased in recent years, as have outbreaks of foodborne illnesses associated with these products. The risk of microbiological hazards in vegetables can occur from the field to the table. The main sources of contamination are agricultural soil and irrigation water, which can affect product quality and be a reservoir of foodborne pathogenic bacteria. This research analysed the microbiological quality of green leafy vegetable crops: spinach (*Spinacia oleracea* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.), grown in the valley of Toluca. The presence of microorganisms indicating microbiological contamination (mesophilic bacteria, total coliforms, faecal coliforms and *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Listeria*) was evaluated in plants, water and soil. Sampling, processing, isolation and bacterial identification were performed in accordance with Mexican Official Standards and the FDA Bacteriological Analytical Manual. The recovered bacteria were subjected to biochemical tests, serotyping and PCR. Microbial counts were present in 100 % of the samples tested. The spinach culture had higher recovery of mesophilic bacteria and total coliforms, while the lettuce culture presented higher values for the faecal coliform group. The results indicated higher microbiological contamination in water and soil > 250 CFU for mesophilic bacteria, total coliforms and faecal coliforms, respectively. The microbiological counts of the three cultures were found within the maximum limits established by Mexican regulations. However, the presence of faecal coliforms, which included *E. coli* bacteria of serotype O105 ab flagellar, compromises the quality of the product and poses a risk to the health of the consumer.

Keywords: contamination, irrigation, mesophilic bacteria, coliforms, *Escherichia coli*.

INTRODUCTION

Vegetables constitute an important food source worldwide that provides carotene, vitamin C, calcium, iron and other minerals (SIAP, 2018). Due to production characteristics, they can be contaminated at any point in the development of the crop, harvesting, processing, distribution and final preparation (Maffei *et al.*, 2016). Organic

Citation: Ocaña-de Jesús RL, Rojas-Puebla I, Gutiérrez-Ibáñez AT, Sánchez-Pale JR, García-Saucedo PA, Bernal-Martínez LR. 2022. Microbiological quality of leafy green vegetables grown in the Toluca Valley. *Agrociencia*. 56(6): 1155-1175. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2545>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: April 05, 2022.
Approved: August 28, 2022.
Published in Agrociencia:
October 05, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



fertilizers, irrigation water quality and soil are important sources of contamination (Rajwar *et al.*, 2016). For example, Rodriguez *et al.* (2015) indicated that leafy vegetables allow microorganisms to be preserved in the wetter areas of the plants and remain protected from direct sunlight (Rodriguez *et al.*, 2015). The consumption of fresh and minimally processed vegetables can pose a health risk and cause foodborne illness (Kuan *et al.*, 2017). On this account, it is important to detect indicator organisms that may suggest exposure, inadequate handling and preservation of a food. Such organisms may indicate contamination of faecal origin or hygiene failure during the production chain (OPS, 2020).

The microbiological study of fresh products can be performed by phenotypic and molecular tests so that the pathogen can be properly identified (Rajwar *et al.*, 2016). Among the most frequently identified indicator organisms in food and water are aerobic mesophilic bacteria, total coliforms and faecal coliforms that represent a health risk, including *Listeria* spp., *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* (NOM-210-SSA1-2014). Jeamsripong *et al.* (2019) reported the transfer of *E. coli* from animal faeces to lettuce through irrigation. Iwo and Okoh (2019) found that vegetable production is exposed to different sources of contamination during primary production. Likewise, the outbreaks reported by the Center for disease Control and Prevention (CDC) from the USA since 2020 have been due to the presence of *Salmonella* Montevideo and *E. coli* O157:H7 in the consumption of sprouts, romaine lettuce, baby spinach and some other leafy green vegetables; water and handlers have been identified as the sources of contamination (Iwu and Okoh, 2019; CDC, 2021).

All this emphasizes the importance of identifying and preventing contamination in vegetable production. Therefore, the objective of this study was to determine the microbiological quality through the quantification of aerobic mesophilic organisms (AM), total coliforms (TC) and faecal coliforms (FC) in lettuce (*Lactuca sativa*), coriander (*Coriandrum sativum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) grown in the valley of Toluca, to determine if the evaluated foods pose a risk for consumers.

MATERIALS AND METHODS

Study area and samples

Sampling was conducted in the municipalities of Tenango del Valle (18° 39' 07" 99° N; 99° 31' 37" W), Toluca de Lerdo (19° 16' 41" N; 99° 39' 23" W), and Calimaya (19° 10' 25" N; 99° 37' 02" W) which belong to the State of Mexico (INEGI, 2022).

Samples were collected randomly from plots of 500 m² planted with coriander (Hercules variety), lettuce (Romain) and spinach (Viking). A total of 180 plant samples were analysed; 60 per vegetable, 10 per commercial plot (two per municipality). Similarly, two samples of 1000 mL of water from the wells used for irrigation of each plot were obtained. The substrate was taken at a depth of 20 cm in five points of the entire planted area to form a composite sample of each plot.

Microbiological analysis

Microbiological analyses were performed at the Food Safety Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Autónoma del Estado de México. Sampling was done in accordance with Mexican Official Standard NOM-109-SSA1-1994, which establishes the collection, transport, and handling of samples for microbiological analysis. For sample preparation, 10 g of plant material and soil were weighed (separately) under aseptic conditions. Then each sample was blended and homogenized in 90 mL of sterile peptonized saline water (0.15 % peptone + 0.85 % NaCl) for 1 minute in an Osterizer blender. From this suspension, 1 mL was added to tubes with 9 mL of peptonized water to compose serial decimal dilutions (10^{-1} , 10^{-2}) (NOM-110-SSA1-1994) for subsequent plate seeding. The water samples were seeded directly, with the addition of 1 mL of water in the corresponding culture media for each microorganism.

Aerobic mesophilic bacteria

For the quantification of mesophilic bacteria, the procedure described in NOM-092-SSA1-1994 and FDA (2022) was followed. An aliquot of 1 mL of each previously prepared dilution was taken and placed separately in the centre of a sterile Petri dish to which the standard count agar (BD BIOXON®) was added; the dishes were incubated for 48 h at 35 ± 2 °C; each sample was processed in triplicate. Once the incubation time had elapsed, all the colonies were quantified, following the guidelines of this same standard; the results are reported in CFU mL⁻¹.

Total and faecal coliforms

Coliform quantification was performed according to NOM-113-SSA1-1994; 1 mL was taken from the serial dilutions and incorporated in red violet bile lactose agar (BD BIOXON®). The dishes for total coliforms were incubated at 35 ± 2 °C for 48 h; and for faecal coliforms at 45 ± 2 °C for 24 h. Afterwards, colony reading and counting was performed; all samples were seeded in triplicate, and a Petri dish without inoculum was included as a negative control.

Results for each microbial group were reported in Log CFU mL⁻¹ (for better handling and understanding); and were also compared with the maximum permissible limits (MPL) established by the Mexican Standard NOM-093-SSA1-1994.

If faecal coliforms (FC) were present, we proceeded to the analysis for the identification of enterobacteria; a Gram stain was performed to observe whether the isolates corresponded to the group of Gram-positive or negative bacteria. When only Gram-negative colonies were present, they were inoculated on selective media for each bacterium of interest. For the identification of *E. coli*, colonies were seeded on Eosin and Methylene Blue agar (BD BIOXON®) and *Escherichia coli* O157:H7 agar (DIBICO®). In the case of *Salmonella*, pre-enrichment was performed in universal enrichment broth (DIBICO) to proceed to seeding on Salmonella-Shigella agar (BD BIOXON®), Brilliant green (BD BIOXON®) and Xylose Lysine Deoxycholate Agar (DIBICO). Since

there was only growth in the selective media for *E. coli*, the microorganisms were identified by biochemical tests at species level by using indole, methyl red, Voges-Proskauer, citrate, TSI (Triple sugar iron), urea hydrolysis, ornithine decarboxylation and mobility reactions (Table 1).

Confirmation of the identity of *E. coli* was performed by the serotyping procedure using the method updated by Scheutz (Scheutz *et al.*, 2004). The procedure was performed through agglutination assays in 96-cavity micro titre plates and rabbit antisera against 181 somatic antigens (O) and 65 flagellar antigens (H) prepared in rabbits (SERUNAM® Mexico), according to the procedure described by Orskov and Orskov (1984).

The strains characterized as *E. coli* had their phylogenetic group determined with multiplex PCR described by Clermont (Clermont *et al.*, 2000). The presence of the genes *ChuA*, *YjaA* and the DNA fragment TspE.4C2, which define the four phylogenetic groups established for the bacteria (A, B1, B2 and D), was analysed.

The PCR was performed using a standard protocol. Each reaction was carried out in a final mixture of 20 µL under the following conditions: denaturation for 5 min at 94 °C; 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 30s at 72 °C, concluding with a final extension of 7 min at 72 °C. The primers used were *ChuA* (F:5'-GAG GAA CCA ACG GTC AGG AT-3', and R: 5'-TGC CGC CAG TAC CAA AGA AC-3'); *YjaA* (F:5'-TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG-3', and R:5'-ATG GAG AAT GCG TTC CTC AA-3'), and the TspE.4 fragment. C2 (F:5'-GAGTAATGT CGG GGC ATT CA-3', and R:5'-CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG-3'), which generated fragments of 279, 211, and 152 bp, respectively.

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized experimental design was followed, for which samples were taken from three vegetable crops (spinach, lettuce, and coriander), from two plots per municipality in three different municipalities with a total of 180 samples. Similarly, we collected water samples (2 samples of 1000 mL per plot) and soil (composite sample per plot) used in each crop. Each sample was collected and analysed in triplicate.

The results were evaluated by analysis of variance ($p \leq 0.05$) to detect differences between municipalities and by vegetable for the different microbial groups. When there was significant difference, the Tukey test ($p \leq 0.05$) was applied; the SAS® statistical program (SAS Institute, Inc., 2002) was used for both procedures.

Table 1. Biochemical tests for the identification of *Escherichia coli*.

	I	M	O	Vp	Rm	Cs	U	TSI	H ₂ SO ₃	Result
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	+	-	-	A/A	-	Positive
<i>Salmonella</i>	+	+	+	-	+	-	-	A/A	-	Negative

I: indole, M: mobility, O: ornithine, Vp: Voges-Proskauer, Rm: methyl red, Cs: Simmons citrate, U: urea, H₂SO₃: hydrogen sulphide production; TSI: Triple sugar iron.

RESULTS AND DISCUSSION

In the three municipalities and in all the crops, microorganisms were found, which indicated the microbiological quality of those crops. There were significant differences ($p \leq 0.05$) among the cultures analysed (Table 2).

In the municipality of Tenango del Valle, the recovery of aerobic mesophilic bacteria in lettuce was 10 % higher with a significant difference compared to Calimaya and Toluca. For the total coliform group, the highest recovery was obtained in Tenango del Valle. The same was observed in Calimaya for the faecal coliforms group.

In the case of spinach, aerobic mesophilic bacteria and total coliforms showed significant differences among municipalities, with the highest counts in Tenango del Valle and Toluca, respectively. Similarly, in the municipality of Calimaya there was a higher presence of faecal coliforms.

For the coriander crop, the three municipalities showed significant statistical differences for aerobic mesophilic bacteria, total and faecal coliforms, with the highest recoveries in Tenango del Valle and Toluca.

Crop contamination contrasts with the statement of Maffei *et al.* (2016) who emphasized that microbiological contamination does not always occur in fresh produce cultivation. In addition, it is related to cultural practices, such as the use of animal manure, which can act as a vehicle for pathogen transmission to the crop (Kuan *et al.*, 2017).

It is worth noticing the characteristics observed in the production units of the different crops. These were in the open and the water was stagnant; there were also farm and domestic animals; thus, the lack of better agricultural practices (BAP) was notable. Agroecosystem production niches may contribute to the dissemination of bacterial pathogens associated with produce consumed fresh (Iwu and Okoh, 2019).

Aerobic mesophilic bacteria, total coliforms and faecal coliforms in lettuce, spinach and coriander at the sampled locations were found to be within the maximum permissible

Table 2. Quantification of microorganisms present in vegetables in three municipalities of the Valley of Mexico.

Vegetable	Microorganisms	Municipalities		
		Calimaya	Toluca	Tenango del Valle
Lettuce	AM [†]	3.28 ± 1.82 a	3.26 ± 1.07 a	3.60 ± 1.72 b
	TC [§]	2.51 ± 1.18 a	3.05 ± 1.08 b	3.17 ± 1.34 c
	FC [‡]	1.97 ± 0.60 a	1.89 ± 0.61 b	0.63 ± 1.52 c
Spinach	AM	4.26 ± 2.07 a	3.97 ± 1.40 b	4.58 ± 1.63 c
	TC	3.66 ± 0.67 a	4.00 ± 2.07 b	3.91 ± 1.52 b
	FC	1.32 ± 0.40 a	0.31 ± 0.18 b	0.41 ± 0.18 b
Coriander	AM	3.23 ± 1.56 a	4.09 ± 1.66 b	4.41 ± 2.05 c
	TC	3.00 ± 1.73 a	3.64 ± 1.67 b	3.27 ± 1.63 c
	FC	1.59 ± 0.35 a	1.32 ± 0.23 b	1.76 ± 0.02 c

[†]Average bacterial counts expressed in logarithms of colony forming units (CFU mL⁻¹);
[‡]AM: aerobic mesophilic bacteria, [§]TC: total coliforms, [‡]FC: faecal coliforms. Means with different letters indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$).

limit (MPL) established by Mexican Official Standard NOM-093-SSA1-1994. However, bacterial recovery in 100 % of the samples reflect the need to include better agricultural practices, as high microbial counts are fertile ground for field-originated contamination to increase at any of the stages through which the product must pass, from harvest to fresh consumption (Iwu and Okoh, 2019).

The presence of mesophilic bacteria (this study), as well as high microbial counts can lead to decomposition, post-harvest losses and outbreaks of foodborne infections in case of contamination with pathogens in consumed products (Praeger *et al.*, 2018). Of much greater concern is the presence of microorganisms harmful to health, not visible to the naked eye or detectable through changes in appearance, taste, colour or other external characteristic. Certain pathogens have been shown to have the ability to persist on produce long enough to constitute a hazard to humans (Ocaña *et al.*, 2019). The recovery of faecal coliforms points to failures in production and different routes of contamination (water, soil, insects, animals, handlers). Therefore, there is a health risk for consumers (FDA, 2020).

The water used for irrigation in each municipality presented counts of the three microbial groups evaluated with the highest CFU in Toluca for aerobic mesophilic bacteria, and Tenango del Valle for coliforms (Figure 1). One of the Tenango del Valle sampling sites exceeded the World Health Organization recommendation, which states that the water used for irrigation of fresh produce must not exceed 100 CFU mL⁻¹ (2 Log CFU mL⁻¹) of faecal coliforms (WHO, 2019). The water consumed at the different production sites was from surface wells, which makes them susceptible to microbiological contamination (Iwu and Okoh, 2019). Globally one of the main irrigation systems used to apply to plots is rolling or gravity irrigation. This irrigation

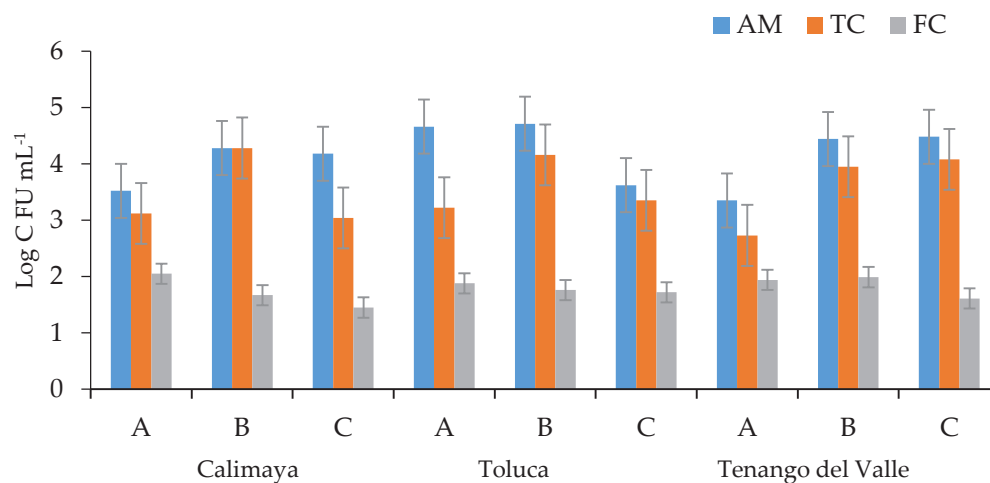


Figure 1. Average bacterial counts (CFU mL⁻¹) of aerobic mesophilic bacteria, total coliforms and fecal coliforms in water from production units in the three municipalities of the Valley of Mexico. A, B, C: evaluated plots.

is characterized by taking advantage of the slope to transport water, so there is infiltration, evaporation, leakage and runoff (SIAP, 2018). *E. coli* and *Salmonella* have been detected in water bodies exploited for agricultural use (Benjamin *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015).

Microbiological contamination of each microbial group evaluated was found in the soil in which each crop was grown (Figure 2). It is of the utmost importance that irrigation water and agricultural soil present a good microbiological quality, since there are reports of transfer and survival of enteropathogenic bacteria to the plant through irrigation (Ocaña *et al.*, 2018). Soil-to-plant contamination can occur, as noted by Lee *et al.* (2019), through splash transfer of *Salmonella* from soil to crops; this poses a hazard to product safety. In addition, these factors can raise the bacterial levels in harvested products (Benjamin *et al.*, 2013).

Due to the presence of aerobic mesophilic bacteria and coliform groups, both the soil and the water used in the crops can be identified as possible sources of contamination of the vegetables analysed. The microbiological quality of the water used for irrigation is very important for the safety of horticultural products such as lettuce, spinach, coriander, among others, since these products are consumed fresh. However, in Mexico and in some other countries, water quality is not defined at regulations in the production of vegetables marketed in popular markets and supply centres. The poor microbiological quality of water and soil found coincides with a study where *E. coli* was detected in baby spinach grown in three regions of Spain, where those authors reported that soil and irrigation water are important factors of microbial contamination affecting food safety (Castro *et al.*, 2015). Manure-based fertilizer, flies, vegetable

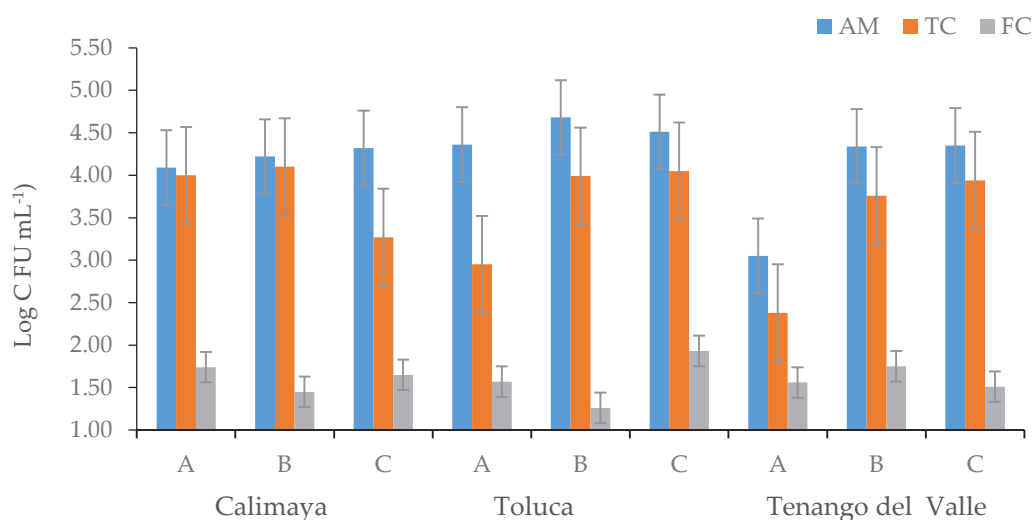


Figure 2. Average bacterial counts (CFU mL⁻¹) of aerobic mesophilic bacteria, total coliforms and faecal coliforms in agricultural soil of the production units in three municipalities of the Valley of Mexico. A, B, C: evaluated plots.

cultivation near livestock, transportation and handling in the production chain have been identified as vectors and sources of faecal and pathogen contamination for plants (Benjamin *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015).

Bacterial colonies subjected to staining grouped the bacteria within the Gram-negatives, while growth on specific agars and complementary biochemical tests were positive only for *E. coli*. The serotyping results classified the *E. coli* isolates within the flagellar serotype O105ab from the coriander isolates, and the PCR reaction amplified 152 bp fragments that placed the bacteria in phylogenetic group A. However, there are studies highlighting that the O antigen gene cluster of *E. coli* O105 has the same genes and organization from *Shigella boydii* O11, which may influence the survival and invasion of the bacteria, which are presented as a risk factor, even when it is thought that washing can eliminate this type of contamination (Tao *et al.*, 2004; Kniret *et al.*, 2016). Likewise, several studies have identified faecal contamination and the presence of pathogenic microorganisms in vegetables such as spinach, lettuce and other crops for fresh consumption (Jiménez *et al.*, 2010; Puig *et al.*, 2014). In some cases, they did not exceed the maximum permissible limit; however, there were enteropathogenic microorganisms dangerous to humans. With proper monitoring of crop growing conditions, water quality and agricultural soil, the incidence of bacterial pathogens in fresh vegetal products could be minimized to try to ensure their safety.

CONCLUSIONS

The microbial counts obtained in this research, even when they place vegetables within the established limits, indicate that they may have contamination of faecal origin and act as vehicles for the transmission of faecal contaminants, such as *Escherichia coli*, to people through the daily diet. Although in Mexico this bacterium is only reported to be responsible for secretory diarrhoea and persistent diarrhoea, in European countries and the United States it has caused outbreaks and deaths. Therefore, it is important to constantly monitor the sources of microbiological contamination in products for fresh consumption, especially those in production units for exports.

The quality of the water used for irrigation and the soil where the crop is grown can affect the level of contamination present in vegetables and drastically reduce their quality. Surveillance during production, and the implementation of better agricultural practices programs for producers and workers are necessary, as well as the implementation of post-harvest treatment of the vegetables grown.

REFERENCES

- Barrera-Escorcía G, Fernández-Rendón CL, Wong-Chang I, Ramírez-Romero P. 2013. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. *Hidrobiológica* 23 (1): 87–96.
- Benjamin L, Atwill ER, Jay-Russell M, Cooley M, Carychao D, Gorski L, Mandrell RE. 2013. Occurrence of generic *Escherichia coli*, *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. in water and sediment from leafy green produce farms and streams on the Central California coast. *International Journal of Food Microbiology* 165 (1): 65–76. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.003>

- Castro-Ibáñez I, Gil MI, Tudela JA, Ivanek R, Allende A. 2015. Assessment of microbial risk factors and impact of meteorological conditions during production of baby spinach in the Southeast of Spain. *Food Microbiology*. 49: 173–181. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.004>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2021. Reports of *Escherichia coli* Outbreaks 2020. US Department of Health and Human Services. USA. <https://www.cdc.gov/ecoli/2020-outbreaks.html> (Retrieved: May 2022).
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (10): 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- FDA (Food and Drug Administration). 2020. BAM [Bacteriological Analytical Manual] Chapter 4. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria> (Retrieved: June 2020).
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2022. México en cifras. Indicadores sociodemográficos y económicos por área geográfica (nacional, entidad federativa, municipio y localidad). Aguascalientes, Aguascalientes, México. <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/#collapse-Indicadores> (Retrieved: April 2022)
- Iwu CD, Okoh AI. 2019. Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (22): 4407. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224407>
- Jeamsripong S, Chase JA, Jay-Russell MT, Buchanan RL, Atwill ER. 2019. Experimental in-field transfer and survival of *Escherichia coli* from animal feces to Romaine lettuce in Salinas Valley, California. *Microorganisms* 7 (10): 408. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100408>
- Jiménez KB, McCoy CB, Achí R. 2010. Detection of shigella in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity. *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (4): 993–1000.
- Knirel YA, Qian C, Shashkov AS, Sizova OV, Zdorovenko EL, Naumenko OI, Senchenkova SN, Perepelov AV, Liu B. 2016. Structural relationships between genetically closely related O-antigens of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Biochemistry (Moscow)* 81: 600–608. <https://doi.org/10.1134/S0006297916060067>
- Kuan C-H, Rukayadi Y, Ahmad SH., Wan MR CWJ, Thung T-Y, Premarathne JMKJK, Chang W-S, Loo Y-Y, Tan C-W, Ramzi OB, Mohd Fadzil SN, Kuan C-S, Yeo S-K, Nishibuchi M, Radu S. 2017. Comparison of the microbiological quality and safety between conventional and organic vegetables sold in Malaysia. *Frontiers in Microbiology* 8: 01433. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01433>
- Lee D, Tertuliano M, Harris C, Vellidis G, Levy K, Coolong T. 2019. *Salmonella* survival in soil and transfer onto produce via splash events. *Journal of Food Protection* 82 (12): 2023–2037. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-066>
- Maffei DF, Batalha EY, Landgraf M, Schaffner DW, Franco BDGM. 2016. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. *Brazilian Journal of Microbiology* 47 (Suppl 1): 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.006>
- NOM-092-SSA1-1994. 1995. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html> (Retrieved: June 2020).
- NOM-093-SSA1-1994. 1995. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Apéndice B. De las especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4882432&fecha=04/10/1995#gsc.tab=0 (Retrieved: May 2020).
- NOM-110-SSA1-1994. 1995. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>. (Retrieved: July 2020).
- NOM-113-SSA1-1994. 1995. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html> (Retrieved: July 2020).

- NOM-210-SSA1-2014. 2015. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015 (Retrieved: July 2020).
- Ocaña RL, Gutiérrez AT, Sánchez JR, Mariezcurrena MD, Eslava CA, Laguna A. 2018. Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.); Revista Argentina de Microbiología 50 (4): 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.001>
- Ocaña-de Jesús RL, Gutiérrez-Ibáñez AT, Sánchez-Pale, JR, Mariezcurrena-Berasain MD, Laguna-Cerda A, Hernández-Chiñas U, Rojas-Puebla I. 2019. Motility and survival of *salmonella* enterica subspecies enterica serovar enteritidis in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L). International Microbiology 22: 363–368. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00059-3>
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2020. Inocuidad de alimentos – Control Sanitario – HACCP. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es (Retrieved: January 2021).
- Ørskov F, Ørskov I. 1984. 2 Serotyping of *Escherichia coli*. Methods in Microbiology 14: 43–112. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70447-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70447-1)
- Praeger U, Herppich WB, Hassenberg K. 2018. Aqueous chlorine dioxide treatment of horticultural produce: Effects on microbial safety and produce quality-A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 58 (2): 318–333. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1169157>.
- Proyecto NOM-109-SSA1-1994. 1994. Proyecto de Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación, México, D.F. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1109p.pdf> (Retrieved: January 2020).
- Puig PY, Leiva CV, Rodríguez Suárez A, Carrera VJ, Molejón PL, Pérez Muñoz Y, Dueñas MO. 2014. Microbiological quality of vegetables and factors associated with contamination in growing areas in Havana. Revista Habanera de Ciencias Médicas 13 (1): 111–119.
- Rajwar A, Srivastava P, Sahgal M. 2016. Microbiology of Fresh Produce: route of contamination, detection methods, and remedy. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 56 (14): 2383–2390. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.841119>
- Rodríguez QM, Zapata SME, Solano MMA, Lozano BD, Torrico F, Torrico RMC. 2015. Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. Gaceta Médica Boliviana 38 (2): 31–36.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS/STAT User's Guide. SAS version 9.0. Cary, NC, USA.
- Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith HR. 2004. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. Journal of Pathology: Microbiology, and Immunology – the APMIS Journal 112 (9): 569–584. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120903.x>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. En la agricultura, los sistemas de riego son utilizados para un aprovechamiento óptimo del agua. Artículos de opinión (blog digital). <https://www.gob.mx/siap/articulos/en-la-agricultura-los-sistemas-de-riego-son-utilizados-para-un-aprovechamiento-optimo-del-agua?idiom=es> (Retrieved: August 2020).
- Tao J, Feng L, Guo H, Li Y, Wang L. 2004. The O-antigen gene cluster of *Shigella boydii* O11 and functional identification of its *wzy* gene. FEMS Microbiology Letters 234 (1): 125–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09523.x>

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE HORTALIZAS DE HOJA VERDE CULTIVADAS EN EL VALLE DE TOLUCA

Rosa Laura Ocaña-de Jesús¹, Itzel Rojas-Puebla¹, Ana Tarín Gutiérrez-Ibáñez^{1*}, Jesús Ricardo Sánchez-Pale¹, Pedro Antonio García-Saucedo², Luz Raquel Bernal-Martínez¹

¹ Universidad Autónoma del Estado de México. Campus Universitario El Cerrillo. Facultad de Ciencias Agrícolas. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México, México. C. P. 50295.

² Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología Presidente Juárez. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, Uruapan, Michoacán, México. C. P. 60170.

* **Autor para correspondencia:** atarini@uaemex.mx

RESUMEN

La ingesta de frutas y hortalizas cuyo consumo es en fresco ha aumentado en los últimos años, al igual que los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos asociadas con estos productos. El riesgo de peligros microbiológicos en hortalizas puede ocurrir desde el campo hasta la mesa. Las fuentes de contaminación principales son el suelo agrícola y el agua de riego que pueden afectar la calidad del producto y ser reservorio de bacterias patógenas transmitidas por alimentos. En esta investigación se analizó la calidad microbiológica de cultivos de hortalizas de hoja verde: espinaca (*Spinacia oleracea* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.), cultivadas en el Valle de Toluca. Se evaluó la presencia de microorganismos indicadores de contaminación microbiológica (bacterias mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y la identificación de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria*) en plantas, agua y suelo. El muestreo, procesamiento, aislamiento e identificación bacteriana se realizó de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas y el Manual 'Bacteriological Analytical' de la FDA. Las bacterias recuperadas se sometieron a pruebas bioquímicas, serotipificación y PCR. El 100 % de las muestras analizadas presentaron recuentos microbianos. El cultivo de espinaca tuvo mayor recuperación de bacterias mesófilas y coliformes totales, mientras que el cultivo de lechuga presentó valores superiores para el grupo de coliformes fecales. Los resultados indicaron mayor contaminación microbiológica en agua y suelo > 250 UFC para mesófilos, coliformes totales y fecales respectivamente. Los recuentos microbiológicos de los tres cultivos se encontraron dentro de los límites máximos establecidos por la normatividad mexicana. Sin embargo, la presencia de coliformes fecales que incluyó bacterias *E. coli* del serotipo O105 ab flagelar, compromete la calidad del producto y pone en riesgo la salud del consumidor.

Palabras clave: contaminación, riego, mesófilos, coliformes, *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

Las hortalizas constituyen una importante fuente de alimento a nivel mundial que aporta caroteno, vitamina C, calcio, hierro y otros minerales (SIAP, 2018). Por las características de producción se pueden contaminar en cualquier punto del desarrollo

Citation: Ocaña-de Jesús RL, Rojas-Puebla I, Gutiérrez-Ibáñez AT, Sánchez-Pale JR, García-Saucedo PA, Bernal-Martínez LR. 2022. Calidad microbiológica de hortalizas de hoja verde cultivadas en el Valle de México.

Agrociencia. 56(6): 1155-1175. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2545>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: April 05, 2022.
Approved: August 28, 2022.

Published in Agrociencia:
October 05, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



del cultivo, cosecha, procesamiento, distribución y preparación final (Maffei *et al.*, 2016). Los fertilizantes orgánicos, la calidad del agua de riego y el suelo son fuentes importantes de contaminación (Rajwar *et al.*, 2016). Por ejemplo, Rodríguez *et al.* (2015) indicaron que las hortalizas de hoja permiten que los microorganismos se preserven en las áreas más húmedas de las plantas y permanezcan protegidos de los rayos directos del sol (Rodríguez *et al.*, 2015). El consumo de hortalizas frescas y con procesamiento mínimo pueden constituir un riesgo para la salud y provocar enfermedades transmitidas por alimentos (Kuan *et al.*, 2017). Por esta razón es importante la detección de organismos indicadores que pueden sugerir exposición, manipulación y conservación inadecuada de un alimento. Estos organismos pueden indicar una contaminación de origen fecal o falla en la higiene durante la cadena productiva (OPS, 2020).

El estudio microbiológico de productos frescos se puede realizar por medio de exámenes fenotípicos y moleculares para que se pueda identificar al patógeno de manera adecuada (Rajwar *et al.*, 2016). Dentro de los organismos indicadores identificados con mayor frecuencia en alimentos y agua se encuentran los mesófilos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales que representan un riesgo para la salud; entre los cuales se incluyen *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* (NOM-210-SSA1-2014).

Jeamsripong *et al.* (2019) reportaron la transferencia de *E. coli* de heces de animales a lechuga por medio del riego. Iwo y Okoh (2019) refirieron que la producción de hortalizas está expuestas a diferentes fuentes de contaminación durante la producción primaria. Así mismo, los brotes reportados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos desde el 2020 han sido por la presencia de *Salmonella* Montevideo y *E. coli* O157:H7 en el consumo de germinados, lechuga romana, espinacas baby y algunas otras hortalizas de hoja verde; y se ha identificado al agua y los manipuladores como las fuentes de contaminación (Iwu y Okoh, 2019; CDC, 2021).

Todo esto resalta la importancia de identificar y prevenir la contaminación en la producción de hortalizas. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue conocer la calidad microbiológica por medio de la cuantificación de organismos mesófilos aerobios (MA), coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en lechuga (*Lactuca sativa*), cilantro (*Coriandrum sativum*) y espinaca (*Spinacia oleracea*) cultivados en el valle de Toluca, para definir si los alimentos evaluados representan un riesgo para los consumidores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio y muestras

El muestreo se realizó en los municipios de Tenango del Valle (18° 39' 07" 99° N; 99° 31' 37" O), Toluca de Lerdo (19° 16' 41" N; 99° 39' 23" O), y Calimaya (19° 10' 25" N; 99° 37' 02" O) pertenecientes al Estado de México (INEGI, 2022).

Se colectaron muestras de forma aleatoria en parcelas que tenían una extensión de 500 m² sembradas con cilantro (variedad Hércules), lechuga (Romana) y espinaca (Vikingo). Se analizaron en total 180 muestras vegetales; 60 por hortaliza, 10 por cada

parcela comercial (dos por municipio). De igual forma se obtuvieron 2 muestras de 1000 mL del agua de los pozos utilizada para el riego de cada parcela. El sustrato se tomó a una profundidad de 20 cm en cinco puntos de toda la superficie sembrada para formar una muestra compuesta de cada parcela.

Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos fueron realizados en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. El muestreo se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 que establece la toma, transporte y manejo de la muestra para su análisis microbiológico. Para la preparación de las muestras, en condiciones asépticas se pesaron 10 g de material vegetal y suelo (por separado). A continuación, cada una de las muestras se licuó para homogeneizarla en 90 mL de agua salina estéril "peptonada" (0.15 % peptona + 0.85 % NaCl) por 1 minuto en una licuadora marca Osterizer. De esa suspensión obtenida se tomó 1 mL que se agregó a tubos con 9 mL del agua peptonada para constituir diluciones decimales seriadas (10^{-1} , 10^{-2}) (NOM-110-SSA1-1994) para siembra subsecuente en placa. Las muestras de agua se sembraron de manera directa, con la adición de 1 mL de agua en los medios de cultivo correspondientes para cada microorganismo.

Mesófilos aerobios

Para la cuantificación de mesófilos se siguió el procedimiento descrito en la NOM-092-SSA1-1994, y la FDA (2022). Se tomó una alícuota de 1 mL de cada dilución previamente preparada y se colocó por separado en el centro de una caja Petri estéril a la que se agregó el agar para cuenta estándar (BD BIOXON®), las cajas se incubaron por 48 h a 35 ± 2 °C; cada muestra se procesó por triplicado. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificaron todas las colonias, se siguieron los lineamientos de esta misma norma, los resultados se reportan en UFC mL⁻¹.

Coliformes totales y fecales

La cuantificación de coliformes se efectuó acorde con la norma NOM-113-SSA1-1994, de las diluciones seriadas se tomó 1 mL e incorporó en agar rojo violeta bilis lactosa (BD BIOXON®). Las cajas para coliformes totales se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 h; y para fecales 45 ± 2 °C durante 24 h. Después, se efectuó la lectura y conteo de colonias, todas las muestras se sembraron por triplicado y se incluyó una caja sin inóculo como control negativo.

Los resultados de cada grupo microbiano se reportaron en Log UFC mL⁻¹ (para mejor manejo y comprensión), además se compararon con los límites máximos permisibles (LMP) establecidos por la NOM-093-SSA1-1994.

Al existir presencia de CF, se procedió al análisis para la identificación de enterobacterias; se realizó una tinción de Gram para observar si los aislados correspondían al grupo de las bacterias Gram positivas o negativas. Al existir la presencia de solo colonias Gram negativas, se inocularon en medios selectivos para cada bacteria de interés.

Para la identificación de *E. coli*, las colonias se sembraron en agar de Eosina y Azul de Metileno (BD BIOXON®) y agar *Escherichia coli* O157:H7 (DIBICO®). Para el caso de *Salmonella* se realizó un pre-enriquecimiento en caldo de enriquecimiento universal (DIBICO) para proceder a la siembra en agar *Salmonella-Shigella* (BD BIOXON®), verde Brillante (BD BIOXON®) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (DIBICO). Ya que solo existió crecimiento en los medios selectivos para *E. coli*, se procedió a realizar la identificación por pruebas bioquímicas para determinar a nivel de especie los microorganismos por medio de las reacciones indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citrato, TSI (triple azúcar hierro), hidrólisis de urea, descarboxilación de ornitina y movilidad (Cuadro 1).

La confirmación de la identidad de *E. coli* se realizó por el procedimiento de serotipificación con el método actualizado por Scheutz (Scheutz *et al.*, 2004). El procedimiento se realizó a través de ensayos de aglutinación en placas de micro titulación de 96 cavidades y antisueros de conejo contra 181 antígenos somáticos (O) y 65 antígenos flagelares (H) preparados en conejo (SERUNAM® México) de acuerdo con el procedimiento descrito por Orskov y Orskov (1984).

A las cepas caracterizadas como *E. coli* se les definió el grupo filogenético con PCR multiplex descrito por Clermont (Clermont *et al.*, 2000). Se analizó la presencia de los genes *ChuA*, *YjaA* y el fragmento de ADN TspE.4C2, los cuales definen los cuatro grupos filogenéticos establecidos para la bacteria (A, B1, B2 y D).

La PCR se realizó con un protocolo estándar. Cada reacción se llevó a cabo en una mezcla final de 20 µL con las siguientes condiciones: desnaturalización de 5 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 30s a 72 °C, para concluir con una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Los iniciadores (primers) utilizados fueron *ChuA* (F:5'-GAG GAA CCA ACG GTC AGG AT-3' y R: 5'-TGC CGC CAG TAC CAA AGA AC-3'); *YjaA* (F:5'-TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG-3' y R:5'-ATG GAG AAT GCG TTC CTC AA-3') y el fragmento TspE.4C2 (F:5'-GAGTAATGT CGG GGC ATT CA-3' y R:5'-CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG-3') que generaron fragmentos de 279, 211 y 152 pb, respectivamente.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se siguió un diseño experimental completamente aleatorizado, para lo cual se tomaron muestras de tres cultivos de hortalizas (espinaca, lechuga y cilantro), de dos parcelas por municipio en tres diferentes municipios con un total de 180 muestras. En la

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli*.

	I	M	O	Vp	Rm	Cs	U	TSI	H ₂ SO ₃	Resultado
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	+	-	-	A/A	-	Positivo
<i>Salmonella</i>	+	+	+	-	+	-	-	A/A	-	Negativo

I: indol, M: movilidad, O: ornitina, Vp: Voges-Proskauer, Rm: rojo de metilo, Cs: citrato (Simons), U: urea, H₂SO₃: producción de ácido sulfhídrico, TSI: triple azúcar hierro.

misma forma se colectaron muestras de agua (2 muestras de 1000 mL por parcela) y suelo (muestra compuesta por parcela) usados en cada cultivo. Cada muestra se colectó para su análisis por triplicado.

Los resultados fueron evaluados por análisis de varianza ($p \leq 0.05$) para detectar diferencias entre municipios y por hortaliza para los diferentes grupos microbianos. Cuando existió diferencia significativa, se aplicó una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); para ambos procedimientos se usó el programa estadístico SAS® (SAS Institute, Inc., 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los tres municipios y en el total de los cultivos existió presencia de microorganismos indicadores de calidad microbiológica. Entre los cultivos analizados se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Cuadro 2).

En el municipio de Tenango del Valle la recuperación de mesófilos aerobios en lechuga fue 10 % mayor con diferencia significativa en comparación a Calimaya y Toluca. Para el grupo de coliformes totales la mayor recuperación se obtuvo en Tenango del Valle. A su vez esto mismo se observó en Calimaya para el grupo de coliformes fecales.

En el caso del cultivo de espinaca los mesófilos aerobios y coliformes totales indicaron diferencias significativas entre municipios con los recuentos más altos en Tenango del Valle y Toluca, respectivamente. De igual importancia en el municipio de Calimaya se obtuvo mayor presencia de coliformes fecales.

Para el cultivo de cilantro los tres municipios indicaron diferencias estadísticas significativas para mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales con las mayores recuperaciones en Tenango del Valle y Toluca.

La contaminación de los cultivos contrasta con lo enunciado por Maffei *et al.* (2016) quienes enfatizaron que no siempre se presenta la contaminación microbiológica en

Cuadro 2. Cuantificación de microorganismos presentes en hortalizas en tres municipios del Valle de México.

Hortaliza	Microorganismos	Municipios		
		Calimaya	Toluca	Tenango del Valle
Lechuga	MA [†]	3.28 ± 1.82 a	3.26 ± 1.07 a	3.60 ± 1.72 b
	CT [§]	2.51 ± 1.18 a	3.05 ± 1.08 b	3.17 ± 1.34 c
	CF [¶]	1.97 ± 0.60 a	1.89 ± 0.61 b	0.63 ± 1.52 c
Espinaca	MA	4.26 ± 2.07 a	3.97 ± 1.40 b	4.58 ± 1.63 c
	CT	3.66 ± 0.67 a	4.00 ± 2.07 b	3.91 ± 1.52 b
	CF	1.32 ± 0.40 a	0.31 ± 0.18 b	0.41 ± 0.18 b
Cilantro	MA	3.23 ± 1.56 a	4.09 ± 1.66 b	4.41 ± 2.05 c
	CT	3.00 ± 1.73 a	3.64 ± 1.67 b	3.27 ± 1.63 c
	CF	1.59 ± 0.35 a	1.32 ± 0.23 b	1.76 ± 0.02 c

[†]Recuentos bacterianos promedios expresados en logaritmos de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹); [†]MA: mesófilos aerobios, [§]CT: coliformes totales, [¶]CF: coliformes fecales. Medias con literal distinta indican diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

el cultivo de productos frescos. Además de estar relacionada con prácticas culturales como el uso de estiércol animal, que puede actuar como vehículo de transmisión de patógenos al cultivo (Kuan *et al.*, 2017).

Es conveniente resaltar las características observadas en las unidades de producción de los diferentes cultivos. Estos se encontraban a cielo abierto y el agua se notaba estancada; así como la presencia de animales de granja y domésticos, de modo que fue notable la falta de buenas prácticas agrícolas (BPA). Los nichos de producción del agroecosistema pueden contribuir a la diseminación de patógenos bacterianos asociados con los productos cuyo consumo es en fresco (Iwu y Okoh, 2019).

Los recuentos de mesófilos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales en lechuga, espinaca y cilantro en las localidades muestreadas se encontraron dentro del límite máximo permisible (LMP) establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Sin embargo, la recuperación bacteriana en el 100 % de las muestras reflejan la necesidad de incluir buenas prácticas agrícolas, ya que recuentos microbianos altos proveen innumerables oportunidades para que se incremente la contaminación originada en campo en cualquiera de las distintas etapas que el producto debe pasar desde la cosecha hasta el consumo en fresco (Iwu y Okoh, 2019).

La presencia de bacterias mesófilas (este estudio); así como, recuentos microbianos altos pueden provocar descomposición, pérdidas después de la cosecha y brotes de infecciones con origen alimentario, en caso de contaminación con patógenos en los productos consumidos (Praeger *et al.*, 2018). Mucho más preocupante es la presencia de microorganismos perjudiciales para la salud, no visibles a simple vista ni detectables a través de cambios en la apariencia, sabor, color u otra característica externa. Se ha demostrado que determinados patógenos tienen la capacidad de persistir sobre el producto lo suficiente como para constituir un peligro para el ser humano (Ocaña *et al.*, 2019).

La recuperación de coliformes de origen fecal señala las fallas en la producción y diferentes vías de contaminación (agua, suelo, insectos, animales, manipuladores). Por ello existe un riesgo para la salud de los consumidores (FDA, 2020).

El agua utilizada para riego en cada municipio presentó recuentos de los tres grupos microbianos evaluados con mayores UFC en Toluca para mesófilos aerobios y Tenango del Valle para coliformes (Figura 1). Uno de los sitios de muestreo de Tenango del Valle superó la recomendación de la Organización Mundial de la Salud, la cual indica que el agua utilizada para el riego de productos frescos no debe superar las 100 UFC mL⁻¹ (2 Log UFC mL⁻¹) de coliformes fecales (WHO, 2019). El agua consumida en los diferentes sitios de producción fue de pozos superficiales, característica que los hace susceptibles a contaminación microbiológica (Iwu y Okoh, 2019). A nivel mundial uno de los principales sistemas de riego usado para aplicar a parcelas es el riego rodado o por gravedad. Este riego se caracteriza por aprovechar la pendiente para transportar agua, por lo cual existe infiltración, evaporación, fugas y escurrimiento (SIAP, 2018). Se ha detectado presencia de *E. coli* y *Salmonella* en cuerpos de agua aprovechados para uso agrícola (Benjamin *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015).

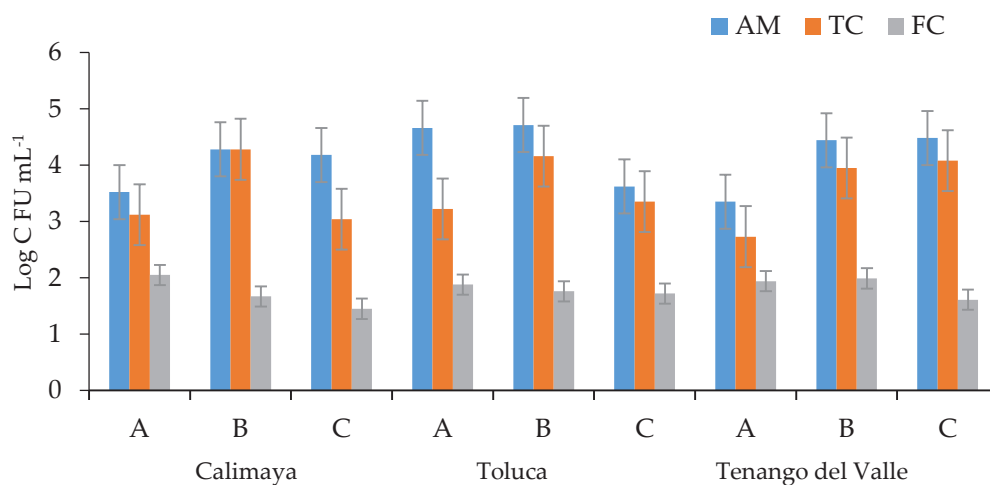


Figura 1. Recuentos bacterianos promedio (UFC mL⁻¹) de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales en agua de las unidades de producción de los tres municipios del Valle de México. A, B, C: parcelas evaluadas.

En el suelo en el que se desarrolló cada cultivo se encontró contaminación microbiológica de cada grupo microbiano evaluado (Figura 2). Es de suma importancia que el agua de riego y el suelo agrícola presenten una buena calidad microbiológica, ya que existen reportes de transferencia y supervivencia de enteropatógenos a la planta a través del riego (Ocaña *et al.*, 2018). La contaminación del suelo a la planta puede ocurrir como lo señalaron Lee *et al.* (2019), a través de la transferencia de *Salmonella* por salpicadura del suelo a los cultivos, lo cual representa un peligro para la seguridad del producto. Además, estos factores pueden elevar los niveles de bacterias en los productos cosechados (Benjamin *et al.*, 2013).

Al existir presencia de los grupos mesófilos aerobios y coliformes, tanto el suelo como el agua que se utilizan en los cultivos se pueden identificar como posibles fuentes de contaminación de las hortalizas analizadas. La calidad microbiológica del agua que se usa para riego es muy importante para la seguridad de productos hortícolas como lechuga, espinaca, cilantro, entre otros, por ser productos cuyo consumo es en crudo. Sin embargo, en México y en algunos otros países la calidad del agua no está definida a nivel normativo en la producción de hortalizas comercializadas en mercados populares y centrales de abasto. La deficiente calidad microbiológica de agua y suelo encontrada coincide con un estudio donde identificaron a *E. coli* en espinaca baby cultivada en tres regiones de España donde destacaron el suelo y el agua de riego como factores importantes de contaminación microbiana que afectan la seguridad alimentaria (Castro *et al.*, 2015). El abono con base de estiércol, moscas, el cultivo de hortalizas cerca de ganado, el transporte y la manipulación en la cadena productiva, se han identificado como vectores y fuentes de contaminación fecal y de patógenos en plantas (Benjamin *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015).

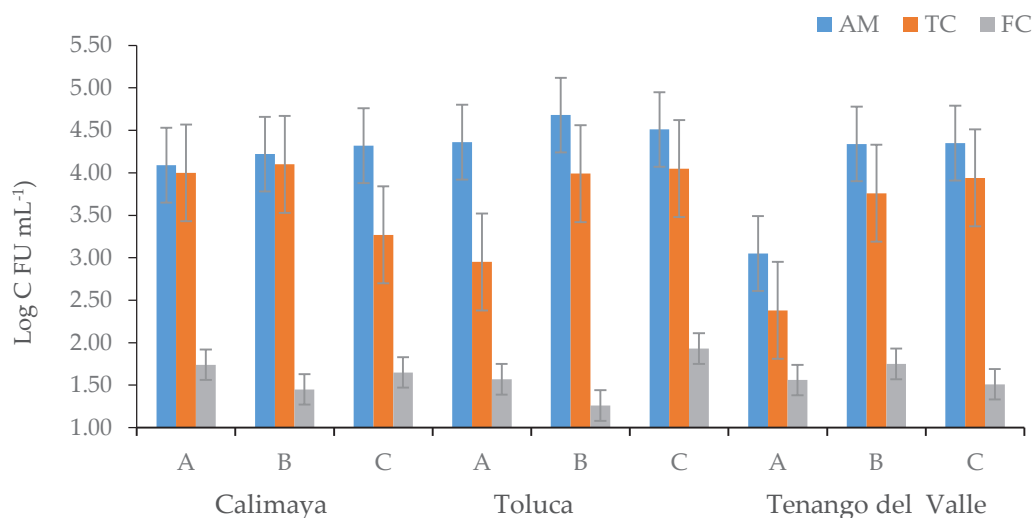


Figura 2. Recuentos bacterianos promedio (UFC mL⁻¹) de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales del suelo agrícola de las unidades de producción de tres municipios del Valle de México. A, B, C: parcelas evaluadas.

Las colonias bacterianas sometidas a tinción agruparon a las bacterias dentro de las Gram negativas, mientras que el crecimiento en agares específicos y las pruebas bioquímicas complementarias solo fueron positivos para *E. coli*. Los resultados de la serotipificación clasificaron los aislados de *E. coli* dentro del serotipo O105ab flagelar a partir de los aislados de cilantro y la reacción de la PCR amplificó fragmentos de 152 pb que ubicaron a las bacterias en el grupo filogenético A. Sin embargo, existen estudios que resaltan que el grupo de genes del antígeno O de *E. coli* O105 tiene los mismos genes y organización a partir de *Shigella boydii* O11, lo cual puede influir en la supervivencia y la invasión de las bacterias, que se presentan como un factor de riesgo, incluso cuando se piensa que el lavado puede eliminar este tipo de contaminación (Tao *et al.*, 2004; Kniret *et al.*, 2016). Así mismo, diversos estudios han identificado contaminación fecal y presencia de microorganismos patógenos en hortalizas como espinaca, lechuga y otros cultivos de consumo en fresco (Jiménez *et al.*, 2010; Puig *et al.*, 2014). En algunos casos no excedieron el límite máximo permisible; sin embargo, existía presencia de microorganismos enteropatógenos peligrosos para el ser humano. Con una vigilancia adecuada de las condiciones en las que se desarrolla el cultivo, la calidad del agua y el suelo agrícola, se podría minimizar la incidencia de patógenos bacterianos en productos de hortaliza frescos, para tratar de asegurar su inocuidad.

CONCLUSIONES

Los recuentos microbianos obtenidos en esta investigación, aunque sitúen a las hortalizas dentro de los límites establecidos, indican que pueden tener contaminación de origen fecal y actuar como vehículos de transmisión de contaminantes fecales como

Escherichia coli, a las personas a través de la alimentación diaria. Aunque en México solo se reporta a esta bacteria como responsable de diarrea de tipo secretor y diarrea persistente en países como Europa y Estados Unidos ha generado brotes y muertes. Por lo tanto, es importante un seguimiento constante que permita conocer las fuentes de contaminación microbiológica en productos de consumo en fresco, sobre todo los que se concentran en unidades de producción para exportación.

La calidad del agua utilizada para riego y el suelo donde se desarrolla el cultivo pueden afectar el nivel de contaminación presente en las hortalizas y disminuir drásticamente su calidad. Es necesaria la vigilancia durante la producción, la implementación de programas de buenas prácticas agrícolas para los productores y trabajadores; así como implementar algún tratamiento postcosecha a las hortalizas cultivadas.

REFERENCIAS

- Barrera-Escorcía G, Fernández-Rendón CL, Wong-Chang I, Ramírez-Romero P. 2013. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. *Hidrobiológica* 23 (1): 87–96.
- Benjamin L, Atwill ER, Jay-Russell M, Cooley M, Carychao D, Gorski L, Mandrell RE. 2013. Occurrence of generic *Escherichia coli*, *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. in water and sediment from leafy green produce farms and streams on the Central California coast. *International Journal of Food Microbiology* 165 (1): 65–76. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.003>
- Castro-Ibáñez I, Gil MI, Tudela JA, Ivanek R, Allende A. 2015. Assessment of microbial risk factors and impact of meteorological conditions during production of baby spinach in the Southeast of Spain. *Food Microbiology*. 49: 173–181. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.004>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2021. Reports of *Escherichia coli* Outbreaks 2020. US Department of Health and Human Services. USA. <https://www.cdc.gov/ecoli/2020-outbreaks.html> (Recuperado: mayo 2022).
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (10): 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- FDA (Food and Drug Administration). 2020. BAM [Bacteriological Analytical Manual] Chapter 4. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria> (Recuperado: junio 2020).
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2022. México en cifras. Indicadores sociodemográficos y económicos por área geográfica (nacional, entidad federativa, municipio y localidad). Aguascalientes, Aguascalientes, México. <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/#collapse-Indicadores> (Recuperado: abril 2022)
- Iwu CD, Okoh AI. 2019. Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (22): 4407. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224407>
- Jeamsripong S, Chase JA, Jay-Russell MT, Buchanan RL, Atwill ER. 2019. Experimental in-field transfer and survival of *Escherichia coli* from animal feces to Romaine lettuce in Salinas Valley, California. *Microorganisms* 7 (10): 408. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100408>
- Jiménez KB, McCoy CB, Achí R. 2010. Detection of shigella in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity. *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (4): 993–1000.
- Knirel YA, Qian C, Shashkov AS, Sizova OV, Zdorovenko EL, Naumenko OI, Senchenkova SN, Perepelov AV, Liu B. 2016. Structural relationships between genetically closely related O-antigens of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Biochemistry (Moscow)* 81: 600–608. <https://doi.org/10.1134/S0006297916060067>

- Kuan C-H, Rukayadi Y, Ahmad SH., Wan MR CWJ, Thung T-Y, Premarathne JMKJK, Chang W-S, Loo Y-Y, Tan C-W, Ramzi OB, Mohd Fadzil SN, Kuan C-S, Yeo S-K, Nishibuchi M, Radu S. 2017. Comparison of the microbiological quality and safety between conventional and organic vegetables sold in Malaysia. *Frontiers in Microbiology* 8: 01433. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01433>
- Lee D, Tertuliano M, Harris C, Vellidis G, Levy K, Coolong T. 2019. *Salmonella* survival in soil and transfer onto produce via splash events. *Journal of Food Protection* 82 (12): 2023–2037. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-066>
- Maffei DF, Batalha EY, Landgraf M, Schaffner DW, Franco BDGM. 2016. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. *Brazilian Journal of Microbiology* 47 (Suppl 1): 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.006>
- NOM-092-SSA1-1994. 1995. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html> (Recuperado: junio 2020).
- NOM-093-SSA1-1994. 1995. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Apéndice B. De las especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4882432&fecha=04/10/1995#gsc.tab=0 (Recuperado: mayo 2020).
- NOM-110-SSA1-1994. 1995. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>. (Recuperado: julio 2020).
- NOM-113-SSA1-1994. 1995. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html> (Recuperado: julio 2020).
- NOM-210-SSA1-2014. 2015. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015 (Recuperado: julio 2020).
- Ocaña RL, Gutiérrez AT, Sánchez JR, Mariezcurrena MD, Eslava CA, Laguna A. 2018. Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.); *Revista Argentina de Microbiología* 50 (4): 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.001>
- Ocaña-de Jesús RL, Gutiérrez-Ibáñez AT, Sánchez-Pale, JR, Mariezcurrena-Berasain MD, Laguna-Cerda A, Hernández-Chiñas U, Rojas-Puebla I. 2019. Motility and survival of *salmonella* enterica subspecies enterica serovar enteritidis in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L). *International Microbiology* 22: 363–368. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00059-3>
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2020. Inocuidad de alimentos – Control Sanitario – HACCP. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es (Recuperado: enero 2021).
- Ørskov F, Ørskov I. 1984. 2 Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology* 14: 43-112. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70447-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70447-1)
- Praeger U, Herppich WB, Hassenberg K. 2018. Aqueous chlorine dioxide treatment of horticultural produce: Effects on microbial safety and produce quality-A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58 (2): 318–333. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1169157>.
- Proyecto NOM-109-SSA1-1994. 1994. Proyecto de Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación, México, D.F. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1109p.pdf> (Recuperado: enero 2020).
- Puig PY, Leiva CV, Rodríguez Suárez A, Carrera VJ, Molejón PL, Pérez Muñoz Y, Dueñas MO. 2014. Microbiological quality of vegetables and factors associated with contamination in growing areas in Havana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 13 (1): 111–119.
- Rajwar A, Srivastava P, Sahgal M. 2016. Microbiology of Fresh Produce: route of contamination, detection methods, and remedy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (14): 2383–2390. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.841119>

- Rodríguez QM, Zapata SME, Solano MMA, Lozano BD, Torrico F, Torrico RMC. 2015. Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. *Gaceta Médica Boliviana* 38 (2): 31–36.
- SAS Institute Inc. 2002. *SAS/STAT User's Guide*. SAS version 9.0. Cary, NC, USA.
- Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith HR. 2004. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *Journal of Pathology: Microbiology, and Immunology – the APMIS Journal* 112 (9): 569–584. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120903.x>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. En la agricultura, los sistemas de riego son utilizados para un aprovechamiento óptimo del agua. Artículos de opinión (blog digital). <https://www.gob.mx/siap/articulos/en-la-agricultura-los-sistemas-de-riego-son-utilizados-para-un-aprovechamiento-optimo-del-agua?idiom=es> (Recuperado: agosto 2020).
- Tao J, Feng L, Guo H, Li Y, Wang L. 2004. The O-antigen gene cluster of *Shigella boydii* O11 and functional identification of its *wzy* gene. *FEMS Microbiology Letters* 234 (1): 125–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09523.x>

Agrociencia

CONSUMERS PERCEPTION AND BEHAVIOUR TOWARDS GEOGRAPHICAL INDICATION PRODUCTS: THE CASE OF TRADITIONAL PESTIL FROM GUMUSHANE, TURKEY

Üyesi Nilgün-Doğan¹, Hakan Adanacioğlu²

¹ Gümüşhane University / Aydın Vocational School, ORCID: 0000 0002 7142 8296

² Ege University / Faculty of Agriculture, ORCID: 0000-0002-8439-8524.

* Author for correspondence: nilgun_stu@hotmail.com

ABSTRACT

The main objective of this study was to assess the relationship between the level of consumers perception of products with geographical indication (GI) and their consumption of products with GI labels. Geographically indicated products were examined within the scope of Gumushane fruit pulp (mulberry pestil), which was registered as a Protected Geographical Indication (PGI) in 2004. This research conducted an online survey of 166 consumers living in Gumushane province in Turkey. Data was obtained from the online surveys that were conducted between June and September 2020. Binary logistic regression analysis method was used to identify the factors affecting the probability of consuming products with GI labels. The model results show that middle-aged, married, and middle-income and consumers who correctly perceive the concept of geographical indication products are more likely to consume products with GI labels. According to the logistic regression results, the increase in consumers level of correct perception of the product notion with GI label increases the probability of consuming products with GI label 2.5 times. The results of this study also tell us that the market share of these products can be increased by improving the consumer perception towards geographically indicated products. Policymakers can also take advantage of these insights to improve lucid understanding of how labels are actually interpreted by consumers.

Keywords consumer behaviour, perception, geographical indications (GIs), traditional food, Turkey.

INTRODUCTION

Emerging markets play an increasingly important role in the world economy nowadays (Le-Anh and Nguyen-To, 2020) and satisfy some of the traditional requirements of developed first-world markets, which radically differ for a number of reasons, *e.g.* resource shortages, customer heterogeneity, insufficient infrastructure, and socio-political turmoil (Kumar and Srivastava, 2020). In these markets, geographical indication (GI) labelling differentiates a product from its competitors as to the region where it originated. At first, GI-labelled local product was proposed as a potential help for various economic, environmental and social challenges posed by processed food, such as process quality. Consumers more and more believe that food contribute

Citation: Nilgün-Doğan Ü, Adanacioğlu H. 2022. Consumers perception and behaviour towards geographical indication products: The case of traditional pestil from Gumushane, Turkey. *Agrociencia*. 56(6): 1176-1199. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2731>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: March 31, 2022.
Approved: August 25, 2022.
Published in Agrociencia:
October 12, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



directly to their health and want to adopt health-oriented changes in their eating habits (Prattala, 2003). No doubt those consumers are increasingly aware of it when purchasing food. At this point, products belonging to certain regions are protected in order to reduce consumers concerns about quality and reliability. Therefore, products protected with GI have started to become an important marketing tool by registering their quality and reliability by local authorities (Toklu *et al.*, 2016). Traditional food with a GI label leads to economic growth at the same time. In changing global market conditions, products with a GI label enjoy increased competitiveness, broader consumer awareness of their originality, and consumers confidence that they were produced with certain standards that are important for producers as well as consumers (Belletti *et al.* 2017). As mentioned in Cafiero *et al.* (2019), there has been a growing attention towards recognizing characteristics that make food products special.

In conclusion, the presence of a quality component in the definition of traditional products allows the labelling to integrate these attributes within the concept of product quality. Labelling has been given an increasingly important role in achieving sustainability goals, providing consumers with the opportunity to consider the economic, social and health impacts of their food choices. In this context, it is important to find complementary sources that contribute to economic and GI label can be one of the sources. Bryla (2017) found that there is a strong relationship between the perception of quality signs and the attitude toward origin of food. Menapace and Moschini (2012) showed that GI certification improves the consumers ability to use their reputation as a means of assuring product quality. Therefore, consumer awareness plays an important role in developing GI-labelled products. A strong relationship between the products and the region where they are produced is an important part of local culture. Although studies identify motivations for GI-labelled traditional-food consumption, the relative contributions of these motivations have not yet been clarified. These contributions have vital impacts for the design of policies promoting traditional food. In order to deepen the understanding of consumers perceptions for GI-labelled products, this research aimed to present the perception and attitude of consumers towards GI-labelled traditional product called "pestil" (dried fruit pulp). The findings of consumer perceptions in this market can be beneficial for the emerging markets. The local description of pestil is a mixture of mulberry, honey, milk, and flour spread on cloth and after drying, a high-nutrient fruit pulp is obtained (Gumushane Governorate Publications, 2010). In the past, pestil was consumed as a snack only by the local people in Gumushane province which is in the northeast of Turkey. Today it plays a vital role as an industrial product in the production sector creating added value in the province economy and providing employment for many people (Dogan and Adanacioglu, 2021). Gumushane produces 90 % of the pestil in Turkey, and 90 % of the enterprises in the industrial sector of Gumushane province are pestil producers, with annual production of approximately 5000 tons. It was determined that the registration certificate (GI-labelled) obtained in 2004 for Gumushane pestil was not used by any producer in the current production market.

No research has been found to examine the consumer perceptions of producing GI-labelled products in the research area of this study. Nonetheless, it is obvious that production of GI-labelled pestil would provide many benefits for both producers and consumers while enhancing its social, cultural, and environmental attributes (Neilson *et al.*, 2018). The following hypotheses were developed to determine how the GIs affect consumers perceptions and behaviours: H1: Consumers who have a more accurate perception about GI-labelled products have a better attitude towards consuming these products. H2: Demographic characteristics are partially or mostly effective on consumers purchasing behaviours towards consuming GI-labelled products. H3: There is a relationship between consumers purchasing behaviour and their demographic characteristics towards consuming GI-labelled products. Then, the aim of this study was to contribute to the literature by seeking answers to these targeted questions: Which factors affect the purchasing behaviours of consumers of GI-labelled products? and Does the perception of GI-labelled products of the consumers have an effect on their purchasing behaviour?

MATERIALS AND METHODS

Qualitative and quantitative primary data in this study was acquired from the face-to-face interviews with the households in Gumushane, the principal pestil production region. The data was collected between June and September 2020 via online survey. The sample according to the known or predicted ratio (p) of the population size N is given in the following equation (1) (Newbold 1995).

$$n = \frac{Np(1-p)}{(N-1)\sigma_{px}^2 + p(1-p)} \quad (1)$$

where: n , sample size; N , the number of households (56 398 households); p , the percentage of households consuming pestil (0.50 for maximum sample volume); σ_{px}^2 , variance.

According to the proportional sampling method, with a 99 % confidence interval and 10 % error margin, the sample size was found as 166. Before the survey form was prepared, national and international literatures related to the subject were examined and survey questions were prepared according to the aim of this study. Before the survey was applied, a pilot survey was conducted, the necessary arrangements led to some changes in the form of the survey. All consumers in research sample were 18 years over and mainly responsible for pestil shopping in the household and were invited to volunteer to participate in a survey. Descriptive statistics were used to evaluate the data.

Data collected from survey covered household head demographic information, healthy food information, geographical indication information, and consumer perceptions on

GI-labelled products. GI-labelled pestil have not been introduced to consumers in the research area, so GI-labelled pestil was not yet found in the Gumushane market. This difficulty suggests the use of hypothetical questions instead. These questions have been widely used to understand consumer perceptions on purchasing when data on actual sales are not available. In the question form the size of the choice set rises with the number of attributes relating to the GI pestil and non-GI pestil. We asked consumers in the survey which of a list of product characteristics- such as taste, pestil origin, pestil content, pestil quality- are most important when purchasing pestil. Consumer attitudes towards pestil with the GI labelled was measured on a five-point Likert scale ranging from “strongly disagree” to “strongly agree”.

Empirical Model

Binary logistic regression analysis was used to determine the factors that affect the probability of consuming products with GI labels. This regression is a method to determine the relationship between the explanatory variables and the outcome in cases where the response variable is observed in binary, triple and multiple categories. The fact that the logistic function has an interval between 0 and 1 so this is the first important reason for choosing the logistic regression (Karagöz, 2016).

The logistic regression model is expressed by the following equation (2) (Gujarati, 2001):

$$L_i = \ln\left(\frac{P_i}{1 - P_i}\right) = \beta_1 + \beta_2 X_i + u_i \quad (2)$$

In the above logit function equation (2), where the P value shows the probability of the consuming products with GI labels. In other words, it represents whether consumers consume products with GI or not. While $P_i=1$ means those who consume products with GI label, $P_i=0$ means those who do not consume products with GI while $P_i=1$ means those who consume products with geographical indication label, $P_i=0$ means those who do not consume products with geographical indication label. β_1 is the constant term in the model. β_2 represents the bevel and measures the change in L for a unit change in X . The dependent variable shows the probability of consuming products with GI labels. The explanatory variables are; age, education, marital status, household size, monthly household income, frequency of purchasing pestil, annual expenditure of pestil, place of purchase and level of correct perception of the GI labelled product. Six propositions were prepared in order to measure whether the respondents correctly perceived the notion of GI labelled product. A 5-point Likert scale was used to find the extent to which the consumers agreed with each statement. The propositions presented to the consumers are as follows: “Geographical indication refers to the geography in which the product is produced.”, “GI indicates that an independent inspection has been carried out for the product.”, “GI means that a sustainable quality is provided in the product.”, “GI indicates that the product is healthy”, “GI means that the product is produced with more natural and traditional methods.”, “GI means that the product

is handmade and very laborious.”. While measuring the level of correct perception of the GI labelled product concept by the consumers, the Likert scale average of the answers was taken.

RESULTS AND DISCUSSION

Perceptions of GI-labelled Products in the Examined Sample

Corresponding to perceptions of GI-labelled products, participants were asked about their extent of knowledge of the GI such as sustainable quality, healthy products, and traditional production methods, handmade and where is it produced. Familiarity with GI-labelled products was measured on a Likert scale as “1= strongly disagree”, “2= disagree”, “3= neither agree nor disagree”, “4= agree”, and “5= strongly agree”. “Familiarity with GI-labelled products” was calculated as the average of the five answers. The participants stated that GI-labelled product is produced in the relevant geography (4.11), it provides a sustainable quality (3.57) and it is produced with natural and traditional methods (3.55). The participants significantly agreed with these propositions.

On the other hand, they moderately agreed about the ideas that “GI-labelled indicates that an independent inspection has been made for the product” (3.14), “GI indicates that GI-labelled product is safe for health” (2.99) and that “it is handmade” (2.96). Considering these findings, we posited that the main underlying perception for the GI-labelled products was the geography of the product. The interviewed participants were found to have moderate knowledge of GI products for the proposal of an independent inspection for the product, healthy product and handmade. Similar result was reported in the study published by Meral and Şahin (2013) that GI-labelled product is produced in the relevant geography (4.03), and the interviewed participants were found to have moderate knowledge of GI products for the proposal of an independent inspection for the product (2.94) and that GI-labelled product expresses that the product is handmade (3.33).

Attitudes of the Participants towards Consuming GI-labelled Products

In this section, participants were then asked whether consuming GI products would affect their attitude or not. Approximately 58 % said “yes” to consume the GI labelled products, and 10 % said “no”. The statements presented to the participants are as follows: “GI labelled products are healthier”, “they are more delicious”, “they have better quality” and “GI labelled products contribute to the local economy”. In regard to the responses of the participants, “contribution of the product to the local economy” (4.23) is the main factor to wish consuming GI labelled products. The participants significantly agreed with this proposition. On the other hand, they moderately agreed about the ideas that “GI labelled products are healthier” (3.46), “they are more delicious” (3.11) and that “they have better quality” (3.16). Thus, we posited that the main underlying motivation for the GI labelled products was its economic benefit compared to its counterparts. In order to analyse reasons for not consuming GI

labelled products, proposals were asked to the participants as follows: “I cannot find GI labelled products”, “I don’t believe in labelled products”, “I am satisfied with other products” and “I do not pay attention when buying”.

According to results, the participants cannot consume GI labelled products because of inability to find GI labelled products in shopping places where they live. The interviewed participants were found to have moderate response on not being able to find GI labelled products in shopping places (2.87) and being satisfied compared to its counterparts (2.70). It is possible to say that the interviewed consumers slightly agree, but not strongly agree. On the other hand, the participants slightly agreed with the statement of “I do not believe in labelled products” (2.14) and “I do not pay attention to the label on the packet” (2.13). Based on this outcome, it is clear that finding GI labelled products in the current market may trigger more willingness to consume GI products. We could say that how consumers find GI labelled products in the shopping places where they live is as important as willingness to consume. According to Dogan and Adanacioglu (2021), the recipe of Gumushane pestil made in the traditional method is not possible under current market conditions.

The components used in their present production are not the same as those used in the GI recipe. Most importantly, the recipe from the Gumushane Agriculture and Forestry Provincial Directorate consisted of very different input quantities. It calls for at least 20 kg of honey, 15 kg of milk, and 20 kg of walnuts or hazelnuts for 100 kg of Gumushane pestil, and the milk and mulberry must be from Gumushane. For industrial production, the syrup that extends shelf life used in current production is not allowed in production with GI. In the light of this information a question about GI labelled pestil, which is in the scope of this research was presented as hypothetical to the participants to evaluate the willingness of consuming: Assuming that there is a GI indication on the packet of pestil which has different ingredients, for example, there is honey instead of sugar, dried mulberry molasses instead of prepared mulberry molasses, milk instead of milk powder; and consumers were asked whether they would consume GI labelled pestil under the hypothetical proposition or not.

Majority of the participants would buy pestil, if it was produced according to GI production standards, which means that this result confirmed the expected relationship between the positive perception of GI production standards and the willingness to buy the pestil. In the study of Bryla (2017) it was mentioned that there is a strong relationship between food signs and the willingness to buy for origin food. Similar result was found in the study of Santeramo and Lamonaca (2020) that GIs are effective differentiation tools in the agri-food markets for consumers. Wang *et al.* (2020) suggested in their research that certified labels like GI enjoy more trust from the Chinese consumers than their local competitors. While they reached a result that nearly 70 % of the respondents considered labels granted by official organisations as the most reassuring guarantee for safety and quality. We found that 92 % of the participants considered the purchase status of GI labelled pestil under the hypothetical proposition. Therefore, this result allows to conclude that GIs is the main differentiation tool for

local products. In summary, the GI is shown to have enhanced the explanatory power of the perception.

The Effect of Demographic Factors, Shopping Behaviours, and Perceptions

Binary logistic regression analysis method was used to determine the factors affecting the probability of consuming products with GI labels. Some tests were conducted in order to determine the goodness of fit of the logistic regression model. When the Omnibus Test regarding the model coefficients is examined, it is seen that the independent variables in the model contribute to the estimation of the dependent variable. The chi-square value of the model was found statistically significant ($p \leq 0.05$) (Table 1).

The goodness of fit of the established model was also measured with the Hosmer and Lemeshow Test. According to the Hosmer-Lemeshow test, since $\text{Sign.} = 0.283 > 0.05$, the condition of goodness of model fit is met (Table 2).

The goodness of fit of the established model was analysed with the classification table. When the classification table is examined, 82.56 % of those who consume geographical indication labelled products and 48.28 % of those who do not have been estimated correctly. The correct prediction rate of consumers in general is approximately 69 % (Table 3).

Table 1. The results of the Omnibus tests for model coefficients.

		Chi-square	df	Sign. (p)
Step 1	Step	31.018	12	0.002
	Block	31.018	12	0.002
	Model	31.018	12	0.002

Table 2. The results of the Hosmer-Lemeshow test for Model.

Step 1	Chi-square	df	Sign. (p)
	9.747	8	0.283

Table 3. The classification of the model results (consumption products with GI).

Observed		Predicted		Percentage of correct classification
		Non consumers	Consumers	
Step 1	Non-consumers	28	30	48.28
	Consumers	15	71	82.56
Overall percentage of correctly classified cases				68.75

The ratios of the independent variables used in the model to explain the dependent variable were 0.194 (19.4 %) according to the Cox & Snell R² value and 0.262 (26.2 %) according to the Nagelkerke R² value (Table 4). It is stated that a value between 0.20-0.40 is very high since pseudo R² values tend to take very small values compared to R² in multiple regression (Karagöz, 2016). According to these values, it can be said that the parameter estimates of the binary logistic regression analysis model are shown in Table 5. According to the model results; age, marital status, income and the perception level of consumers towards geographical indication products are in a statistically significant relationship with the probability of consuming products with GI labels.

The model results revealed that there is a significant relationship between age and the probability of consumers consuming GI labelled products. The highest age

Table 4. The model summary.

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	163.129 ^a	0.194	0.262

Table 5. The logistic regression model estimates on the consumption of GI labelled products.

Variables	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
age1 [§]	1.415	0.628	5.081	1	0.024 [¶]	4.115
age2	1.843	0.632	8.492	1	0.004 [†]	6.315
edu1 ^ᵇ	0.477	0.833	0.327	1	0.567	1.611
edu2	-0.095	0.439	0.047	1	0.829	0.91
marital ^ᶜ	1.216	0.567	4.595	1	0.032 [¶]	3.372
hsize ^{††}	-0.718	0.436	2.718	1	0.099	0.488
income1 ^{¶¶}	1.211	0.804	2.266	1	0.132	3.356
income2	1.139	0.457	6.209	1	0.013 [¶]	3.124
pfrequency ^{§§}	0.024	0.443	0.003	1	0.958	1.024
exp ^{ᵇᵇ}	0	0	0.174	1	0.676	1
pplace ^{ᵐᵐ}	-0.142	0.423	0.112	1	0.738	0.868
percept ^{†††}	0.924	0.286	10.45	1	0.001 [†]	2.519
constant	-5.089	1.446	12.391	1	0	0.006

Significant at [†] $p \leq 0.01$ and [¶] $p \leq 0.05$; [§]Categorized as age1 = 34 or less; age2 = 34–44; age3 (reference category: RC) = 45+ years; ^ᵇCategorized as edu1 = below university degree; edu2: university degree; edu3 (RC): postgraduate degree; ^ᶜCategorized as “non-married” (RC) and “married”; ^{††}Categorized as “ ≤ 3 household members” (RC) and “ > 3 household members”; ^{¶¶}Categorized as income1 = 5.000 TRY or less; income2 = 5.001-8.000 TRY; income3 (RC) = 8.000 TRY+ ; ^{§§}Categorized as “shoppers made a purchase 2-6 times per year” (RC) and “shoppers purchase once a month”; ^{ᵇᵇ}Annual expenditure (TRY) of the respondents on pestil; ^{ᵐᵐ}Categorized as “shoppers buying from indirect outlets” (RC) and “shoppers buying directly from local producers outlets”; ^{†††}The level of correct perception of the GI labelled product concept by the respondents (The 5-point Likert scale: 1: the lowest level of correct perception; 5: the highest level of correct perception).

group (age3) represents the reference category in the logistic model. Young (age1) and middle (age2) age groups were found to be more likely to consume GI labelled products compared to the oldest age group, which is the reference category. When an evaluation is made according to the exponential logistic regression coefficient (Exp (β)-odds ratio); those in the young and middle age groups would like to consume 4.1 and 6.3 times more GI labelled products, respectively, than the older consumers. This result shows that especially the middle age group is more likely to consume products with GI label than other age groups. This finding is consistent with Eldesouky *et al.* (2019) in other study of perception of Spanish consumers towards labelling in food. They found that half of the focus group age (50 %) was between 36 and 50 years old which represented the middle age group in their study.

There is also a significant relationship between marital status and the probability of consuming GI labelled products. According to the model results, the probability of consuming GI labelled products increases in married consumers. When an evaluation is made according to the exponential logistic regression coefficient (Exp (β)-odds ratio), the increase in the number of married people in the household raises the probability of consuming GI labelled products approximately 3.4 times. Married couples give importance to healthy nutrition as a family and establish good social relations in general. This causes that they tend more towards products that add value to the customer, such as products with geographical indication labels. This is similar to the result of the research of Aprile *et al.* (2012) on the subject of consumers valuation of food quality labels confirming that 57 % of the respondents were married.

The results of the logistic regression model gave an idea about the relationship between the consumption of GI labelled products and household income groups. In this context, household income groups are classified as low, medium and high. Classified consumers are included in the model as dummy variables. The category that is statistically significant in terms of income groups is consumers with middle income. The third and final category, high-income consumers, represents the reference category. When evaluated according to the exponential logistic regression coefficient (Exp (β)-odds ratio), middle-income consumers would like to consume approximately 3.1 times more GI labelled products than high-income ones. This result is confirmed by the analysis of My *et al.* (2017) who applied a similar study of the consumers attitude towards food quality certifications mostly to be associated with medium income group that composed 60.2 % of the sample.

Another variable that has a significant relationship with the probability of consuming products with GI in the model is the level of perception of consumers towards products with GI. According to the model results, the probability of consuming GI labelled products increases with the raise in consumers level of correct perception of the notion of GI labelled product. When an evaluation is made according to the exponential logistic regression coefficient (Exp (β)-odds ratio), the increase in the level of correct perception of the notion of product with GI label increases the probability of consuming products labelled with GI 2.5 times. This result shows that the market

share of these products can be increased by improving the consumer perception towards geographically indicated products. In other words, the correct perception of products marked as GI makes a high contribution to the market at the consumer level.

CONCLUSIONS

Here there is an important contribution to the literature in terms of promoting the factors affecting the probability of consuming products with geographical indication (GI) label. Middle-aged, married, middle-income and consumers who correctly perceive the notion of GI products are more likely to consume products with GI. Marketers should consider the demographic factors as well as the correct way of perceiving products of this attribute in the consumption of products with geographical indication label. In addition, consumers perceive the notion of GI labelled product correctly at a moderate level (Likert scale averaged 3.40). Cumulatively, 30.7 % of consumers correctly perceive the notion of GI product between 1 and 3 on a 5-point Likert scale.

Another important finding is that only one fourth (25.3 %) of the interviewed consumers perceive the geographical indication product notion more accurately. Thus, there is an important problem regarding the correct perception of the geographical indication product notion by consumers. Therefore, it is considered important for those who market their products under the geographical indication label to conduct marketing research on the determination of consumer perception of such products. There is evidence that the market share of these products could be increased by improving the consumer perception towards geographically indicated products. Thus, it is recommended that marketers focus on sales promotion, public relations, and direct sales techniques as promotional tools within the scope of improving consumer perception of geographically indicated products.

The effect of consumer perception on the consumption of products with GI labels was assessed at the local level. Since there is a lack of information about consumer perceptions towards the traditional products with GI label in the research area, this paper contributes to a better understanding of perceptions and motivations towards food quality certifications (such as GI). Before 2020, the household interviews were planned to be conducted face-to-face for terms of consistency in the data to be obtained; but due to pandemic restrictions the surveys were done online. Therefore, this is considered as the only limitation of this research.

Finally, there is still need for other studies assessing the effect of consumer perception on products that have received GI labels. In further studies, research is suggested in different regions and products; which shall be useful for analysing how consumer perception affects the consumption of products with GI label at the regional level and by product group.

REFERENCES

- Aprile MC, Caputo V, Nayga Jr. RM. 2012. Consumers' valuation of food quality labels: the case of the European geographic indication and organic farming labels. *International Journal of Consumer Studies* 36 (2): 158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1470-6431.2011.01092.x>

- Belletti G, Marescotti A, Touzard J-M. 2017. Geographical indications, public goods, and sustainable development: The roles of actors' strategies and public policies. *World Development* 98: 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2015.05.004>
- Bryla P. 2017. The perception of EU quality signs for origin and organic food products among Polish consumers. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 9 (3): 345–355. <https://doi.org/10.3920/QAS2016.1038>
- Cafiero C, Palladino M, Marcianò C, Romeo G. 2020. Traditional agri-food products as a leverage to motivate tourists: A meta-analysis of tourism-information websites. *Journal of Place Management and Development* 13 (2): 195–214. <https://doi.org/10.1108/JPMD-05-2019-0032>
- Dogan N, Adanacioglu H. 2021. ¿Las indicaciones geográficas fomentan la producción local? Analizando las estrategias de los productores. *Revista de la Facultad de Agronomía* 120 (1): 073. <https://doi.org/10.24215/16699513e073>
- Eldesouky A, Mesias FJ, Escribano M. 2019. Perception of Spanish consumers towards environmentally friendly labelling in food. *International Journal of Consumer Studies* 44 (1): 64–76. <https://doi.org/10.1111/ijcs.12546>
- Gujarati DN. 2001. *Basic Econometrics* (in Turkish). Şenesen Ü, Şenesen GG (Transl.); Literatür Publications: Istanbul, Turkey. 849 p.
- Gumushane Governorate Publications. 2010. Gumushane Governorate, “pestil-köme”, Turkish Patent Inst. (TPI) [Geographical Registration Certificate] (in Turkish).
- Karagöz Y. 2016. *SPSS and AMOS23 Applied Statistical Analysis*. Nobel Academic Publishing Education Consulting: Ankara, Turkey.
- Kumar V, Srivastava R. 2020. New perspectives on business model innovations in emerging markets. *Journal of the Academy of Marketing Science* 48: 815–825. <https://doi.org/10.1007/s11747-019-00713-2>
- Le-Anh T, Nguyen-To T. 2019. Consumer purchasing behaviour of organic food in an emerging market. *International Journal of Consumer Studies* 44 (6): 563–573. <https://doi.org/10.1111/ijcs.12588>
- Menapace L, Moschini GC. 2012. Quality certification by geographical indications, trademarks and firm reputation. *European Review of Agricultural Economics* 39 (4): 539–566. <https://doi.org/10.1093/erae/jbr053>
- Meral Y, Sahin A. 2013. Consumers' perceptions of product with geographical Indication: The case of Gemlik Olives. *KSU Journal of Agriculture and Nature* 16 (4): 16–24. <https://dergipark.org.tr/en/pub/ksudobil/issue/22839/243816> (Retrieved: June 2021).
- My NHD, Rutsaert P, Van Loo E, Verbeke W. 2017. Consumers' familiarity with and attitudes towards food quality certifications for rice and vegetables in Vietnam. *Food Control* 82: 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.011>
- Neilson J, Wright J, Aklimawati L. 2018. Geographical indications and value capture in the Indonesia coffee sector. *Journal of Rural Studies* 59: 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2018.01.003>
- Newbold P, Carlson WL, Thorne BM. 1995. *Statistics for Business and Economics*. Pearson Education-Prentice-Hall: New Jersey, USA. 772 p.
- Prättälä R. 2003. Dietary changes in Finland — success stories and future challenges. *Appetite* 41 (3): 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2003.08.007>
- Santeramo FG, Lamonaca E. 2020. Evaluation of geographical label in consumers' decision-making process: a systematic review and meta-analysis. *Food Research International* 131: 108995. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108995>
- Toklu İT, Ustaahmetoğlu E, Küçük HÖ. 2016. Consumers' perception of geographically indicated products and their willingness to pay more: A structural equation modelling approach. *Management and Economics* (in Turkish). *Yönetim ve Ekonomi Dergisi* 23 (1): 145–161. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/yonveek/issue/24743/261624> (Retrieved: May 2021).
- Wang J, Tao J, Chu M. 2020. Behind the label: Chinese consumers' trust in food certification and the effect of perceived quality on purchase intention. *Food Control* 108: 106825. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106825>

PERCEPCIÓN Y COMPORTAMIENTO DE LOS CONSUMIDORES HACIA LOS PRODUCTOS CON INDICACIÓN GEOGRÁFICA: EL CASO DEL PESTIL TRADICIONAL DE GUMUSHANE, TURQUÍA

Üyesi Nilgün-Doğan¹, Hakan Adanacioğlu²

¹ Gümüşhane University / Aydın Vocational School, ORCID: 0000 0002 7142 8296

² Ege University / Faculty of Agriculture, ORCID: 0000-0002-8439-8524.

* Autor para correspondencia: nilgun_stu@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo principal de este estudio era evaluar la relación entre el nivel de percepción de los consumidores de los productos con indicación geográfica (IG) y su consumo de productos con etiquetas de IG. Se examinaron los productos con indicación geográfica en el mismo ámbito de percepción que el "pestil" de fruta de Gumushane (un dulce turco tradicional hecho de pulpa de mora), el cual se registró con Indicación Geográfica Protegida (IGP -GI) en 2004. En esta investigación se realizó una encuesta en línea a 166 consumidores que viven en la provincia de Gumushane, en Turquía. Los datos se obtuvieron de las encuestas en línea que se realizaron entre junio y septiembre de 2020. Se utilizó el método de análisis de regresión logística binaria para identificar los factores que afectan la probabilidad de consumir productos con etiquetas IG. Los resultados del modelo muestran que los consumidores de mediana edad, casados, con ingresos medios y con una percepción correcta del concepto de productos con indicación geográfica son más propensos a consumir productos con etiquetas IG. Según los resultados de la regresión logística, el aumento del nivel de percepción correcta por parte de los consumidores de la noción de producto con etiqueta IG incrementa 2.5 veces la probabilidad de consumir productos con esta etiqueta. Los resultados de este estudio también nos indican que la cuota de mercado de estos productos puede incrementarse al mejorar la percepción del consumidor hacia los productos con indicación geográfica. Quienes elaboran políticas también pueden aprovechar estos conocimientos para mejorar la comprensión de la interpretación real de estas etiquetas por parte de los consumidores.

Palabras clave: comportamiento del consumidor, percepción, indicación geográfica (GI), alimentos tradicionales, Turquía.

INTRODUCCIÓN

Los mercados emergentes desempeñan hoy en día un papel cada vez más importante en la economía mundial (Le-Anh y Nguyen-To, 2020) y satisfacen algunos de los requisitos tradicionales de los mercados desarrollados del primer mundo, con diferencias radicales por una serie de razones como escasez de recursos, heterogeneidad de los clientes, la insuficiencia de infraestructuras y la agitación sociopolítica (Kumar y Srivastava, 2020). En estos mercados, el etiquetado con indicación geográfica (IG)

Citation: Nilgün-Doğan Ü, Adanacioğlu H. 2022. Percepción y comportamiento de los consumidores hacia los productos con indicación geográfica: El caso del pestil tradicional de Gumushane, Turquía. *Agrociencia*. 56(6): 1176-1199. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2731>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: March 31, 2022.
Approved: August 25, 2022.

Published in Agrociencia:
October 12, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



diferencia un producto de sus competidores en cuanto a la región de la que es originario. En un principio, el producto local con etiqueta de IG se propuso como una ayuda potencial para diversos retos económicos, ambientales y sociales que plantean los alimentos procesados, tales como la calidad de su proceso. Los consumidores creen cada vez más que los alimentos aportan directamente a su salud y quieren adoptar cambios orientados a la salud en sus hábitos alimentarios (Prattala, 2003).

Sin duda, estos consumidores están cada vez más conscientes de ello a la hora de comprar alimentos. En este punto, los productos pertenecientes a determinadas regiones están protegidos para reducir la preocupación de los consumidores respecto a calidad y confiabilidad. Por lo tanto, los productos protegidos con IG han empezado a convertirse en una herramienta de marketing importante para registrar calidad y confiabilidad con respaldo por autoridades locales (Toklu *et al.*, 2016). A la vez, los alimentos tradicionales con una etiqueta de IG conllevan crecimiento económico. En las cambiantes condiciones del mercado mundial, los productos con etiqueta de IG gozan de una competitividad mayor, a más conocimiento de su originalidad por parte de los consumidores y a la confianza de que han sido producidos con determinadas normas que son importantes, tanto para los productores como para los consumidores (Belletti *et al.* 2017). Como lo mencionaron Cafiero *et al.* (2019), se ha generado una cada vez mayor atención a reconocer las características que hacen que los productos alimenticios sean especiales.

Entonces, se puede concluir que la presencia de un componente de calidad en la definición de los productos tradicionales permite que el etiquetado integre estos atributos dentro del concepto de calidad del producto. Se le ha asignado al etiquetado un papel cada vez más importante en la consecución de los objetivos de sostenibilidad, al proveer a los consumidores la oportunidad de considerar las repercusiones económicas, sociales y sanitarias de sus elecciones alimentarias. En este contexto, es importante encontrar fuentes complementarias que contribuyan a la economía, y la etiqueta IG puede serlo. Bryla (2017) descubrió que existe una fuerte relación entre la percepción de los signos de calidad y la actitud hacia el origen de los alimentos. Menapace y Moschini (2012) demostraron que la certificación IG mejora la capacidad de los consumidores para utilizar su reputación como medio para garantizar la calidad del producto. Por lo tanto, la adquisición de conciencia por parte de los consumidores desempeña un papel importante en el desarrollo de productos con etiqueta IG. Una relación fuerte entre los productos y la región donde se producen es parte importante de la cultura local. Aunque los estudios realizados identifican las motivaciones para el consumo de alimentos tradicionales con IG, aún no quedan claras las contribuciones relativas de estas motivaciones. Dichas contribuciones tienen repercusiones vitales en el diseño de las políticas para la promoción de alimentos tradicionales.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de las percepciones de los consumidores respecto a los productos con indicación geográfica, esta investigación tiene como objetivo presentar la percepción y la actitud de los consumidores hacia el producto tradicional con indicación geográfica llamado pestil (pulpa de fruto seco). Los resultados

de las percepciones de los consumidores en este mercado pueden ser benéficos para los mercados emergentes. La descripción local de pestil es una mezcla de moras, miel, leche y harina que se extiende sobre un paño y, tras el secado, se obtiene una pulpa de fruta muy nutritiva (Gumushane Governorate Publications, 2010). En el pasado, el consumo de pestil era como golosina sólo por la población local de la provincia de Gumushane, situada en el noreste de Turquía. Hoy en día desempeña un papel fundamental como producto industrial en el sector primario, crea valor agregado en la economía de la provincia y proporciona empleo a muchas personas (Dogan y Adanacioglu, 2021). Gumushane produce el 90% de pestil en Turquía, y 90% de las empresas del sector industrial de la provincia de Gumushane son productoras de pestil, con una producción anual de aproximadamente 5000 toneladas. En 2004 se determinó que el certificado de registro (con etiqueta IG) obtenido para pestil de Gumushane no era utilizado por ningún productor en el mercado de producción actual.

No hemos encontrado ninguna investigación que analice las percepciones de los consumidores sobre la elaboración de productos con indicación geográfica en la región de este estudio. No obstante, es obvio que la producción de pestil con etiqueta IG proporcionaría muchos beneficios tanto a los productores como a los consumidores, al tiempo que mejoraría sus atributos sociales, culturales y ambientales (Neilson *et al.*, 2018). Las hipótesis siguientes se elaboraron para determinar cómo los productos IG afectan percepciones y comportamientos de los consumidores: H1: Los consumidores que tienen una percepción más precisa sobre los productos con indicación geográfica tienen una mejor actitud hacia el consumo de estos productos. H2: Las características demográficas son parcial o mayoritariamente efectivas en los comportamientos de compra de los consumidores hacia el consumo de productos con indicación geográfica. H3: Existe una relación entre el comportamiento de compra de los consumidores y sus características demográficas con tendencia al consumo de productos con indicación geográfica.

El objetivo de este estudio fue contribuir a la literatura con la búsqueda de respuestas a estas preguntas específicas ¿Qué factores afectan los comportamientos de compra de los consumidores de productos con indicación geográfica? e ¿Influye la percepción de los consumidores sobre los productos con indicación geográfica en su comportamiento de compra?

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos primarios cualitativos y cuantitativos de este estudio se obtuvieron de las entrevistas cara a cara con familias de Gumushane, la principal región productora de pestil. Los datos se recolectaron entre junio y septiembre de 2020 por medio de una encuesta en línea. La muestra según la proporción conocida o prevista (p) del tamaño N de la población está dada por la ecuación 1 (Newbold 1995).

$$n = \frac{Np(1-p)}{(N-1)\sigma_{px}^2 + p(1-p)} \quad (1)$$

donde: n , tamaño de la muestra; N , número de hogares (56 398 hogares); p , porcentaje de hogares que consumen pestil (0.50 del volumen máximo de la muestra); σ_{px}^2 , varianza.

De acuerdo con el método de muestreo proporcional, con un intervalo de confianza del 99% y un margen de error del 10%, el tamaño de la muestra fue de 166. Antes de preparar el formulario de la encuesta, se examinó la literatura nacional e internacional relacionada con el tema y se prepararon las preguntas de la encuesta, de acuerdo con el objetivo de este estudio. Antes de aplicarla, se llevó a cabo un sondeo piloto, cuyos arreglos necesarios dieron lugar a algunos cambios en la forma de la encuesta. Todos los consumidores de la muestra de la investigación eran mayores de 18 años y eran los principales responsables de las compras de pestil en el hogar; fueron invitados a participar voluntariamente en dicha actividad. Se utilizó estadística descriptiva para evaluar los datos.

Los datos registrados en la encuesta abarcaban la información demográfica de los jefes de familia, la información sobre los alimentos saludables, las indicaciones geográficas y las percepciones de los consumidores sobre los productos con indicación geográfica. En la zona del estudio no se ha presentado un pestil con indicación geográfica a los consumidores; es decir, este producto no se encuentra todavía en el mercado de Gumushane. Esta dificultad sugiere el uso de preguntas hipotéticas en su lugar. Estas preguntas se han utilizado ampliamente para comprender las percepciones de los consumidores sobre la compra cuando no se dispone de datos sobre las ventas reales. En el formato de preguntas, el tamaño del conjunto de opciones aumenta con el número de atributos relacionados con pestil con y sin IG. En la encuesta preguntamos a los consumidores cuál de una lista de características del producto -como el sabor, el origen de pestil, el contenido de pestil, la calidad de pestil- era la más importante a la hora de comprar. La actitud de los consumidores hacia los productos de pestil con IG se midió en una escala de Likert de cinco puntos que iba de "muy en desacuerdo" a "muy de acuerdo".

Modelo empírico

Se utilizó un análisis de regresión logística binaria para determinar los factores que afectan la probabilidad de consumir productos con etiquetas de IG. Esta regresión es un método para determinar la relación entre las variables explicativas y el resultado en los casos en que la variable de respuesta se observa en categorías binarias, triples y múltiples. El hecho de que la función logística tenga un intervalo entre 0 y 1 es la primera razón importante para elegir la regresión logística (Karagöz, 2016). El modelo de regresión logística se expresa por la ecuación (2) siguiente (Gujarati, 2001):

$$L_i = \ln\left(\frac{P_i}{1 - P_i}\right) = \beta_1 + \beta_2 X_i + u_i \quad (2)$$

En la ecuación de la función logit anterior (2), el valor P muestra la probabilidad de que se consuman productos con etiquetas de IG. En otras palabras, representa si los consumidores consumen productos con IG o no. Mientras que $P_i=1$ significa los que consumen productos con etiqueta IG, $P_i=0$ significa los que no consumen productos con IG, mientras que $P_i=1$ significa los que consumen productos con etiqueta de indicación geográfica, $P_i=0$ significa los que no consumen productos con etiqueta de indicación geográfica. β_1 es el término constante del modelo. β_2 representa el bisel y mide el cambio en L para un cambio de unidad en X . La variable dependiente muestra la probabilidad de consumir productos con etiquetas IG. Las variables explicativas son: edad, educación, estado civil, tamaño del hogar, ingresos mensuales del hogar, frecuencia de compra de pestil, gasto anual en pestil, lugar de compra y el nivel de percepción correcta del producto etiquetado con IG.

Se formularon seis proposiciones para medir si los encuestados percibían correctamente la noción de producto con indicación geográfica. Se utilizó una escala Likert de 5 puntos para conocer el grado de acuerdo de los consumidores con cada afirmación. Las proposiciones presentadas a los consumidores son las siguientes: "La indicación geográfica se refiere a la geografía en la que se produce el producto", "La IG indica que se ha llevado a cabo una inspección independiente del producto", "La IG significa que el producto tiene calidad sostenible", "La IG indica que el producto es saludable", "La IG significa que el producto se produce con métodos más naturales y tradicionales", "La IG significa que el producto es artesanal y muy laborioso". Al medir el nivel de percepción correcta acerca del concepto de producto con indicación geográfica por parte de los consumidores, se tomó la media de las respuestas en la escala Likert.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Percepción de los productos con indicación geográfica en la muestra examinada

En relación con las percepciones de los productos con etiqueta IG, se preguntó a los participantes sobre su grado de conocimiento de la IG, como la calidad sostenible, los productos saludables y los métodos de producción tradicionales, hechos a mano y dónde se producen. La familiaridad con los productos etiquetados con IG se midió en la escala Likert como "1= totalmente en desacuerdo", "2= en desacuerdo", "3= ni de acuerdo ni en desacuerdo", "4= de acuerdo" y "5= totalmente de acuerdo". La "familiaridad con los productos etiquetados con IG" se calculó como la media de las cinco respuestas. Los participantes afirmaron que el producto con etiqueta IG se produce en la geografía correspondiente (4.11), tiene calidad sostenible (3.57) y se produce con métodos naturales y tradicionales (3.55). Los participantes estuvieron significativamente de acuerdo con estas proposiciones.

Por otra parte, estuvieron moderadamente de acuerdo con las ideas de que "el etiquetado con IG indica que se ha realizado una inspección independiente del producto" (3.14), "el IG indica que el producto etiquetado con IG es seguro para la salud" (2.99) y que "está hecho a mano" (2.96). Al considerar estos resultados, postulamos que la principal percepción subyacente para los productos con etiqueta IG era la geografía

del producto. Se comprobó que los participantes entrevistados tenían un conocimiento moderado de los productos con IG para la propuesta de una inspección independiente para el producto, el producto saludable y el hecho a mano. Un resultado similar fue reportado en el estudio publicado por Meral y Şahin (2013), que el producto con etiqueta IG se produce en la geografía correspondiente (4.03), y se encontró que los participantes entrevistados tienen un conocimiento moderado de los productos con IG para la proposición de inspección independiente del producto (2.94), y para que el producto con etiqueta IG signifique que el producto es hecho a mano (3.33).

Actitudes de los participantes hacia el consumo de productos con indicación geográfica

En esta sección, se preguntó a los participantes si el consumo de productos con IG afectaría su actitud o no lo haría. Aproximadamente el 58 % dijo "sí" a consumir los productos con IG, y el 10 % dijo "no". Las afirmaciones presentadas a los participantes son las siguientes "Los productos con indicación geográfica son más sanos", "son más deliciosos", "tienen mejor calidad" y "los productos con indicación geográfica contribuyen a la economía local". En relación con las respuestas de los participantes, la "contribución del producto a la economía local" (4.23) es el principal factor para desear consumir productos con etiqueta IG. Los participantes están significativamente de acuerdo con esta proposición. Por otra parte, están moderadamente de acuerdo con las ideas de que "los productos con indicación geográfica son más sanos" (3.46), "son más deliciosos" (3.11) y que "tienen mejor calidad" (3.16). Por lo tanto, postulamos que la principal motivación subyacente a los productos etiquetados con IG era su beneficio económico en comparación con sus contrapartes. Para analizar las razones por las que no se consumen productos con etiqueta IG, se formularon las siguientes propuestas a los participantes "No encuentro productos con etiqueta IG", "No creo en los productos con etiqueta", "Estoy satisfecho con otros productos" y "No presto atención al comprar".

Según los resultados obtenidos, los participantes no pueden consumir productos con indicación geográfica porque no los encuentran en los centros comerciales donde viven. Los participantes entrevistados se pronunciaron moderadamente por la imposibilidad de encontrar productos con IG en los centros comerciales (2.87) y se mostraron satisfechos con la comparación con productos homólogos que no la presentan (2.70). Se puede decir que los consumidores entrevistados estuvieron ligeramente de acuerdo, pero no muy de acuerdo. Por otra parte, los participantes estuvieron ligeramente de acuerdo con la afirmación "No creo en los productos etiquetados" (2.14) y "No presto atención a la etiqueta del envase" (2.13). Con base en estos resultados, es claro que encontrar productos con el etiquetado IG en el mercado actual puede desencadenar una disposición mayor a consumir productos con la etiqueta IG. Se puede decir que la forma en que los consumidores encuentran los productos con indicación geográfica en los lugares de compra donde viven es tan importante como su disposición al consumo. Según Dogan y Adanacioglu (2021), la receta de pestil de Gumushane elaborado con el método tradicional no es posible en las condiciones actuales del mercado.

Los ingredientes utilizados en la producción actual no son los mismos que los utilizados en la receta con IG. Lo más importante es señalar que la receta de la Dirección Provincial de Agricultura y Silvicultura de Gumushane consta de cantidades de insumos muy diferentes. El requerimiento es al menos 20 kg de miel, 15 kg de leche y 20 kg de nueces o avellanas por cada 100 kg de pestil de Gumushane; y la leche y las moras deben ser de Gumushane. Para la producción industrial, el jarabe que prolonga la vida útil y que se utiliza en la producción actual no está permitido en la producción con IG. A la luz de esta información, se les formuló a los participantes una pregunta acerca de pestil con etiqueta IG la cual, dentro del ámbito de percepción de esta investigación resulta hipotética, para averiguar la disposición a consumirlo. Suponga que haya una indicación de IG en el paquete de pestil que indique que tiene ingredientes diferentes, por ejemplo, hay miel en lugar de azúcar, melaza de mora deshidratada en lugar de melaza de mora preparada, leche en lugar de leche en polvo; y se preguntó a los consumidores si consumirían pestil con etiqueta de IG con base en esta propuesta hipotética o no lo harían.

La mayoría de los participantes dijo que sí compraría pestil si se produjera de acuerdo con las normas de producción con IG, lo cual significa que este resultado confirmó la relación esperada entre la percepción positiva de las normas de producción con GI y la disposición a comprar pestil. En el estudio de Bryla (2017), se mencionó que existe una fuerte relación entre las etiquetas alimentarias y la disposición a comprar alimentos de ese origen. En el estudio de Santeramo y Lamónaca (2020) se encontró un resultado similar, las IG son herramientas eficaces de diferenciación en los mercados agroalimentarios para los consumidores. Wang *et al.* (2020) sugirieron en su investigación que las etiquetas certificadas, como las IG, generan más confianza por parte de los consumidores chinos que sus competidores locales. En tanto que casi el 70 % de los encuestados contestó que las etiquetas concedidas por organizaciones oficiales eran la garantía más tranquilizadora de seguridad y calidad. Bajo la proposición hipotética, el 92 % de los participantes consideró comprar pestil con etiqueta IG. Por lo tanto, este resultado permite concluir que la IG es la principal herramienta de diferenciación de los productos locales. En resumen, se demuestra que la IG ha mejorado el poder explicativo de la percepción.

Efecto de factores demográficos, comportamientos de compra y percepciones

Se utilizó el método de análisis de regresión logística binaria para determinar los factores que afectan la probabilidad de consumir productos con etiquetas IG. Se realizaron algunas pruebas para determinar la bondad de ajuste del modelo de regresión logística. Al examinar la prueba omnibus relativa a los coeficientes del modelo, se observó que las variables independientes del modelo contribuyeron a la estimación de la variable dependiente. El valor de chi-cuadrado del modelo resultó estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Los resultados de las pruebas Ómnibus para los coeficientes del modelo.

		Chi-cuadrada	df	Sign. (p)
Paso 1	Paso	31.018	12	0.002
	Bloqueo	31.018	12	0.002
	Modelo	31.018	12	0.002

La bondad de ajuste del modelo establecido se midió también con la prueba de Hosmer y Lemeshow. Según la prueba de Hosmer-Lemeshow, dado que Sign. = 0.283 > 0.05, se cumple con la condición de bondad de ajuste del modelo (Cuadro 2).

La bondad de ajuste del modelo establecido se analizó con la tabla de clasificación. Al examinar dicha tabla, se ha estimado correctamente que 82.56 % consume productos etiquetados con indicación geográfica y 48.28 % no lo hace. La tasa de predicción correcta de consumidores en general es aproximadamente 69 % (Cuadro 3).

Las razones de las variables independientes utilizadas en el modelo para explicar la variable dependiente fueron de 0.194 (19.4 %) según el valor R² de Cox & Snell, y de 0.262 (26.2 %) según el valor R² de Nagelkerke (Cuadro 4). Se dice que un valor entre 0.20-0.40 es muy alto, ya que los valores de pseudo R² tienden a tomar valores muy

Table 2. The results of the Hosmer-Lemeshow test for Model.

Paso 1	Chi-cuadrado	df	Sign. (p)
	9.747	8	0.283

Cuadro 3. Clasificación de los resultados del modelo (productos de consumo con IG).

Observado		Previstos		Porcentaje de clasificación correcta
		No consumidores	Consumidores	
Paso 1	No-consumidores	28	30	48.28
	Consumidores	15	71	82.56
Porcentaje total de casos clasificados correctamente				68.75

Cuadro 4. Resumen del modelo.

Paso	-2 Log verosimilitud	R cuadrada de Cox & Snell	R cuadrada de Nagelkerke
1	163.129 ^a	0.194	0.262

pequeños, en comparación con el R2 en la regresión múltiple (Karagöz, 2016). Según estos valores, se puede decir que la relación entre las variables dependientes e independientes es fuerte.

Las estimaciones de los parámetros del modelo de análisis de regresión logística binaria se muestran en el Cuadro 5. Según los resultados del modelo, la edad, el estado civil, los ingresos y el nivel de percepción de los consumidores hacia los productos con indicación geográfica guardan una relación estadística significativa, con la probabilidad de consumir productos con etiquetas IG.

Los resultados del modelo revelaron que existe una relación significativa entre la edad y la probabilidad de que los consumidores consuman productos con indicación geográfica. El grupo de edad mayor (edad3) representa la categoría de referencia en el modelo logístico. Los grupos de edad joven (edad1) y media (edad2) resultaron ser más propensos a consumir productos con etiquetado IG en comparación con el grupo de edad mayor, que es la categoría de referencia. Cuando se realiza una evaluación

Cuadro 5. El modelo de regresión logística estima el consumo de productos con indicación geográfica.

Variables	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
edad1 [§]	1.415	0.628	5.081	1	0.024 [¶]	4.115
edad2	1.843	0.632	8.492	1	0.004 [†]	6.315
edu1 ^ᵇ	0.477	0.833	0.327	1	0.567	1.611
edu2	-0.095	0.439	0.047	1	0.829 [¶]	0.91
marital [‡]	1.216	0.567	4.595	1	0.032	3.372
tamaño ^{††}	-0.718	0.436	2.718	1	0.099	0.488
ingreso1 ^{¶¶}	1.211	0.804	2.266	1	0.132	3.356
ingreso2	1.139	0.457	6.209	1	0.013 [¶]	3.124
frecuenciap ^{§§}	0.024	0.443	0.003	1	0.958	1.024
exp ^{ᵇᵇ}	0	0	0.174	1	0.676	1
lugar ^{‡‡}	-0.142	0.423	0.112	1	0.738	0.868
percep ^{†††}	0.924	0.286	10.45	1	0.001 [†]	2.519
constante	-5.089	1.446	12.391	1	0	0.006

Significativo con [†] $p \leq 0.01$ y [¶] $p \leq 0.05$; [§]Categorizado como edad1 = 34 o menos; edad2 = 34-44; edad3 (categoría de referencia: RC) =45+ años; ^ᵇCategorizado como edu1 = menos de un grado universitario; edu2: grado universitario; edu3 (RC): posgrado; [‡]Categorizado como “no casado” (RC) y “casado”; ^{††}Categorizado como “ ≤ 3 miembros del hogar” (RC) y “ > 3 miembros del hogar”; ^{¶¶}Categorizados como ingresos1 = 5.000 TRY o menos; ingresos2 = 5.001-8.000 TRY; ingresos3 (RC) =8.000 TRY+; ^{§§}Categorizados como “compradores que realizan una compra de 2 a 6 veces al año” (RC) y “compradores que compran una vez al mes”; ^{ᵇᵇ}Gasto anual (TRY) en pestil de los encuestados; ^{‡‡}Categorizados como “compradores que compran en puntos de venta indirectos” (RC) y “compradores que compran directamente en puntos de venta de productores locales”; ^{†††}El nivel de percepción correcta del concepto de producto etiquetado con IG por parte de los encuestados (La escala Likert de 5 puntos: 1: el nivel más bajo de percepción correcta; 5: el nivel más alto de percepción correcta).

según el coeficiente de regresión logística exponencial (Exp (β)-relación de probabilidades); los integrantes de los grupos de edad joven y media desearían consumir 4.1 y 6.3 veces más productos con etiqueta IG, respectivamente, que los consumidores de edad mayor. Este resultado muestra que el grupo de edad media es más proclive a consumir productos con etiqueta IG que los otros grupos de edad. Este hallazgo coincide con el de Eldsouky *et al.* (2019) en otro estudio de la percepción de los consumidores españoles hacia el etiquetado en los alimentos. Ellos encontraron que la mitad del grupo de edad objeto (50 %) tenía entre 36 y 50 años, lo cual representaba al grupo de edad media en su estudio.

También existe una relación significativa entre el estado civil y la probabilidad de consumir productos con indicación geográfica. Según los resultados del modelo, la probabilidad de consumir productos con indicación geográfica aumenta en los consumidores casados. Cuando se realiza una evaluación según el coeficiente de regresión logística exponencial (Exp (β)-relación de probabilidades), el aumento del número de personas casadas en el hogar eleva aproximadamente 3.4 veces la probabilidad de consumir productos con etiqueta IG. Las parejas casadas dan importancia a una alimentación sana en la familia y establecen buenas relaciones sociales en general. Esto hace que se inclinen más por los productos que aportan valor al consumidor, como los productos con etiquetas de indicación geográfica. Esto es similar al resultado de la investigación de Aprile *et al.* (2012) sobre la valoración que hacen los consumidores de las etiquetas que indican la calidad de los alimentos; lo cual confirma que 57 % de los encuestados estaban casados.

Los resultados del modelo de regresión logística permitieron conocer la relación entre el consumo de productos con indicación geográfica y los grupos de ingresos familiares. En este contexto, los grupos de ingresos familiares se clasifican en bajos, medios y altos. Los consumidores clasificados se incluyen en el modelo como variables ficticias. La categoría que resulta estadísticamente significativa en cuanto a grupos de ingresos es la de los consumidores con ingresos medios. La tercera y última categoría, los consumidores con ingresos altos, representa la categoría de referencia. Si se evalúa de acuerdo con el coeficiente de regresión logística exponencial (Exp (β)-relación de probabilidades), los consumidores de ingresos medios desearían consumir aproximadamente 3.1 veces más productos con etiquetado IG que los de ingresos altos. Este resultado se confirma con el análisis de My *et al.* (2017) quienes aplicaron un estudio similar acerca de que la actitud de los consumidores hacia las certificaciones de calidad de los alimentos, se asocian mayoritariamente con el grupo de ingresos medios – 60.2 % de la muestra.

Otra variable que tiene una relación significativa con la probabilidad de consumir productos con IG en el modelo es el nivel de percepción de los consumidores hacia los productos con etiqueta de indicación geográfica. Según los resultados del modelo, la probabilidad de consumir productos con etiqueta IG aumenta con el mayor nivel de percepción correcta de los consumidores sobre la noción de producto con etiqueta de indicación geográfica. Cuando se realiza una evaluación según el coeficiente de

regresión logística exponencial (Exp (β)-relación de probabilidades), el aumento del nivel de percepción correcta sobre la noción de producto con etiqueta IG incrementa 2.5 veces la probabilidad de consumir productos etiquetados con IG. Este resultado demuestra que la cuota de mercado de estos productos puede aumentar si se mejora la percepción del consumidor hacia los productos con indicación geográfica. En otras palabras, la percepción correcta de los productos marcados con indicación geográfica es una gran contribución al mercado a nivel del consumidor.

CONCLUSIONES

Este estudio es una importante contribución a la literatura en términos de la promoción de los factores que influyen en la probabilidad de consumir productos con indicación geográfica (IG). Los consumidores de edad media, casados, con ingresos medios y que perciben correctamente la noción de productos con IG son más propensos a consumir productos con indicación geográfica. Los comercializadores deben tener en cuenta los factores demográficos, así como la forma correcta de percibir los productos con este atributo para el consumo de los productos con etiqueta de indicación geográfica. Además, los consumidores perciben correctamente la noción de producto con etiqueta de indicación geográfica en un nivel moderado (la escala Likert promedió 3.40). En conjunto, 30.7 % de los consumidores tiene una percepción correcta de la noción de producto con indicación geográfica entre 1 y 3 puntos en una escala Likert de 5 puntos. Otro hallazgo importante es que únicamente una cuarta parte (25.3 %) de los consumidores entrevistados percibe la noción de producto con indicación geográfica con mayor precisión. De modo que existe un problema importante en cuanto a la percepción correcta de la noción de producto con indicación geográfica por parte de los consumidores. Por lo tanto, se considera importante que quienes comercializan sus productos con la etiqueta de indicación geográfica lleven a cabo una investigación de mercado para determinar la percepción que tienen los consumidores de dichos productos. Hay evidencia de que la cuota de mercado de estos productos podría aumentar si se mejora la percepción del consumidor hacia los productos con indicación geográfica. Por ello se recomienda que los comercializadores se centren en promoción de ventas, relaciones públicas y técnicas de venta directa como herramientas que promuevan la mejora en la percepción del consumidor acerca de los productos con indicación geográfica. El efecto de la percepción del consumidor sobre el consumo de productos con indicación geográfica se evaluó a nivel local. Debido a que en el área de investigación se carece de información sobre las percepciones de los consumidores hacia los productos tradicionales con etiqueta IG, este reporte contribuye a mejorar la comprensión de las percepciones y motivaciones hacia las certificaciones de calidad de los alimentos (como la IG). Antes de 2020, estaba previsto que las entrevistas a las familias se realizaran cara a cara para garantizar la coherencia de los datos que se obtuvieran; pero debido a las restricciones de la pandemia, las encuestas se realizaron en línea. Por lo tanto, esto se considera como la única limitación de esta investigación. Por último, es necesario realizar más estudios para evaluar el efecto de la percepción del consumidor sobre los productos que han recibido la etiqueta IG. En estudios a

futuro, se sugiere investigar esto para diferentes regiones y productos; lo cual será útil para analizar cómo la percepción del consumidor afecta el consumo de productos con etiqueta de indicación geográfica a nivel regional y por grupos de productos.

REFERENCIAS

- Aprile MC, Caputo V, Nayga Jr. RM. 2012. Consumers' valuation of food quality labels: the case of the European geographic indication and organic farming labels. *International Journal of Consumer Studies* 36 (2): 158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1470-6431.2011.01092.x>
- Belletti G, Marescotti A, Touzard J-M. 2017. Geographical indications, public goods, and sustainable development: The roles of actors' strategies and public policies. *World Development* 98: 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2015.05.004>
- Bryla P. 2017. The perception of EU quality signs for origin and organic food products among Polish consumers. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 9 (3): 345–355. <https://doi.org/10.3920/QAS2016.1038>
- Cafiero C, Palladino M, Marciandò C, Romeo G. 2020. Traditional agri-food products as a leverage to motivate tourists: A meta-analysis of tourism-information websites. *Journal of Place Management and Development* 13 (2): 195–214. <https://doi.org/10.1108/JPM-05-2019-0032>
- Dogan N, Adanacioglu H. 2021. ¿Las indicaciones geográficas fomentan la producción local? Analizando las estrategias de los productores. *Revista de la Facultad de Agronomía* 120 (1): 073. <https://doi.org/10.24215/16699513e073>
- Eldesouky A, Mesias FJ, Escribano M. 2019. Perception of Spanish consumers towards environmentally friendly labelling in food. *International Journal of Consumer Studies* 44 (1): 64–76. <https://doi.org/10.1111/ijcs.12546>
- Gujarati DN. 2001. *Basic Econometrics* (in Turkish). Şenesen Ü, Şenesen GG (Transl.); Literatür Publications: Istanbul, Turkey. 849 p.
- Gumushane Governorate Publications. 2010. Gumushane Governorate, “pestil-köme”, Turkish Patent Inst. (TPI) [Geographical Registration Certificate] (in Turkish).
- Karagöz Y. 2016. *SPSS and AMOS23 Applied Statistical Analysis*. Nobel Academic Publishing Education Consulting: Ankara, Turkey.
- Kumar V, Srivastava R. 2020. New perspectives on business model innovations in emerging markets. *Journal of the Academy of Marketing Science* 48: 815–825. <https://doi.org/10.1007/s11747-019-00713-2>
- Le-Anh T, Nguyen-To T. 2019. Consumer purchasing behaviour of organic food in an emerging market. *International Journal of Consumer Studies* 44 (6): 563–573. <https://doi.org/10.1111/ijcs.12588>
- Menapace L, Moschini GC. 2012. Quality certification by geographical indications, trademarks and firm reputation. *European Review of Agricultural Economics* 39 (4): 539–566. <https://doi.org/10.1093/erae/jbr053>
- Meral Y, Sahin A. 2013. Consumers' perceptions of product with geographical Indication: The case of Gemlik Olives. *KSU Journal of Agriculture and Nature* 16 (4): 16–24. <https://dergi-park.org.tr/en/pub/ksudobil/issue/22839/243816> (Recuperado: junio 2021).
- My NHD, Rutsaert P, Van Loo E, Verbeke W. 2017. Consumers' familiarity with and attitudes towards food quality certifications for rice and vegetables in Vietnam. *Food Control* 82: 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.011>
- Neilson J, Wright J, Aklimawati L. 2018. Geographical indications and value capture in the Indonesia coffee sector. *Journal of Rural Studies* 59: 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2018.01.003>
- Newbold P, Carlson WL, Thorne BM. 1995. *Statistics for Business and Economics*. Pearson Education-Prentice-Hall: New Jersey, USA. 772 p.
- Prättälä R. 2003. Dietary changes in Finland — success stories and future challenges. *Appetite* 41 (3): 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2003.08.007>
- Santeramo FG, Lamonaca E. 2020. Evaluation of geographical label in consumers' decision-making process: a systematic review and meta-analysis. *Food Research International* 131: 108995. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108995>

- Toklu İT, Ustaahmetođlu E, Küçük HÖ. 2016. Consumers' perception of geographically indicated products and their willingness to pay more: A structural equation modelling approach. *Management and Economics (in Turkish). Yönetim ve Ekonomi Dergisi* 23 (1): 145–161. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/yonveek/issue/24743/261624> (Recuperado: mayo 2021).
- Wang J, Tao J, Chu M. 2020. Behind the label: Chinese consumers' trust in food certification and the effect of perceived quality on purchase intention. *Food Control* 108: 106825. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106825>

Agrociencia

EFFECT OF SEED PRIMING AND FOLIAR APPLICATIONS OF P IN TOMATO SEEDLINGS

Perla Abigail Cárdenas-Atayde¹, Marcelino Cabrera-de la Fuente², Libia Iris Trejo-Téllez³, Adalberto Benavides-Mendoza², Carlos Alberto Garza-Alonso*

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Doctorado en Ciencias en Agricultura Protegida. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25315.

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25315.

³ Colegio de Postgraduados, Programa de Edafología. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

* Author for correspondence: carlos.garza.alonso@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different sources and forms of application of phosphate fertilizers on the initial growth of tomato (cv. Moctezuma F1) under greenhouse conditions. The sources consisted of commercial liquid fertilizer (FL), soluble monoammonium phosphate (MAP), and phosphoric acid (H_3PO_4), which were applied as pretreatment to seeds (seed priming) and foliar spray at a concentration of P_2O_5 of 240 mg L⁻¹. In the first case, the seeds were subjected for 24 h to solutions prepared with the different sources, while the foliar applications were made when the first true leaves appeared. The seeds were established in expanded polystyrene trays, using peat moss as substrate. For the statistical analyses, a completely randomized design with a 4 × 2 factorial arrangement (four sources of P and two forms of application) was considered, giving a final combination of eight treatments with five repetitions. The experimental unit consisted of 11 seedlings. The variables evaluated were the fresh and dry weight of the aerial part (leaf + stem) and root, stem diameter, SPAD units and the foliar concentration of N, P and K. The results indicate that there was no interaction between the factors studied in all the evaluated variables, except for fresh and dry root weight. In general, the applied treatments showed favorable results in the foliar application method. The results indicate that it is possible to favor the initial growth of tomato seedlings by applying P fertilizer sources, mainly through foliar applications of FL and MAP.

Keywords: foliar fertilization, phosphorus, greenhouse, plant nutrition, *Solanum lycopersicum*.

INTRODUCTION

The constant increase in the population, as well as the loss of harvest surface due to soil erosion and contamination, forces us to look for alternatives to increase agricultural production, such as food, forages, fibers, and phytochemicals, seeking high yields per unit of space and better nutritional characteristics.

Phosphorus (P) is a macronutrient for all living organisms, and together with nitrogen (N), it is one of the most determining elements for agricultural production. P is a key

Citation: Cárdenas-Atayde PA, Cabrera-de la Fuente M, Trejo-Téllez LI, Benavides-Mendoza A, Garza-Alonso CA. 2022. Effect of seed priming and foliar applications of P in tomato seedlings. *Agrociencia*. 56(6): 1200-1223. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2792>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: May 18, 2022.
Approved: August 30, 2022.
Published in Agrociencia:
September 27, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



and fundamental element of biomolecules such as ATP, nucleic acids, phospholipids, and proteins, so a deficiency of this element produces a negative impact on the growth and development of plants (Magalhaes *et al.*, 2017).

In several regions of the world, there are problems of deficiency or low availability of P in the soil, mainly in areas of arid-semiarid climate, where predominate calcareous soils with high contents of CaCO₃ and pH values greater than 8-8.5, where this element is found in insoluble forms (Bai *et al.*, 2017). Additionally, temperatures below 15 °C reduce the absorption of P by seedlings, where the deficiency of this element produces various physiological disorders.

The success in crop production depends largely on the establishment stage, where factors such as sowing method and seed quality influence. Recently, a set of seed pretreatment techniques have emerged that favor the germination and initial growth of seedlings, methodologies known as “seed conditioning” or “seed priming”. In its origins, this concept included only the action of imbibing seeds and subsequent drying for sowing, increasing the vigor of the plants. In recent years, this concept has encompassed various techniques, such as the use of temperature (high and low), UV rays, phytohormones, microorganisms, and mineral salts (Waqas *et al.*, 2019).

Currently, studies have been conducted on the positive effect of the imbibition of seeds in solutions with phosphate compounds (early germination, higher yield and increase in biomass) compared to the use of seeds without previous treatment (Baig. *et al.*, 2020). On the other hand, Abdel-Aziz *et al.* (2019) compared foliar application and seed conditioning with NPK in *Phaseolus vulgaris*, where foliar treatment was more effective, increasing vegetative growth and grain yield. In the literature, there is little information about the use of different P sources for seed pretreatment or application in tomato seedlings.

Based on the above, the objective of this research was to evaluate the effect of three sources of phosphorus as seed priming and foliar applications on the initial growth of tomato seedlings.

MATERIALS AND METHODS

Location of the experiment and plant material

The experiment was carried out in the Department of Horticulture of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, located at 25° 21' 12.8" north latitude and 101° 1' 51.9" west longitude. The greenhouse used was a tunnel type, with an average temperature of 25 °C and a relative humidity of 60 %. The plant material was the hybrid “Moctezuma F1”, from the Harris Moran seed house, a saladette tomato type with an indeterminate growth habit and resistance to Va, Ma, Mi, Mj, Fol (1,2,3), ToMV, Ff, TYLCV and TSWV, in addition to having a germination percentage greater than 98 %.

Treatments applied

The treatments consisted of different sources of P applied as seed pretreatment (seed conditioning) and by foliar spray. The fertilizer sources considered were commercial

liquid fertilizer ProGerminator® (FL), with a composition of 9 % N, 24 % P and 2.8 % K; soluble monoammonium phosphate Ultrasol® SQM (MAP), with a composition of 12 % N and 61 % P; and phosphoric acid (H_3PO_4), with a content of 52 % P. The doses used for each fertilizer were 240 mg P_2O_5 L⁻¹: 1 mL FL L⁻¹, 0.4 g MAP L⁻¹, and 0.46 mL H_3PO_4 L⁻¹. In both forms of application, the application of distilled water was considered as a control.

Establishment of the experiment

For seed priming, the seeds were placed in each of the previously mentioned solutions for 24 h and then sown. The seeds of the rest of the treatments were sown directly. Sowing was performed in 72-cavity expanded polystyrene trays (110 cm³ volume per cavity), using peat moss as substrate. When the first true leaves appeared, a base fertilization was started that consisted of a Steiner nutrient solution at a concentration of 10 %. This solution was used as irrigation water. From 15 days after sowing, foliar applications of the treatments were started, considering a weekly application for a period of four weeks.

Temperature monitoring

Air and substrate temperature were recorded with an Elitech® GSP-6 Data Logger (Elitech Technology, Inc., California, USA), placing a sensor at the height of the plant canopy and another at 5 cm inside the substrate. The data recording interval of both sensors was 15 min and was carried out from sowing until the end of the experiment (Figure 1).

Determination of agronomic variables

The agronomic variables evaluated were the fresh weight (FW) and dry weight (DW) of leaves, fresh and dry weight of roots, and stem diameter. For the determination of

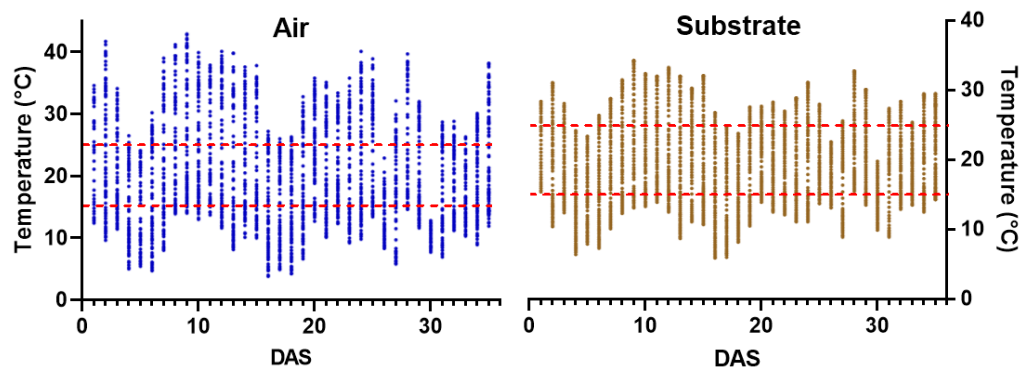


Figure 1. Variation in the daily temperature recorded in the air and substrate of tomato seedlings. DAS: Days after sowing. The red lines indicate the optimal ranges for the absorption of P by the root, ranging from 15 to 25 °C (Fan *et al.*, 2020).

dry biomass, the samples were placed in a drying oven (Yamato DX602C, Yamato Scientific America, CA, USA) at 70 °C for 72 h, while the measurement was performed on an OHAUS® CS analytical balance with a precision of 0.001 g.

Relative chlorophyll content (SPAD)

At the end of the experiment, the relative chlorophyll content expressed in SPAD units was measured using the SPAD-502 portable equipment (Konica Minolta, Tokyo, Japan), performing the determination in the most recent mature leaf of the seedlings, obtaining readings in two leaflets to subsequently calculate the mean.

Determination of N, P and K by ICP–AES

The concentrations of N, P and K in the tissues were determined according to the methodology proposed by Alcántar-González and Sandoval-Villa (1999). The resulting dry matter material was crushed in a porcelain mortar, and then 0.5 g of powder was taken and subjected to acid digestion in a mixture of HNO₃:HClO₄ (2:1 mL) and 2 mL of H₂O₂ to 30 %.

N was quantified using the micro-Kjeldahl method, according to the methodology of Bremner (1965). The concentrations of P and K were determined using a coupled plasma induction atomic emission spectrometer model 725-ES (ICP–AES) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The results of N, P and K were expressed as mg kg⁻¹ of DW.

Experimental design and statistical analysis

The experiment was established considering a completely random design with a 4 × 2 factorial arrangement, consisting of four treatments (control, FL, MAP and H₃PO₄) and two forms of application (seed priming and foliar spray), giving a total combination of eight treatments, for which five replicates were established, each with 11 plants as an experimental unit. The data were subjected to an analysis of variance, comparing means for the variables with statistically significant differences ($p \leq 0.05$), and this comparison was carried out by the Tukey method. Additionally, to establish relationships between the variables evaluated, a Pearson correlation analysis was performed, considering a significance value of $p \leq 0.05$. The analyses were performed in the statistical package Infostat v. 2020.

RESULTS AND DISCUSSION

The results showed a statistically significant difference for the application method and source factors; however, a significant interaction was found only between the experimental factors for the fresh and dry root weight variables (Table 1).

The application of foliar treatments was more effective for all the variables studied. In the case of the fresh weight of leaves, the foliar method favored this variable by 17 % with respect to the seed priming technique. The applications of phosphate sources increased the fresh biomass of the seedlings, where the H₃PO₄ and the FL promoted increases of 54 and 57 %, respectively, while the MAP caused an increase of 105 %,

Table 1. Significance levels (p) and F values found in the analysis of variance for the application method and source factors and their interaction in the evaluated variables.

Factor	p/F	LFW	LDW	RFW	RDW	SPAD	SD	N	P	K
Method	p value	0.021	0.042	0.007	0.002	0.084	0.013	0.035	0.008	0.001
	F	5.86	4.5	8.32	10.41	3.14	6.8	4.99	8.33	25.76
Source	p value	0.000	0.000	0.016	0.000	0.001	0.001	0.004	0.006	0.016
	F	17.89	7.51	3.97	7.98	17.01	15.7	5.63	5.31	4.14
Method × Source	p value	0.088	0.09	0.001	0.005	0.083	0.689	0.22	0.13	0.301
	F	2.37	2.32	6.81	7.82	2.43	0.49	1.58	2.07	1.29

LFW: Leaf fresh weight; LDW: Leaf dry weight; RFH: Root fresh weight, RDW: Root dry weight; SPAD: Relative chlorophyll content; SD: Stem diameter.

the above with respect to the control treatment. A similar trend was observed in the dry biomass of leaves, where the foliar application method promoted an increase of 18 %, while the sources H_3PO_4 and FL showed increases of 40 and 45 %, respectively. On the other hand, the greatest increase was recorded in MAP, which increased the weight of the dry biomass of leaves by 71 % with respect to the control. On the other hand, the diameter of the stem of the seedlings increased by 8 % when performing foliar applications compared to the pretreatment of seeds. In turn, an increase of 28 % was observed with the application of FL, as well as an increase of 18 % when applying MAP, all of the above with respect to the control treatment (Table 2).

The relative chlorophyll content was also favored with the application of phosphate sources. Among the application methods, no significant differences were observed; however, all phosphoric sources positively affected the values of SPAD units in tomato leaves, as follows: $FL > MAP > H_3PO_4$, with increases of 20, 15, and 9 %, respectively, compared to the control treatment (Table 2). The same increase in SPAD units was reported by Makela *et al.* (2020) in foliar applications of various sources of P in *Fagopyrum esculentum* and *Brassica napus* plants.

Table 2. Fresh and dry weight of leaves, stem diameter and SPAD units in tomato seedlings.

Factor	LFW	LDW	SD	SPAD
		Method		
Seed priming	4834±1441 b	802.4±233 b	3.65±0.45 b	37.49±2.85 a
Foliar	5650±1861 a	945.1±303 a	3.94±0.54 a	39.49±4.15 a
		Source		
Control	3417±899 c	628.8±180 b	3.37±0.29 c	34.57±4.75 c
H_3PO_4	5283±1197 b	877.8±201 ab	3.52±0.33 c	37.88±1.90 b
FL	5369±824 b	913.8±225 a	3.97±0.48 b	39.94±3.66 ab
MAP	6998±1658 a	1074±308 a	4.32±0.32 a	41.57±1.93 a

LFW: Leaf fresh weight; LDW: Leaf dry weight; SD: Stem diameter; SPAD: Relative chlorophyll content. The values represent the mean ± standard deviation. Different letters in each column indicate significant difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

The increases in the biomass of tomato seedlings are explained because P is an important constituent of the structure of nucleic acids and lipid membranes, in addition to being a component of adenosine triphosphate (ATP), for which it is involved in all energy transfer reactions in cells (Hawkesford *et al.*, 2012). On the other hand, this element participates in photosynthesis, sugar translocation, nutrient movement in the plant and transfer of genetic information during cell division (Karthika *et al.*, 2018). In addition, Li *et al.* (2007) discovered that there are at least 106 proteins that require P for their synthesis. These proteins are involved in various metabolic processes, such as phytohormone synthesis, carbon metabolism, signal transduction, cellular organization, and secondary metabolism. Due to these functions, a higher content of available P will favor the vegetative growth of plants.

Shah *et al.* (2011) reported that pretreatment with diammonium phosphate (DAP) and simple superphosphate (SSP) favored the percentage of germination, plant length and flowering in plants of *Abelmoschus esculentus*. On the other hand, the application of KH_2PO_4 at doses of 0.1, 0.2 and 0.3 % (m/v) as pretreatment of wheat seeds also increased the dry matter gain in plants, as well as the number of spikes m^{-2} , spike length and days to physiological maturity (Khalil *et al.*, 2010). The seed priming of *Zea mays* with P sources (KH_2PO_4 , DAP and SSP) adjusted to obtain a concentration of 1 % P_2O_5 (m/v) increased the fresh and dry biomass, plant height and grain yield. Additionally, the foliar levels of P were higher when pretreatments of this element were applied (Miraj *et al.*, 2013).

On the other hand, it has been shown that of the total P absorbed through foliar applications, 52 % is used mainly for metabolic processes, 17 % as part of nucleic acids, and 21 % as a structural component (mainly phospholipids of cell membranes), while 10 % of P is considered residual (undefined forms), which is not used by the plant. All of the above was reported by Mo *et al.* (2019) in *Clerodendrum cyrtophyllum*. The foliar application of nutrients is more efficient due to the rapid response of the plants since the ions are used directly in the required area (Alshaal and El-Ramady, 2017).

In the case of the fresh and dry weight of the roots, the statistical analysis showed an interaction between the application method and the source. The greatest increases in the dry and fresh weight of the roots were observed in the FL and MAP treatments applied via foliar application, where the fresh biomass of the roots increased by 57 and 60 %, respectively, with respect to the lowest value (control, seed conditioning). In turn, the treatment of H_3PO_4 to seeds favored an increase of 39 % with respect to the same control (Figure 2A). On the other hand, a similar effect was observed in the dry biomass of the root, where the foliar-MAP and foliar-FL combinations showed the greatest increases (78 and 76 %, respectively), while the H_3PO_4 by seed priming produced an increase of 35 % with respect to the control (Figure 2B).

P is an important element for the formation of the root system of plants (González *et al.*, 2020), which explains the greater growth of roots in tomato seedlings. The increase found in the H_3PO_4 treatment applied via seed priming can be explained by the chemical properties of the acids, which possibly favored a thinning of the seed coat,

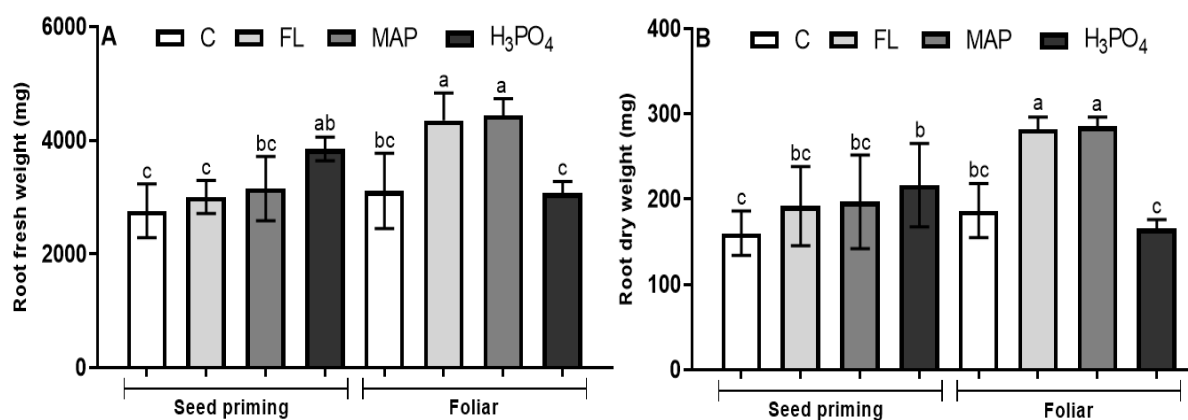


Figure 2. Root fresh weight (A) and root dry weight (B) of tomato seedlings. The bars represent the means of each treatment, and the lines above the bars indicate the standard deviation (n=5). Different letters on the bars indicate significant differences between treatments (Tukey, $p < 0.05$).

favoring the access of water and HPO_4^- ions, which produced greater root production (Lambers and Plaxton, 2015). The treatment of seeds with different acids is widely used to promote germination and the initial growth of seedlings (Bera *et al.*, 2020).

In addition, the application of pretreatments with phosphate fertilizers favors a greater capacity to mobilize seed reserves, as well as a greater percentage of efficiency in the use of these reserves, promoting a greater initial growth of seedlings (Seyyedi *et al.*, 2015.). P is also a constituent of nucleic acids (DNA and RNA) and phospholipids of cell membranes (White and Hammond, 2008).

The foliar concentrations of N, P and K also increased with the application of phosphate fertilizers. In the case of N, foliar applications increased the concentration of this element by 10 % with respect to the seed priming technique (Figure 3A). On the other hand, only the MAP and FL fertilizers increased the concentration of N, with increases of 25 and 23 %, respectively, compared to the control (Figure 3B). The same trend between the application methods was observed in the concentration of P, which was 9 % higher than the seed conditioning (Figure 3C), while all the treatments favored the concentration of P, for which the FL and H_3PO_4 produced increases of 14 %, while with MAP, there was an increase of 15 % with respect to the control (Figure 3D). On the other hand, the foliar K concentration increased by 20 % in the foliar application method compared to the seed priming method (Figure 3E). With respect to the phosphate sources, a similar trend was observed as that found in P, observing that all the fertilizers positively affected the levels of K in the leaves, as follows: $\text{H}_3\text{PO}_4 > \text{FL} > \text{MAP}$, with increases. of 18, 17 and 13 %, respectively, compared to the control (Figure 3F).

The correlation analysis showed highly significant positive relationships ($p < 0.01$) for most of the variables studied, where the relationships between the concentration of nutrients and the relative content of chlorophylls are highlighted, as well as the latter with the variables of fresh and dry biomass of the seedlings (Figure 4).

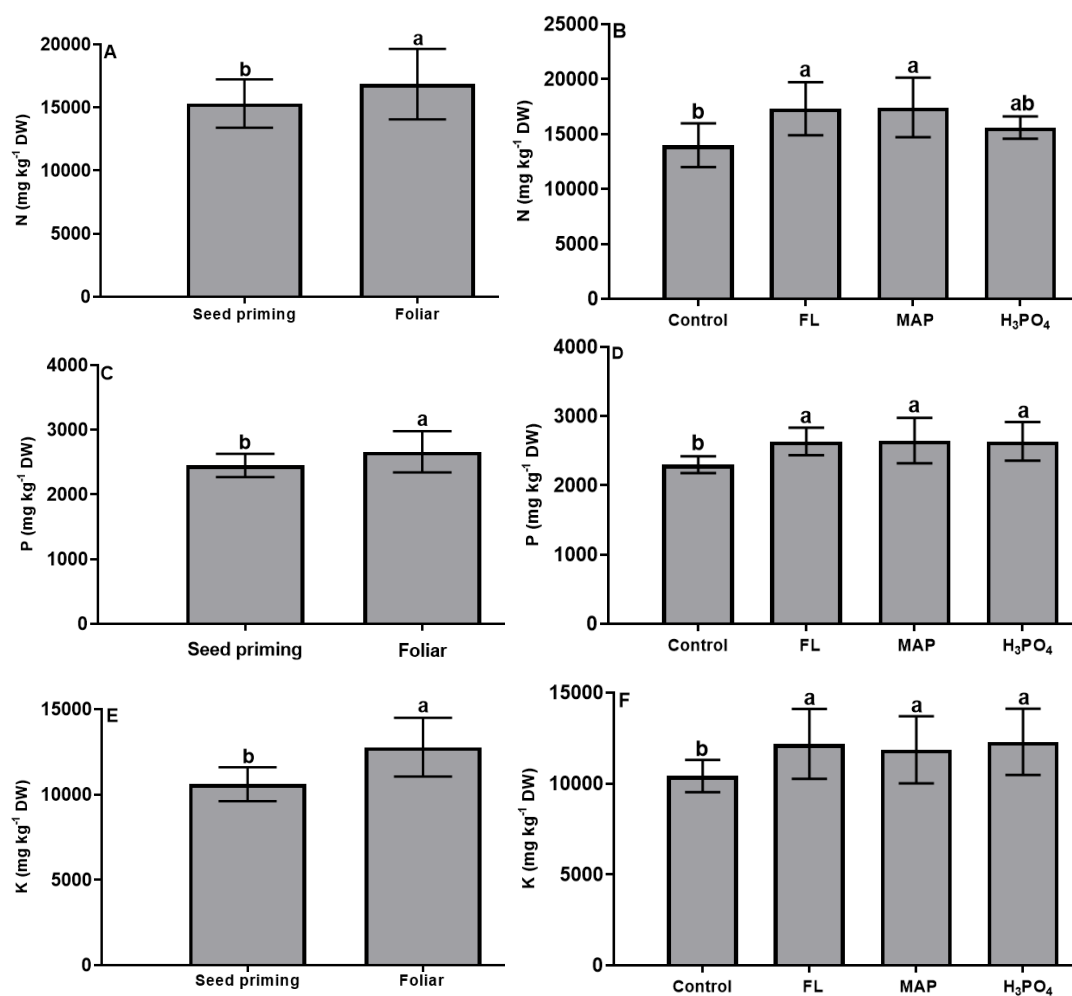


Figure 3. Concentrations of N (A, B), P (C, D), and K (E, F) in tomato leaves. The bars represent the means of each treatment, and the lines above the bars indicate the standard deviation (n=5). Different letters on the bars indicate significant differences between treatments (Tukey, $p \leq 0.05$).

According to Quintana-Blanco *et al.* (2017), in the face of an excess of P, the chlorophyll contents tend to be reduced due to the occurrence of an antagonism with anions such as NO₃⁻, since chlorophyll and photosynthetic capacity are directly related to the content of P and N in the plant (Singh and Reddy, 2015). Singh *et al.* (2017) suggested that under P deficiency, the decrease in chlorophyll content occurs as a mechanism to avoid excess light capture to protect PSII from light damage. On the other hand, P plays an important role in the linear flow of the electron chain in the stroma through the activity of ATP synthase (Carstensen *et al.*, 2018), so this element is indispensable in the photosynthetic mechanism.

The increase in SPAD values is directly related to an increase in chlorophyll levels (Uddling *et al.*, 2007). The higher content of N in the tissues explains the greater

LDW	r	.903**							
	p	.000							
RFW	r	.481**	.568**						
	p	.002	.000						
RDW	r	.620**	.663**	.741**					
	p	.000	.000	.000					
SPAD	r	.520**	.575**	.634**	.608**				
	p	.001	.000	.000	.000				
SD	r	.466**	.490**	.426**	.486**	.612**			
	p	.002	.001	.006	.001	.000			
N	r	.524**	.427*	.331	.424*	.488*	.427*		
	p	.002	.015	.064	.016	.011	.015		
P	r	.510**	.462**	.463**	.406*	.553**	.460**	.296	
	p	.003	.008	.008	.049	.001	.008	.100	
K	r	.339	.401*	.343	.429*	.433*	.423*	.235	.512**
	p	.058	.023	.055	.014	.013	.016	.196	.003
Variables		LFW	LDW	RFW	RDW	SPAD	SD	N	P

Figure 4. Correlation matrix between the variables evaluated. LFW: Leaf fresh weight; LDW: Leaf dry weight; RFW: Root fresh weight, RDW: Root dry weight; SPAD: Relative chlorophyll content; SD: Stem diameter; N; P; K. *Significant correlation ($p \leq 0.05$); **Highly significant correlation ($p \leq 0.01$); r: Pearson correlation coefficient; p: significance value.

production of chlorophylls due to the function of this element as a structural component of RuBisCO, the most abundant enzyme in the leaves (Hawkesford *et al.*, 2012). On the other hand, N has high synergism with Mg absorption, so the increase in the latter also favors the increase in chlorophylls due to its importance as a central component of these molecules (Karthika *et al.*, 2018). Krouk and Kiba (2020) mention that joint applications of N- and P-based fertilizers are more efficient than applying these elements separately. In this research, MAP and commercial fertilizers contained levels of N and P, which explains the results found.

On the other hand, the SPAD resulted in a positive relationship with the aerial biomass, root and stem diameter, which is explained because a higher content of chlorophylls in the leaves increases the photosynthetic rate (Rai-Kalal and Jajoo, 2021), resulting in greater vegetative growth. In turn, the foliar concentrations of N and P were related to the levels of SPAD, which was explained in the results previously presented. Likewise, N and P were positively correlated with most of the variables studied, which is explained by the functions of these elements in the metabolism of plants.

CONCLUSIONS

The application of different P fertilizer sources, such as seed pretreatments and foliar applications, favored the vegetative growth of tomato seedlings, as well as a higher relative content of chlorophyll and foliar concentrations of N, P and K. In general, the commercial liquid fertilizer and monoammonium phosphate applied via foliar application showed greater efficiency than seed pretreatment to increase the aforementioned variables. The results indicate that it is possible to increase the quality of the seedlings, which would potentially favor greater success in the establishment of this crop.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Department of Horticulture of the UAAAN for the facilities provided for the development of this research project.

REFERENCES

- Abdel-Aziz HMM, Hasaneen MNA, Omer AM. 2019. Impact of engineered nanomaterials either alone or loaded with NPK on growth and productivity of French bean plants: Seed priming vs. foliar application. *South African Journal of Botany* 125: 102–108. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.005>
- Alcántar-González G, Sandoval-Villa M. 1999. Manual de análisis químicos de tejidos vegetales, Publicación especial No. 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Chapingo, México.
- Alshaal T, El-Ramady H. 2017. Foliar application: from plant nutrition to biofortification. *Environment, Biodiversity and Soil Security* 1: 71-83. <https://dx.doi.org/10.21608/jenvbs.2017.1089.1006>
- Bai J, Ye X, Jia J, Zhang G, Zhao Q, Cui B, Liu X. 2017. Phosphorus sorption-desorption and effects of temperature, pH and salinity on phosphorus sorption in marsh soils from coastal wetlands with different flooding conditions. *Chemosphere* 188: 677–688. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.117>
- Baig KK, Ara N, Ali S, Khan BP, Wahab A, Rabbani U. 2020. Effect of seed priming on bitter melon with different sources of phosphorus at various soaking durations. *Pure and Applied Biology* 9(1): 80-90. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2020.90010>
- Bera A, Mukhopadhyay E, Kar CS, Kumar M, Bhandari HR. 2020. Efficacy of scarification treatments on release of seed coat imposed dormancy in five wild species of genus *Corchorus*. *South African Journal of Botany* 135: 144-147. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.040>
- Bremner, JM. 1965. Total nitrogen. *In: Methods for Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, Norman AG (Ed.); American Society of Agronomy Inc.: Madison, WI, USA, 1149-1178.
- Carstensen A, Herdean A, Birkelund S, Sharma A, Spetea C, Pribil M, Husted S. 2018. The impacts of phosphorus deficiency on the photosynthetic electron transport chain. *Plant Physiology* 117: 271-284. <https://dx.doi.org/10.1104/PP.17.01624>
- Fan X, Xu D, Wang D, Wang Y, Zhang X, Ye N. 2020. Nutrient uptake and transporter gene expression of ammonium, nitrate, and phosphorus in *Ulva linza*: adaptation to variable concentrations and temperatures. *Journal of Applied Phycology* 32(2): 1311–1322. <https://dx.doi.org/10.1007/s10811-020-02050-2>
- González M, Ríos D, Peña-Rojas K, García E, Acevedo M, Cartes E, Sánchez-Olate M. 2020. Effect of phosphorous and calcium concentration on morpho-physiological attributes and root growth potential of *Aextoxicon punctatum* plants produced by covered root during hardening stage. *Bosque* 41(2): 137–146. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002020000200137>
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Skrumager I, White P. 2012. Functions of macronutrients. *In: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (3rd edition),

- Marschner H (ed.), Academic Press: London, UK, 135-189. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6>
- Karthika KS, Rashmi I, Parvathi MS. 2018. Biological functions, uptake and transport of essential nutrients in relation to plant growth. *In: Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*, Hasanuzzaman M, Fujita M, Oku H, Nahar K, Hawrylak B (eds.), Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1-49. <https://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8>
- Khalil SK, Khan S, Rahman A, Khan AZ, Khalil IH, Wahab S, Mohammad F, Nigar S, Zubair M, Parveen S, Khan A. 2010. Seed priming and phosphorus application enhance phenology and dry matter production of wheat. *Pakistan Journal of Botany* 42(3): 1849–1856.
- Krouk G, Kiba T. 2020. Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: from agronomic to physiological and molecular insights. *Current Opinion in Plant Biology* 57: 104–109. <https://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2020.07.002>
- Lambers H, Plaxton WC. 2015. Phosphorus: Back to the Roots. *Annual Plant Reviews Online* 48: 3–22. <https://dx.doi.org/10.1002/9781119312994.apr0516>
- Li K, Xu C, Zhang K, Yang A, Zhang J. 2007. Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. *Proteomics* 7(9): 1501–1512. <https://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600960>
- Magalhaes F, Krogerus K, Castillo S, Ortiz-Julien A, Dequin S, Gibson B. 2017. Exploring the potential of *Saccharomyces eubayanus* as a parent for new interspecies hybrid strains in winemaking. *FEMS Yeast Research* 17(5): 1–10. <https://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fox049>
- Makela PSA, Wasonga DO, Hernández AS, Santanen A. 2020. Seedling growth and phosphorus uptake in response to different phosphorus sources. *Agronomy* 10(8): 80–90. <https://dx.doi.org/10.3390/agronomy10081089>
- Miraj G, Shah HU, Arif M. 2013. Priming maize (*Zea mays*) seed with phosphate solutions improves seedling growth and yield. *Journal of Animal and Plant Sciences* 23(3): 893–899.
- Mo Q, Li Z, Sayer EJ, Lambers H, Li Y, Zou B, Tang J, Heskell M, Ding Y, Wang F. 2019. Foliar phosphorus fractions reveal how tropical plants maintain photosynthetic rates despite low soil phosphorus availability. *Functional Ecology* 33(3): 503–513. <https://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.13252>
- Quintana-Blanco WA, Pinzón-Sandoval EH, Torres DF. 2017. Efecto de un fosfato térmico sobre el crecimiento y producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Ica cerinza. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 20(1): 51–59. <https://dx.doi.org/10.31910/rudca.v20.n1.2017.62>
- Rai-Kalal P, Jajoo A. 2021. Priming with zinc oxide nanoparticles improve germination and photosynthetic performance in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 160: 341–351. <https://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.032>
- Seyyedi SM, Khajeh-Hosseini M, Moghaddam PR, Shahandeh H. 2015. Effects of phosphorus and seed priming on seed vigor, fatty acids composition and heterotrophic seedling growth of black seed (*Nigella sativa* L.) grown in a calcareous soil. *Industrial Crops and Products* 74: 939–949. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.082>
- Shah AR, Ara N, Shafi G. 2011. Seed priming with phosphorus increased germination and yield of okra. *African Journal of Agricultural Research* 6(16): 3859–3876. <https://dx.doi.org/10.5897/AJAR11.564>
- Singh SK, Reddy VR. 2015. Response of carbon assimilation and chlorophyll fluorescence to soybean leaf phosphorus across CO₂: Alternative electron sink, nutrient efficiency and critical concentration. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 151: 276–284. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.021>
- Singh SK, Reddy VR, Fleisher DH, Timlin DJ. 2017. Relationship between photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in soybean under varying phosphorus nutrition at ambient and elevated CO₂. *Photosynthetica* 55(3): 421–433. <https://dx.doi.org/10.1007/s11099-016-0657-0>
- Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K, Pleijel H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91(1): 37–46. <https://dx.doi.org/10.1007/s11120-006-9077-5>

- Waqas M, Korres NE, Khan MD, Nizami AS, Deeba F, Ali I, Hussain H. 2019. Advances in the Concept and Methods of Seed Priming. *In: Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*, Hasanuzzaman M, Fotopoulos V (eds.), Springer, Singapore, 11-41. https://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_2
- White PJ, Hammond JP. 2008. Phosphorus Nutrition of Terrestrial Plants. *In: The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*, White PJ, Hammond JP (eds.), Springer Science, UK, 51-81.

EFFECTO DEL ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS Y APLICACIONES FOLIARES DE P EN PLÁNTULAS DE TOMATE

Perla Abigail Cárdenas-Atayde¹, Marcelino Cabrera-de la Fuente², Libia Iris Trejo-Téllez³, Adalberto Benavides-Mendoza², Carlos Alberto Garza-Alonso^{*}

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Doctorado en Ciencias en Agricultura Protegida. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25315.

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25315.

³ Colegio de Postgraduados, Programa de Edafología. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

* Autor para correspondencia: carlos.garza.alonso@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de distintas fuentes y formas de aplicación de fertilizantes fosfatados en el crecimiento inicial de tomate (cv. Moctezuma F1) bajo condiciones de invernadero. Las fuentes consistieron en: fertilizante líquido comercial (FL), fosfato monoamónico soluble (MAP) y ácido fosfórico (H_3PO_4), las cuales fueron aplicadas como pretratamiento a las semillas (acondicionamiento) y vía foliar a una concentración de P_2O_5 de 240 mg L^{-1} . En el primer caso, las semillas fueron sometidas durante 24 h a soluciones preparadas con las distintas fuentes, mientras que las aplicaciones foliares se realizaron al aparecer las primeras hojas verdaderas. Las semillas fueron establecidas en charolas de poliestireno expandido, utilizando turba como sustrato. Para los análisis estadísticos, se consideró un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4×2 (cuatro fuentes de P y dos formas de aplicación), dando una combinación final de ocho tratamientos con cinco repeticiones. La unidad experimental estuvo formada por 11 plántulas. Las variables evaluadas fueron el peso fresco y seco de parte aérea (hoja + tallo) y raíz, diámetro del tallo, unidades SPAD y la concentración foliar de N, P y K. Los resultados indican que no hubo interacción entre los factores estudiados en todas las variables evaluadas, a excepción del peso fresco y seco de raíz. En general, los tratamientos aplicados mostraron resultados favorables en el método de aplicación foliar. Los resultados encontrados indican que es posible favorecer el crecimiento inicial de plántulas de tomate al aplicar fuentes fertilizantes de P, principalmente mediante aplicaciones foliares de FL y MAP.

Palabras clave: fertilización foliar, fósforo, invernadero, nutrición vegetal, *Solanum lycopersicum*.

INTRODUCCIÓN

El constante incremento de la población, así como la pérdida de superficie cultivable por erosión y contaminación del suelo, nos obliga a buscar alternativas para incrementar la producción agrícola, como lo son alimentos, forrajes, fibras y fitoquímicos, buscando altos rendimientos por unidad de espacio y mejores características nutricionales.

Citation: Cárdenas-Atayde PA, Cabrera-de la Fuente M, Trejo-Téllez LI, Benavides-Mendoza A, Garza-Alonso CA. 2022. Efecto del acondicionamiento de semillas y aplicaciones foliares de P en plántulas de tomate.

Agrociencia. 56(6): 1200-1223. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2792>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: May 18, 2022.

Approved: August 30, 2022.

Published in Agrociencia:
September 27, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



El fósforo (P) es un macronutriente para todos los organismos vivos y junto con el nitrógeno (N), es uno de los elementos más determinantes para la producción agrícola. El P es un elemento clave y fundamental de biomoléculas como ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas, por lo que una deficiencia de este elemento produce un impacto negativo en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Magalhaes *et al.*, 2017). En varias regiones del mundo, existen problemas de deficiencia o baja disponibilidad de P en el suelo, principalmente en zonas de clima árido-semiárido, donde predominan suelos de naturaleza calcárea con altos contenidos de CaCO_3 y valores de pH mayores a 8, donde dicho elemento se encuentra en formas insolubles (Bai *et al.*, 2017). Adicionalmente, las temperaturas inferiores a los 15 °C dificultan la absorción de P por las plántulas, donde la deficiencia de este elemento produce diversos desórdenes fisiológicos.

El éxito en la producción de cultivos depende en gran medida de la etapa de establecimiento, donde influyen factores como método de siembra y calidad de la semilla. Recientemente, han surgido un conjunto de técnicas de pretratamiento de semillas que favorecen la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas, metodologías conocidas como “acondicionamiento de semillas” o “seed priming”. En sus orígenes, dicho concepto incluía solamente la acción de imbibición de semillas y posterior secado para la siembra, incrementando el vigor de las plantas. En los últimos años, este concepto engloba diversas técnicas como lo son el uso de temperatura (alta y baja), rayos UV, fitohormonas, microorganismos y sales minerales (Waqas *et al.*, 2019).

En la actualidad, se han realizado estudios donde se ha comprobado el efecto positivo que tiene la imbibición de semillas en soluciones con compuestos fosfatados (germinación temprana, mayor rendimiento e incremento de biomasa), en comparación con la utilización de semilla sin tratamiento previo (Baig *et al.*, 2020). Por otro lado, Abdel-Aziz *et al.* (2019) compararon la aplicación foliar y como acondicionamiento de semillas con NPK en *Phaseolus vulgaris*, donde el tratamiento foliar resultó más efectivo, incrementando el crecimiento vegetativo y rendimiento de grano. En la literatura se dispone de poca información acerca del uso de diferentes fuentes de P para el pretratamiento de semillas o la aplicación en plántulas de tomate.

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de tres fuentes de fósforo como pretratamiento de semillas y aplicación foliar en el crecimiento inicial de plántulas de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento y material vegetal

El experimento se llevó a cabo en el Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada a 25° 21' 12.8" latitud norte y 101° 1' 51.9" longitud oeste. El invernadero utilizado fue tipo túnel, con una temperatura promedio de 25 °C y humedad relativa de 60 %. El material vegetal fue el híbrido “Moctezuma F1”, de la casa semillera Harris Moran, tomate tipo saladette con hábito de crecimiento indeterminado y resistente a Va, Ma, Mi, Mj, Fol (1,2,3), ToMV, Ff, TYLCV y TSWV, además de contar con un porcentaje de germinación mayor a 98 %.

Tratamientos aplicados

Los tratamientos consistieron en distintas fuentes de P aplicado como pretratamiento de semillas (acondicionamiento de semilla) y por la vía de aspersión foliar. Las fuentes fertilizantes consideradas fueron: fertilizante líquido comercial ProGerminator® (FL), con una composición de 9 % N, 24 % P y 2.8 % K; fosfato monoamónico soluble UltraSol® SQM (MAP), con una composición de 12 % N y 61 % P y ácido fosfórico (H_3PO_4), con un contenido de 52 % P. Con el fin de estandarizar los tratamientos a una concentración de $240 \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1}$, las dosis utilizadas de cada fertilizante fueron: 1 mL FL L^{-1} , 0.4 g MAP L^{-1} y 0.46 mL $H_3PO_4 \text{ L}^{-1}$. En ambas formas de aplicación, se consideró la aplicación de agua destilada como testigo.

Establecimiento del experimento

Para la parte de acondicionamiento de semillas, éstas fueron colocadas en cada una de las soluciones previamente mencionadas, durante 24 h y posteriormente fueron sembradas. Las semillas del resto de los tratamientos fueron sembradas directamente. La siembra se realizó en charolas de poliestireno expandido de 72 cavidades (110 cm^3 de volumen por cavidad), utilizando turba como sustrato. Al aparecer las primeras hojas verdaderas, se inició con una fertilización base que consistió en solución nutritiva Steiner a una concentración del 10 %. Dicha solución se utilizó como agua de riego. A partir de los 15 días después de la siembra, se comenzó con las aplicaciones foliares de los tratamientos, considerando una aplicación semanal por un periodo de cuatro semanas.

Monitoreo de temperatura

La temperatura del aire y del sustrato se registró con un Data Logger Elitech® GSP-6 (Elitech Technology, Inc., California, USA), colocando un sensor a la altura del dosel vegetal y otro a 5 cm al interior del sustrato. El intervalo de grabación de datos de ambos sensores fue de 15 min y se llevó a cabo desde la siembra hasta finalizar el experimento (Figura 1).

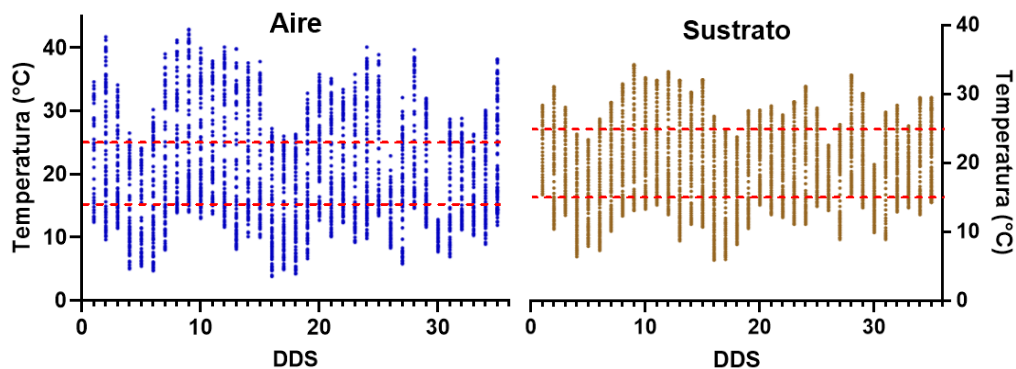


Figura 1. Variación en la temperatura diaria registrada en el aire y sustrato de las plántulas de tomate. DDS: Días después de la siembra. Las líneas color rojo señalan los rangos óptimos para la absorción de P por la raíz, que abarcan de los 15 a 25 °C (Fan *et al.*, 2020).

Determinación de variables agronómicas

Las variables agronómicas evaluadas fueron: Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de hojas, peso fresco y seco de raíz, así como el diámetro del tallo. Para la determinación de la biomasa seca, las muestras fueron colocadas en un horno de secado (Yamato DX602C, Yamato Scientific America, CA, USA) a 70 °C por 72 h, mientras que la medición se efectuó en una balanza analítica OHAUS® CS con precisión de 0.001 g.

Contenido relativo de clorofila (SPAD)

Al final del experimento, se midió el contenido relativo de clorofila expresado en unidades SPAD, utilizando el equipo portátil SPAD-502 (Konica Minolta, Tokyo, Japón), realizando la determinación en la hoja más reciente madura de las plántulas, obteniendo lecturas en al menos dos folíolos para posteriormente calcular la media.

Determinación de N, P y K por ICP-AES

La concentración de N, P y K en los tejidos fue determinada de acuerdo con la metodología propuesta por Alcántar-González y Sandoval-Villa (1999). El material resultante de materia seca fue triturado en un mortero de porcelana y posteriormente fueron tomados 0.5 g de polvo y sometidos a una digestión ácida en una mezcla de HNO₃: HClO₄ (2:1 mL) y 2 mL de H₂O₂ al 30 %.

El N se cuantificó mediante el método micro-Kjeldahl de acuerdo con la metodología de Bremner (1965). La concentración de P y K se determinó utilizando un espectrómetro de emisión atómica de inducción de plasma acoplado modelo 725-ES de Agilent (ICP-AES) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Los resultados de N, P y K fueron expresados como mg kg⁻¹ de peso seco.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento fue establecido considerando un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4 × 2, consistiendo en cuatro tratamientos (Testigo, FL, MAP y H₃PO₄) y dos formas de aplicación (acondicionamiento de semilla y foliar), dando una combinación total de ocho tratamientos, para los cuales se establecieron cinco repeticiones, cada una con 11 plantas como unidad experimental. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza, realizando comparación de medias para las variables con diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), dicha comparación se llevó a cabo por el método de Tukey. Adicionalmente, con el fin de establecer relaciones entre las variables evaluadas, se realizó un análisis de correlación de Pearson, considerando un valor de significancia de $p \leq 0.05$. Los análisis antes mencionados se realizaron en el paquete estadístico Infostat v. 2020.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron diferencia estadísticamente significativa para los factores de método de aplicación y fuente, sin embargo, solamente se encontró interacción significativa entre los factores experimentales para las variables pesos fresco y seco de raíz (Cuadro 1).

Cuadro 1. Niveles de significación (p) y valores de F encontrados en los análisis de varianza para los factores de método de aplicación y fuente y su interacción en las variables evaluadas.

Factor	p/F	PFH	PSH	PFR	PSR	SPAD	DT	N	P	K
Método	p valor	0.021	0.042	0.007	0.002	0.084	0.013	0.035	0.008	0.001
	F	5.86	4.5	8.32	10.41	3.14	6.8	4.99	8.33	25.76
Fuente	p valor	0.000	0.000	0.016	0.000	0.001	0.001	0.004	0.006	0.016
	F	17.89	7.51	3.97	7.98	17.01	15.7	5.63	5.31	4.14
Método × Fuente	p valor	0.088	0.09	0.001	0.005	0.083	0.689	0.22	0.13	0.301
	F	2.37	2.32	6.81	7.82	2.43	0.49	1.58	2.07	1.29

PFH: Peso fresco de hojas; PSH: Peso seco de hojas; PFR: Peso fresco de raíz, PSR: Peso seco de raíz; SPAD: Contenido relativo de clorofila; DT: Diámetro del tallo.

La aplicación de tratamientos vía foliar resultó más efectiva para todas las variables estudiadas. En el caso del peso fresco de hojas, el método foliar favoreció dicha variable en 17 % con respecto a la técnica de acondicionamiento de semillas. Las aplicaciones de fuentes fosfatadas incrementaron la biomasa fresca de las plántulas, donde el H_3PO_4 y el FL promovieron aumentos de 54 y 57 %, mientras que el MAP ocasionó un aumento de 105 %, lo anterior con respecto al tratamiento testigo. Una tendencia similar fue observada en la biomasa seca de hojas, donde el método de aplicación foliar promovió un incremento de 18 %; mientras que las fuentes H_3PO_4 y FL mostraron incrementos de 40 y 45 %, respectivamente. Por otra parte, el mayor aumento se registró en MAP, que incrementó el peso de la biomasa seca de hojas en 71 %, con respecto al testigo. Por otro lado, el diámetro del tallo de las plántulas se incrementó en 8 % al realizar aplicaciones foliares, en comparación con el pretratamiento de semillas. A su vez, se observó un aumento de 28 % con la aplicación de FL, así como un incremento del 18 % al aplicar MAP, todo lo anterior con respecto al tratamiento control (Cuadro 2).

Cuadro 2. Peso fresco y seco de hojas, diámetro del tallo y unidades SPAD en plántulas de tomate.

Factor	PFH	PSH	DT	SPAD
Métodos				
Acondicionamiento	4834±1441 b	802.4±233 b	3.65±0.45 b	37.49±2.85 a
Foliar	5650±1861 a	945.1±303 a	3.94±0.54 a	39.49±4.15 a
Fuente				
Control	3417±899 c	628.8±180 b	3.37±0.29 c	34.57±4.75 c
H_3PO_4	5283±1197 b	877.8±201 ab	3.52±0.33 c	37.88±1.90 b
FL	5369±824 b	913.8±225 a	3.97±0.48 b	39.94±3.66 ab
MAP	6998±1658 a	1074±308 a	4.32±0.32 a	41.57±1.93 a

PFH: Peso fresco de hojas; PSH: Peso seco de hojas; DT: Diámetro del tallo; SPAD: Contenido relativo de clorofila. Los valores representan la media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

El contenido relativo de clorofila también resultó favorecido con la aplicación de fuentes fosfatadas. Entre los métodos de aplicación no se observaron diferencias significativas, sin embargo, todas las fuentes fosfóricas afectaron positivamente los valores de unidades SPAD en las hojas de tomate, quedando de la siguiente manera: FL>MAP>H₃PO₄, encontrando incrementos de 20, 15 y 9 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento testigo (Cuadro 2). El mismo efecto de incremento en las unidades SPAD fue reportado por Makela *et al.* (2020) en aplicaciones foliares de diversas fuentes de P en plantas de *Fagopyrum esculentum* y *Brassica napus*.

Los incrementos en la biomasa de las plántulas de tomate se explican debido a que el P es un constituyente importante de la estructura de los ácidos nucleicos y las membranas lipídicas, además de ser componente de la adenosina trifosfato (ATP), por lo cual está involucrado en todas las reacciones de transferencia de energía en las células (Hawkesford *et al.*, 2012). Por otra parte, este elemento participa en la fotosíntesis, translocación de azúcares, movimiento de nutrientes en la planta y transferencia de información genética durante la división celular (Karthika *et al.*, 2018). Además de lo anterior, Li *et al.* (2007) descubrieron que existen por lo menos 106 proteínas que requieren del P para su síntesis. Dichas proteínas se encuentran involucradas en diversos procesos metabólicos, como síntesis de fitohormonas, metabolismo de carbono, transducción de señales, organización celular, metabolismo secundario, entre otros. Debido a estas funciones, un mayor contenido de P disponible favorecerá el crecimiento vegetativo de las plantas.

Shah *et al.* (2011) reportaron que el pretratamiento con fosfato diamónico (DAP) y superfosfato simple (SSP) favorecieron el porcentaje de germinación, longitud de planta y floración en plantas de *Abelmoschus esculentus*. Por otro lado, la aplicación de KH₂PO₄ a dosis de 0.1, 0.2 y 0.3 % (m/v) como pretratamiento de semillas de trigo también incrementó la ganancia de materia seca en las plantas, así como el número de espigas m², longitud de la espiga y días a madurez fisiológica (Khalil *et al.*, 2010). El acondicionamiento de semillas de *Zea mays* con fuentes de P (KH₂PO₄, DAP y SSP) ajustadas para obtener una concentración de 1 % P₂O₅ (m/v) incrementó la biomasa fresca y seca, la altura de planta y el rendimiento de grano. Adicionalmente, los niveles foliares de P fueron superiores cuando se aplicaron los pretratamientos de dicho elemento (Miraj *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que, del P total absorbido por medio de aplicaciones foliares, un 52 % es utilizado principalmente para procesos metabólicos, 17 % como parte de los ácidos nucleicos, 21 % como componente estructural (principalmente fosfolípidos de las membranas celulares) mientras que un 10 % de P se considera residual (formas indefinidas), el cual no es aprovechado por la planta. Todo lo anterior fue reportado por Mo *et al.* (2019) en *Clerodendrum cyrtophyllum*. La aplicación foliar de nutrientes resulta ser más eficiente debido a la rápida respuesta de las plantas, ya que los iones son utilizados directamente en la zona requerida (Alshaal y El-Ramady, 2017).

En el caso del peso fresco y seco de la raíz, el análisis estadístico mostró interacción entre el método de aplicación y la fuente. Los mayores aumentos en el peso seco y fresco de la raíz fueron observados en los tratamientos de FL y MAP aplicados vía foliar, donde la biomasa fresca de la raíz se incrementó en un 57 y 60 %, con respecto al valor más bajo (testigo, acondicionamiento de semilla). A su vez, el tratamiento de H_3PO_4 a semillas favoreció un aumento de 39 % con respecto al mismo testigo (Figura 2A). Por otro lado, un efecto similar fue observado en la biomasa seca de la raíz, donde las combinaciones foliar-MAP y foliar-FL mostraron los mayores incrementos (78 y 76 %, respectivamente), mientras que el H_3PO_4 vía acondicionamiento de semillas produjo un aumento del 35 %, con respecto al control (Figura 2B).

El P es un elemento importante para la formación del sistema radical de las plantas (González *et al.*, 2020), lo cual explica el mayor crecimiento de raíces en las plántulas de tomate. El incremento encontrado en el tratamiento H_3PO_4 aplicado vía el acondicionamiento de semillas puede explicarse debido a las propiedades químicas de los ácidos, lo cual posiblemente favoreció un adelgazamiento de la testa de la semilla, favoreciendo el acceso de agua y iones HPO_4^{2-} , lo cual produjo mayor producción de raíces (Lambers y Plaxton, 2015). El tratamiento de semillas con distintos ácidos es ampliamente utilizado para promover la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas (Bera *et al.*, 2020).

Además, la aplicación de pretratamientos con fertilizantes fosfatados favorece una mayor capacidad para movilizar las reservas de las semillas, así como un mayor porcentaje de eficiencia en la utilización de dichas reservas, promoviendo un mayor crecimiento inicial de las plántulas (Seyyedi *et al.*, 2015). El P también es constituyente de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y fosfolípidos de las membranas celulares (White y Hammond, 2008).

La concentración foliar de N, P y K también aumentó con las aplicaciones de fertilizantes fosfatados. En el caso del N, las aplicaciones foliares incrementaron la con-

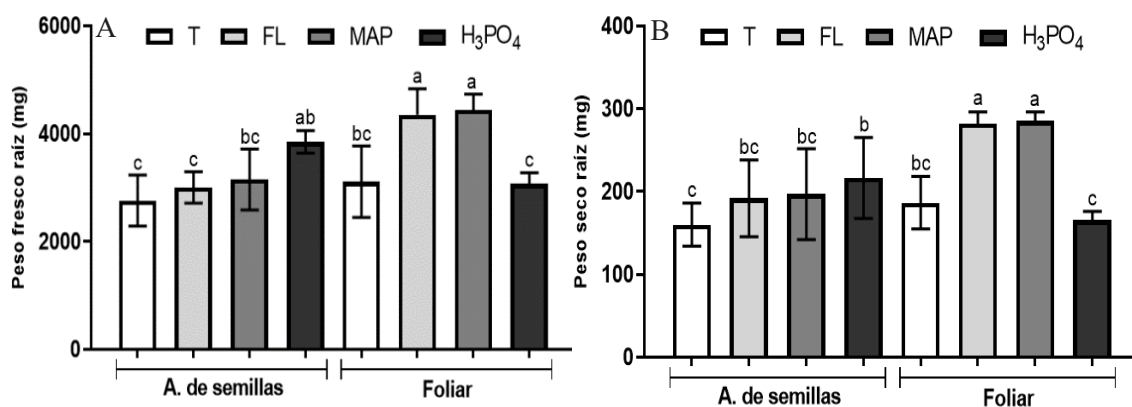


Figura 2. Peso fresco (A) y peso seco (B) de raíz de las plántulas de tomate. Las barras representan las medias de cada tratamiento, las líneas sobre las barras indican la desviación estándar ($n=5$). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

centración de este elemento en 10 %, con respecto a la técnica de acondicionamiento de semilla (Figura 3A). Por otro lado, solo los fertilizantes MAP y FL incrementaron la concentración de N, con aumentos de 25 y 23 %, respectivamente, en comparación con el testigo (Figura 3B). La misma tendencia entre los métodos de aplicación fue observada en la concentración de P, que resultó 9 % superior al acondicionamiento de semilla (Figura 3C), mientras que todos los tratamientos favorecieron la concentración de P, para la cual el FL y H_3PO_4 produjeron aumentos de 14 %, mientras que con el

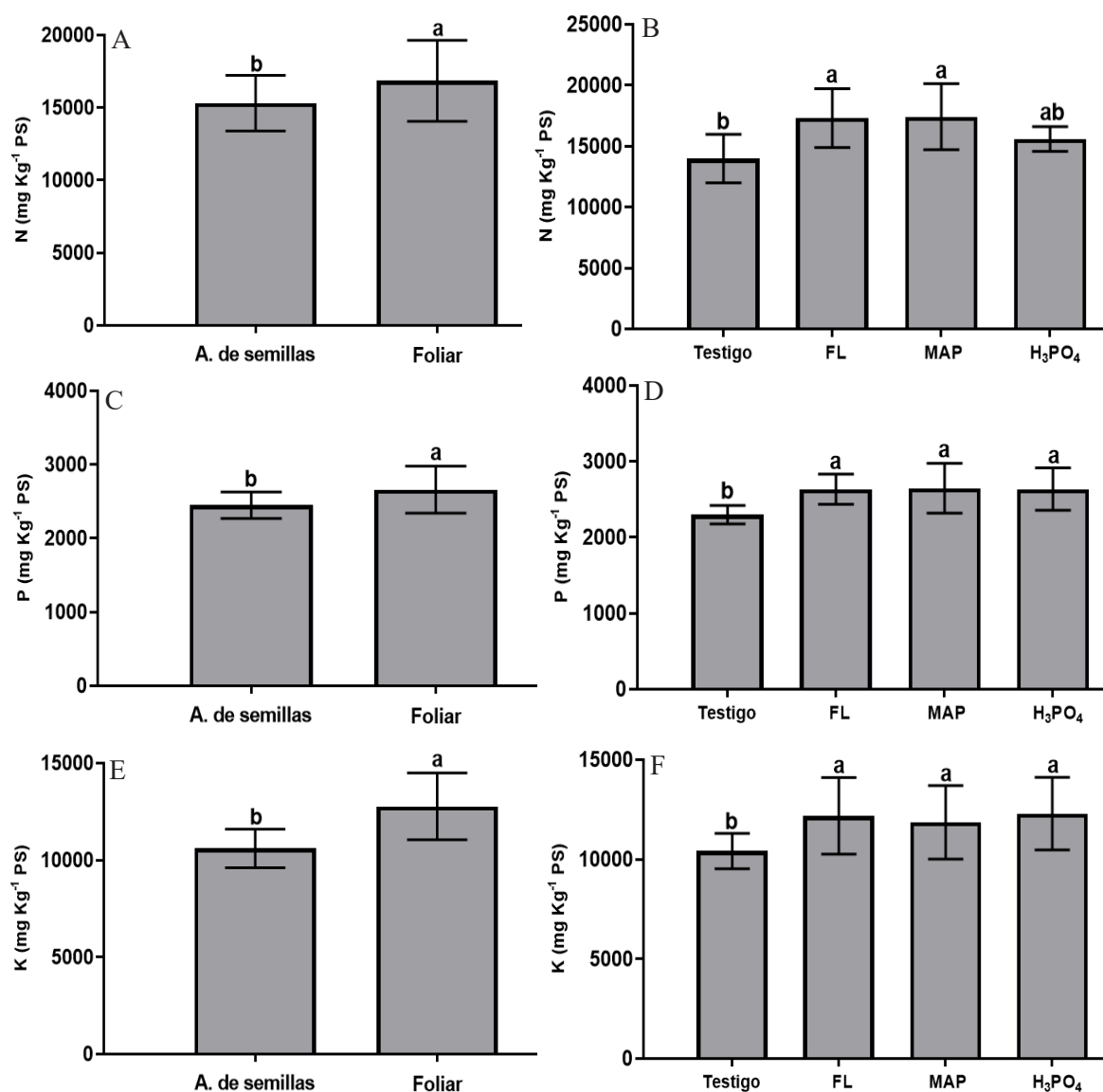


Figura 3. Concentración de N (A, B), P (C, D) y K (E, F) en las hojas de tomate. Las barras representan las medias de cada tratamiento, las líneas sobre las barras indican la desviación estándar (n=5). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

MAP se tuvo un incremento de 15 %, con respecto al testigo (Figura 3D). Por otro lado, la concentración foliar de K tuvo un incremento de 20 % en el método de aplicación foliar, comparado con el acondicionamiento de semilla (Figura 3E). Con respecto a las fuentes fosfatadas, se observó una tendencia similar que la encontrada en P, observando que todos los fertilizantes afectaron positivamente los niveles de K en las hojas, quedando de la siguiente manera: $H_3PO_4 > FL > MAP$, con incrementos del 18, 17 y 13 %, respectivamente, en comparación con el testigo (Figura 3F).

El análisis de correlación mostró relaciones positivas altamente significativas ($p \leq 0.01$) para la mayoría de las variables estudiadas, donde se destacan las relaciones entre la concentración de nutrimentos y el contenido relativo de clorofilas, así como este último con las variables de biomasa fresca y seca de las plántulas (Figura 4).

De acuerdo con Quintana-Blanco *et al.* (2017), ante un exceso de P, los contenidos de clorofila tienen a reducirse debido a la ocurrencia de un antagonismo con aniones como el NO_3^- , ya que la clorofila y capacidad fotosintética están relacionadas directamente con el contenido de P y de N en la planta (Singh y Reddy, 2015). Singh *et al.* (2017) sugieren que bajo deficiencia de P la disminución en el contenido de clorofilas se produce como un mecanismo para evitar el exceso de captación de luz, en pro de proteger el PSII del daño lumínico. Por otro lado, el P juega un papel importante en el flujo lineal de la cadena de electrones en el estroma mediante la actividad de la ATP

PSH	r	.903**							
	p	.000							
PFR	r	.481**	.568**						
	p	.002	.000						
PSR	r	.620**	.663**	.741**					
	p	.000	.000	.000					
SPAD	r	.520**	.575**	.634**	.608**				
	p	.001	.000	.000	.000				
DT	r	.466**	.490**	.426**	.486**	.612**			
	p	.002	.001	.006	.001	.000			
N	r	.524**	.427*	.331	.424*	.488*	.427*		
	p	.002	.015	.064	.016	.011	.015		
P	r	.510**	.462**	.463**	.406*	.553**	.460**	.296	
	p	.003	.008	.008	.049	.001	.008	.100	
K	r	.339	.401*	.343	.429*	.433*	.423*	.235	.512**
	p	.058	.023	.055	.014	.013	.016	.196	.003
VARIABLES		PFH	PSH	PFR	PSR	SPAD	DT	N	P

Figura 4. Matriz de correlaciones entre las variables evaluadas. PFH: Peso fresco de hojas; PSH: Peso seco de hojas; PFR: Peso fresco de raíz; PSR: Peso seco de raíz; SPAD; DT: Diámetro del tallo; N; P; K. *Relación significativa ($p \leq 0.05$); **Relación altamente significativa ($p \leq 0.01$); r: coeficiente de correlación de Pearson; p: valor de significancia.

sintasa (Carstensen *et al.*, 2018), por lo que dicho elemento es indispensable en el mecanismo fotosintético.

El incremento en los valores de SPAD se encuentra directamente relacionado con un aumento en los niveles de clorofilas (Uddling *et al.*, 2007). El mayor contenido de N en los tejidos explica la mayor producción de clorofilas por la función de dicho elemento como componente estructural de RuBisCO, la enzima más abundante en las hojas (Hawkesford *et al.*, 2012). Por otro lado, el N tienen alto sinergismo con la absorción de Mg, por lo que el aumento de este último también favorece el incremento de clorofilas debido a su importancia como componente central de dichas moléculas (Karthika *et al.*, 2018). Krouk y Kiba (2020) mencionan que las aplicaciones conjuntas de fertilizantes a base de N y P resultan más eficientes que aplicar dichos elementos de forma separada. En esta investigación, los fertilizantes MAP y comercial contenían niveles de N y P, lo cual explica los resultados encontrados.

Por otro lado, el SPAD resultó con relación positiva con la biomasa aérea, radical y con el diámetro del tallo, lo cual se explica debido a que un mayor contenido de clorofilas en las hojas incrementa la tasa fotosintética (Rai-Kalal y Jajoo, 2021), obteniendo como resultado un mayor crecimiento vegetativo. A su vez, la concentración foliar de N y P resultó relacionada con los niveles de SPAD, lo cual fue explicado en los resultados previamente presentados. Asimismo, el N y P fueron correlacionados positivamente con la mayoría de las variables estudiadas, lo cual es explicado debido a las funciones de dichos elementos en el metabolismo de las plantas.

CONCLUSIONES

La aplicación de distintas fuentes fertilizantes de P como pretratamientos de semillas y aplicaciones foliares favorecieron el crecimiento vegetativo de plántulas de tomate, así como un mayor contenido relativo de clorofila y las concentraciones foliares de N, P y K. En general, el fertilizante líquido comercial y el fosfato monoamónico aplicados vía foliar demostraron mayor eficiencia que el pretratamiento de semillas para aumentar las variables anteriormente mencionadas. Los resultados indican que es posible incrementar la calidad de las plántulas, lo que potencialmente favorecería un mayor éxito en el establecimiento de dicho cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Horticultura de la UAAAN por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este proyecto de investigación.

REFERENCIAS

- Abdel-Aziz HMM, Hasaneen MNA, Omer AM. 2019. Impact of engineered nanomaterials either alone or loaded with NPK on growth and productivity of French bean plants: Seed priming vs foliar application. *South African Journal of Botany* 125: 102–108. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.005>
- Alcántar-González G, Sandoval-Villa M. 1999. Manual de análisis químicos de tejidos vegetales, Publicación especial No. 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Chapingo, México.

- Alshaal T, El-Ramady H. 2017. Foliar application: from plant nutrition to biofortification. *Environment, Biodiversity and Soil Security* 1: 71-83. <https://dx.doi.org/10.21608/jen-vbs.2017.1089.1006>
- Bai J, Ye X, Jia J, Zhang G, Zhao Q, Cui B, Liu X. 2017. Phosphorus sorption-desorption and effects of temperature, pH and salinity on phosphorus sorption in marsh soils from coastal wetlands with different flooding conditions. *Chemosphere* 188: 677-688. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.117>
- Baig KK, Ara N, Ali S, Khan BP, Wahab A, Rabbani U. 2020. Effect of seed priming on bitter gourd with different sources of phosphorus at various soaking durations. *Pure and Applied Biology* 9(1): 80-90. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2020.90010>
- Bera A, Mukhopadhyay E, Kar CS, Kumar M, Bhandari HR. 2020. Efficacy of scarification treatments on release of seed coat imposed dormancy in five wild species of genus *Corchorus*. *South African Journal of Botany* 135: 144-147. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.040>
- Bremner, JM. 1965. Total nitrogen. *In: Methods for Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, Norman AG (Ed.); American Society of Agronomy Inc.: Madison, WI, USA, 1149-1178.
- Carstensen A, Herdean A, Birkelund S, Sharma A, Spetea C, Pribil M, Husted S. 2018. The impacts of phosphorus deficiency on the photosynthetic electron transport chain. *Plant Physiology* 117: 271-284. <https://dx.doi.org/10.1104/PP.17.01624>
- Fan X, Xu D, Wang D, Wang Y, Zhang X, Ye N. 2020. Nutrient uptake and transporter gene expression of ammonium, nitrate, and phosphorus in *Ulva linza*: adaption to variable concentrations and temperatures. *Journal of Applied Phycology* 32(2): 1311-1322. <https://dx.doi.org/10.1007/s10811-020-02050-2>
- González M, Ríos D, Peña-Rojas K, García E, Acevedo M, Cartes E, Sánchez-Olate M. 2020. Effect of phosphorous and calcium concentration on morpho-physiological attributes and root growth potential of *Aextoxicon punctatum* plants produced by covered root during hardening stage. *Bosque* 41(2): 137-146. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002020000200137>
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Skrumsager I, White P. 2012. Functions of macronutrients. *In: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (3rd edition), Marschner H (ed.), Academic Press: London, UK, 135-189. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6>
- Karthika KS, Rashmi I, Parvathi MS. 2018. Biological functions, uptake and transport of essential nutrients in relation to plant growth. *In: Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*, Hasanuzzaman M, Fujita M, Oku H, Nahar K, Hawrylak B (eds.), Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1-49. <https://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8>
- Khalil SK, Khan S, Rahman A, Khan AZ, Khalil IH, Wahab S, Mohammad F, Nigar S, Zubair M, Parveen S, Khan A. 2010. Seed priming and phosphorus application enhance phenology and dry matter production of wheat. *Pakistan Journal of Botany* 42(3): 1849-1856.
- Krouk G, Kiba T. 2020. Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: from agronomic to physiological and molecular insights. *Current Opinion in Plant Biology* 57: 104-109. <https://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2020.07.002>
- Lambers H, Plaxton WC. 2015. Phosphorus: Back to the Roots. *Annual Plant Reviews Online* 48: 3-22. <https://dx.doi.org/10.1002/9781119312994.apr0516>
- Li K, Xu C, Zhang K, Yang A, Zhang J. 2007. Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. *Proteomics* 7(9): 1501-1512. <https://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600960>
- Magalhaes F, Krogerus K, Castillo S, Ortiz-Julien A, Dequin S, Gibson B. 2017. Exploring the potential of *Saccharomyces eubayanus* as a parent for new interspecies hybrid strains in wine-making. *FEMS Yeast Research* 17(5): 1-10. <https://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fox049>
- Makela PSA, Wasonga DO, Hernández AS, Santanen A. 2020. Seedling growth and phosphorus uptake in response to different phosphorus sources. *Agronomy* 10(8): 80-90. <https://dx.doi.org/10.3390/agronomy10081089>
- Miraj G, Shah HU, Arif M. 2013. Priming maize (*Zea mays*) seed with phosphate solutions improves seedling growth and yield. *Journal of Animal and Plant Sciences* 23(3): 893-899.

- Mo Q, Li Z, Sayer EJ, Lambers H, Li Y, Zou B, Tang J, Heskell M, Ding Y, Wang F. 2019. Foliar phosphorus fractions reveal how tropical plants maintain photosynthetic rates despite low soil phosphorus availability. *Functional Ecology* 33(3): 503–513. <https://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.13252>
- Quintana-Blanco WA, Pinzón-Sandoval EH, Torres DF. 2017. Efecto de un fosfato térmico sobre el crecimiento y producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Ica cerinza. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 20(1): 51–59. <https://dx.doi.org/10.31910/rudca.v20.n1.2017.62>
- Rai-Kalal P, Jajoo A. 2021. Priming with zinc oxide nanoparticles improve germination and photosynthetic performance in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 160: 341–351. <https://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.032>
- Seyyedi SM, Khajeh-Hosseini M, Moghaddam PR, Shahandeh H. 2015. Effects of phosphorus and seed priming on seed vigor, fatty acids composition and heterotrophic seedling growth of black seed (*Nigella sativa* L.) grown in a calcareous soil. *Industrial Crops and Products* 74: 939–949. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.082>
- Shah AR, Ara N, Shafi G. 2011. Seed priming with phosphorus increased germination and yield of okra. *African Journal of Agricultural Research* 6(16): 3859–3876. <https://dx.doi.org/10.5897/AJAR11.564>
- Singh SK, Reddy VR. 2015. Response of carbon assimilation and chlorophyll fluorescence to soybean leaf phosphorus across CO₂: Alternative electron sink, nutrient efficiency and critical concentration. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 151: 276–284. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.021>
- Singh SK, Reddy VR, Fleisher DH, Timlin DJ. 2017. Relationship between photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in soybean under varying phosphorus nutrition at ambient and elevated CO₂. *Photosynthetica* 55(3): 421–433. <https://dx.doi.org/10.1007/s11099-016-0657-0>
- Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K, Pleijel H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91(1): 37–46. <https://dx.doi.org/10.1007/s11120-006-9077-5>
- Waqas M, Korres NE, Khan MD, Nizami AS, Deeba F, Ali I, Hussain H. 2019. Advances in the Concept and Methods of Seed Priming. *In: Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*, Hasanuzzaman M, Fotopoulos V (eds.), Springer, Singapore, 11–41. https://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_2
- White PJ, Hammond JP. 2008. Phosphorus Nutrition of Terrestrial Plants. *In: The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*, White PJ, Hammond JP (eds.), Springer Science, UK, 51–81.

Agrociencia

Agrociencia

Volumen 56, Número 6

16 de agosto - 30 de septiembre, 2022