

# Agrociencia

Volumen 54, Número 5

1 de julio - 15 de agosto, 2020



Dr. Jorge Vera Graziano  
Profesor Emérito del  
Colegio de Postgraduados



**SADER**

SECRETARÍA DE AGRICULTURA  
Y DESARROLLO RURAL

MÉXICO



## DIRECTORIO

---

### DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Sergio S. González Muñoz

### SUBDIRECTORA DE AGROCIENCIA

Ana Rita Román Jiménez

### CONSEJO EDITORIAL INTERNACIONAL

Roger Austin (**Inglaterra**)

José Sarukhán Kermez (**México**)

Barry C. Arnold (**EUA**)

### COMITÉ ASESOR EDITORIAL INTERNO

Jorge Alvarado López

Jorge D. Etchevers Barra

Víctor A. González Hernández

Leopoldo E. Mendoza Onofre

José A. Villaseñor Alva

### RESPONSABLES DE LA EDICIÓN

Sergio S. González Muñoz

Ana Rita Román Jiménez

### FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Brenda Espejel Lagunas

### APOYO

Belem M. Villegas Contreras

Yolanda Feroso Meraz

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, **Volumen 54, número 5, 1 de julio - 15 de agosto, 2020**, Agrociencia es una publicación sesquimensual editada por el Colegio de Postgraduados. Carretera México- Texcoco, Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP 56230. Tel. 5959284427. [www.colpos.mx](http://www.colpos.mx). Editor responsable: Dr. Sergio González Muñoz. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo en trámite. ISSN: 2521-9766, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Dr. Sergio González Muñoz. Fecha de última modificación, **15 de agosto de 2020**.

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

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

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

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

Oficinas Centrales:

#### DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Guerrero #9, Esquina Avenida Hidalgo.

56220. San Luis Huexotla. Texcoco, Estado de México

En el Colegio de Postgraduados

#### DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Ganadería

Campus Montecillo

Colegio de Postgraduados

56230, Montecillo, Estado de México.

Apartado Postal 56

56230, Suc. Chapingo, Estado de México

Teléfono: 595 92 84427

[agrociencia@colpos.mx](mailto:agrociencia@colpos.mx)

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

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

Portada: Jorge Vera Graziano

Profesor Investigador, CP



# SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA  
Y DESARROLLO RURAL

# CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 54

1 de julio - 15 de agosto, 2020

Número 5

## Agua-Suelo-Clima ⇌ Water-Soil-Climate

- ISÓTOPOS ESTABLES DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS PARA ESTIMAR LA REDISTRIBUCIÓN DEL SUELO POR EVENTOS EROSIVOS ⇌ COMPOUND-SPECIFIC STABLE ISOTOPES FOR THE ESTIMATION OF SOIL REDISTRIBUTION BY EROSION EVENTS  
 Marisol **Ayala-Zepeda**, Alondra M. **Díaz-Rodríguez**, Renan **Cardoso**, Marcelo **Costa Muniz**, Romina **Torres-Astorga**, Claudio **Bravo-Linares**, Roberto **Meigikos dos Anjos**, Hugo **Velasco**, Samuel **Tejeda-Vega**, Sergio **de los Santos-Villalobos** ..... 601

## Biocnología ⇌ Biotechnology

- AN ORGANOGENIC *in vitro* SYSTEM FOR THE CONSERVATION AND MASS PRODUCTION OF *Haworthia truncata* ⇌ UN SISTEMA ORGANOGENICO *in vitro* PARA LA CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN EN MASA DE *Haworthia truncata*  
 Estrella K. **Hernández-Vázquez**, Hye **Hyeong-Kim**, Gee **Young-Lee**, Youn **Hee-Kim**, María de la L. **Guerrero-González**, Jae **Hong-Lee**, Jae **Hong-Jung**, Pablo **Delgado-Sánchez** ..... 619

- EFEECTO DE LA RIZOBACTERIA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL *Azospirillum brasilense* SP245 EN LA FOSFOLIPASA D EN PLÁNTULAS DE TRIGO ⇌ EFFECT OF THE PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA *Azospirillum brasilense* SP245 ON THE PHOSPHOLIPASE D IN WHEAT SEEDLINGS  
 Roberto Daniel Iñaki **Durán-Baltazar**, Elda **Castro-Mercado**, Ernesto **García-Pineda** ..... 631

- IMPACT OF A SHIFT FROM CONVENTIONAL TO ORGANIC WHEAT FARMING ON SOIL CULTIVABLE FUNGAL COMMUNITIES IN THE YAQUI VALLEY, MEXICO ⇌ IMPACTO DEL CAMBIO EN EL MANEJO DEL CULTIVO DE TRIGO DE CONVENCIONAL A ORGÁNICO SOBRE LAS COMUNIDADES FÚNGICAS CULTIVABLES DEL SUELO EN EL VALLE DEL YAQUI, MÉXICO  
 Arlett Leticia **Ibarra-Villarreal**, Fannie Isela **Parra-Cota**, Enrico A. **Yépez**, Marco Antonio **Gutiérrez-Coronado**, Luis Carlos **Valdez-Torres**, Sergio **de los Santos-Villalobos** ..... 643

## Ciencia Animal ⇌ Animal Science

- EPIDEMIOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS EN TRES ÁREAS PRODUCTORAS DE OVINOS DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO ⇌ EPIDEMIOLOGY OF BRUCELOSIS IN THREE SHEEP PRODUCTION AREAS OF THE STATE OF VERACRUZ, MEXICO  
 Daniela Lucia **Román-Ramírez**, David Itzcoatl **Martínez-Herrera**, Álvaro Enrique de Jesús **Peniche-Cardena**, José Alfredo **Villagómez-Cortés**, Juan Felipe de Jesús **Torres-Acosta**, Ricardo **Flores-Castro** ..... 661

## Fitociencia ⇌ Crop Science

- CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE CAOBA (*Swietenia macrophylla* King) EN RESPUESTA A EXTRACTOS VEGETALES ⇌ GROWTH OF MAHOGANY SEEDLINGS (*Swietenia macrophylla* King) IN RESPONSE TO VEGETABLE EXTRACTS  
 Percy **Díaz-Chuquizuta**, Ofelia Andrea **Valdés-Rodríguez** ..... 673

- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DETERMINACIÓN DE MINERALES POR  $\mu$ -XRF EN FRUTO DE CALABAZA (*Cucurbita moschata* DUCH) ⇌ CHARACTERISTICS AND DETERMINATION OF MINERALS BY  $\mu$ -XRF IN SQUASH FRUIT (*Cucurbita moschata* DUCH)  
 Francisco Alberto **Chí-Sánchez**, Carlos Juan **Alvarado-López**, Jairo **Cristóbal-Alejo**, Arturo **Reyes-Ramírez** ..... 683

- PESO Y CARACTERES CUANTITATIVOS DE LA CALIDAD EN FRUTOS DE PLANTAS M<sub>1</sub> DE *Physalis peruviana* L. PROVENIENTES DE SEMILLAS IRRADIADAS CON <sup>60</sup>Co ⇌ WEIGHT AND QUANTITATIVE QUALITY CHARACTERS IN FRUITS OF M<sub>1</sub> PLANTS OF *Physalis peruviana* L. FROM SEEDS IRRADIATED WITH <sup>60</sup>Co  
 Oscar Martin **Antúnez-Ocampo**, Serafín **Cruz-Izquierdo**, Manuel **Sandoval-Villa**, Amalio **Santacruz-Varela**, Leopoldo E. **Mendoza-Onofre**, Aureliano **Peña-Lomelí**, Eulogio **De la Cruz-Torres** ..... 691

**Protección Vegetal ⇨⇩ Plant Protection**

RENDIMIENTO Y CALIDAD DE ÁCIDO CARMÍNICO DE *Dactylopius coccus* Costa EN DIFERENTES ALTURAS DE LA NOPALOTECA ⇨⇩ YIELD AND QUALITY OF CARMINIC ACID OF *Dactylopius coccus* Costa IN DIFFERENT HEIGHT LEVELS OF THE NOPALOTECA

José Rodolfo **Zacarías-Alvarado**, Clara Lourdes **Tovar-Robles**, Santiago de Jesús **Méndez-Gallegos**, Rafael **Magallanes-Quintanar**, Gildardo **Aquino-Pérez** ..... 705

OCCURRENCE OF ROOT-KNOT NEMATODE ON WINTER TOMATO AND ITS EFFECT ON YIELD UNDER SUBTROPICAL CLIMATE ⇨⇩ OCURRENCIA DEL NEMÁTODO AGALLADOR DE LA RAÍZ EN TOMATE INVERNAL Y SU EFECTO SOBRE EL RENDIMIENTO EN CLIMA SUBTROPICAL

Hai Yan **Wu**, Qiong **He**, Xun Bo **Zhou** ..... 717

# ISÓTOPOS ESTABLES DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS PARA ESTIMAR LA REDISTRIBUCIÓN DEL SUELO POR EVENTOS EROSIVOS

## COMPOUND-SPECIFIC STABLE ISOTOPES FOR THE ESTIMATION OF SOIL REDISTRIBUTION BY EROSIVE EVENTS

Marisol Ayala-Zepeda<sup>1</sup>, Alondra M. Díaz-Rodríguez<sup>1</sup>, Renan Cardoso<sup>2</sup>, Marcelo Costa Muniz<sup>2</sup>, Romina Torres-Astorga<sup>3</sup>, Claudio Bravo-Linares<sup>4</sup>, Roberto Meigikos dos Anjos<sup>2</sup>, Hugo Velasco<sup>3</sup>, Samuel Tejeda-Vega<sup>5</sup>, Sergio de los Santos-Villalobos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, México. (sergio.delossantos@itson.edu.mx). <sup>2</sup>Universidade Federal Fluminense, Instituto de Física, Brasil. <sup>3</sup>Grupo de Estudios Ambientales, Instituto de Matemática Aplicada San Luis. Universidad Nacional de San Luis / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina. <sup>4</sup>Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Químicas, Chile. <sup>5</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México.

### RESUMEN

La diversidad biológica en el suelo es amplia y su función ecológica es necesaria para los servicios ecosistémicos que éste provee. Diversas actividades antropogénicas contribuyen a la pérdida de la fertilidad de este recurso y aceleran su erosión. Debido al movimiento del suelo, partículas contaminantes pueden arrastrarse hasta los sitios de depósito (mezclas), lo cual genera consecuencias ambientales y socio-económicas asociadas a la acumulación de los sedimentos. El conocimiento de las fuentes de erosión y sitios de depósito coadyuvará a la toma de medidas para la conservación de los suelos. El objetivo del presente ensayo fue analizar críticamente el estado del conocimiento de la técnica Isótopos Estables de Compuestos Específicos (CSSI, por sus siglas en inglés), sus fundamentos y la comparación con otras tecnologías. Así, en este manuscrito se discute desde el estado actual de los estudios de la erosión y depósito del suelo hasta su aplicación para la identificación del origen de los suelos depositados en determinados sitios, a través del análisis de la huella isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de los ácidos grasos de cadena muy larga (22 átomos de carbono o más), idealmente, de la vegetación y el suelo donde crece. Finalmente, se analizan los modelos de mezcla empleados para determinar las proporciones de suelo de cada una de las fuentes en el sitio de depósito, así como un conjunto de otras técnicas cuantitativas. Los autores esperan que este manuscrito contribuya al entendimiento de la problemática actual de la redistribución del suelo debido a la erosión, así como el fundamento, función y

### ABSTRACT

Soil biodiversity is wide and its ecological function is necessary for the ecosystem services it provides. Several anthropogenic activities contribute to the loss of this resource's fertility and speed up its erosion. As a consequence of ground movement, polluting particles are dragged to sites of deposition (mixtures), generating environmental and socio-economic consequences associated with sediment accumulation. Being aware of erosion sources and sites of deposition will contribute to take appropriate soil conservation measures. The objective of this essay was to carry out a critical analysis of the current knowledge about the compound-specific stable isotopes (CSSI) technique, its basis, and how they compare with other technologies. Therefore, this essay includes the current state of soil erosion and deposition studies, as well as their application to the identification of deposition soils in certain sites, analyzing the isotopic signature ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of very long-chain fatty acids (22 or more carbon atoms). These fatty acids ideally come from the vegetation and the soil in which it grows. Finally, the mixture models used—as well as a set of other quantitative techniques—were analyzed to determine the soil ratio of each source from the deposition zone. The authors hope that this text will contribute to the understanding of the current soil redistribution problem resulting from erosion, as well as of the basis, function, and application of the CSSI technique for the identification of erosion sources, thus helping to prevent this problem through the appropriate implementation of soil conservation measures.

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2019. Aprobado: octubre, 2019.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 54: 601-618. 2020.

**Key words:** CSSI, stable isotopes of carbon, soil erosion, soil sources, isotopic signature.

aplicación de la técnica de CSSI para la identificación de las fuentes de erosión, y ayudar así a la prevención de este problema con la toma de medidas de conservación del suelo.

**Palabras clave:** CSSI, isótopos estables del carbono, erosión del suelo, fuentes de erosión, huella isotópica.

## INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la fertilidad de los suelos es indispensable para optimizar los servicios que brindan, como el ciclaje de nutrientes, el soporte a la vegetación y la seguridad alimentaria de la población creciente. Un problema que pone en riesgo la fertilidad de estos recursos es la erosión edáfica. Diversas tecnologías se emplean en el estudio de las causas y consecuencias de la erosión del suelo a diferentes escalas geográficas y temporales. Una de ellas es la técnica Isótopos Estables de Compuestos Específicos (CSSI, por sus siglas en inglés), la cual representa una herramienta para identificar las principales fuentes de erosión y los sitios de depósito en una cuenca hidrológica. Esta técnica contribuye al establecimiento de medidas de conservación del suelo para evitar que la degradación de los recursos naturales aumente (Gibbs, 2014).

Este ensayo tiene el objetivo de desarrollar un análisis crítico de la técnica de CSSI, sus fundamentos y ventajas en comparación con otras tecnologías. Aquí se detallan los conceptos básicos que se deben tomar en cuenta para entender la importancia del suelo y la problemática que representa su erosión. Además, se analiza la aplicación de la técnica de CSSI en diversos estudios realizados en América Latina y El Caribe, desde que la técnica empezó a emplearse en esta región, en 2014. Los autores esperan que este ensayo sirva como base para el entendimiento de esta técnica isotópica en el idioma español. Así, su uso pueda aplicarse en la investigación y coadyuve a concretar medidas efectivas para la conservación de ecosistemas, a diferentes escalas geográficas.

El suelo es la capa de mineral no consolidado y material orgánico en la superficie terrestre —usualmente contiene sólidos, líquidos, gases y biota—, y está afectado por los procesos físicos, químicos y biológicos (SSSA, 2018). A pesar de su importancia para los servicios ecosistémicos y la vida del ser humano, este recurso natural no suele valorarse (Bertsch y Henríquez, 2015). Sin embargo, el suelo es esencial

## INTRODUCTION

Maintaining soil fertility is essential to optimize the services they provide —such as nutrient cycling, vegetation support, and food security for the growing population. Soil erosion is one of the problems that puts the fertility of these resources at risk. Several technologies are used to study the causes and consequences of soil erosion, at different geographic and temporal scales. One of them is the compound-specific stable isotopes (CSSI) technique, a tool that is used to identify main erosion sources and deposition zones in a water basin. This technique contributes to the establishment of soil conservation measures that prevent the increase of the deterioration of natural resources (Gibbs, 2014).

The objective of this essay is to carry out a critical analysis of the CSSI technique, its basis, and advantages compared to other technologies. This study details the basic concepts that must be taken into account to understand the importance of soil and the problems entailed by its erosion. Besides, our team analyzed the application of the CSSI technique since 2014, when the technique was first used in several studies performed in Latin America and the Caribbean. The authors hope that this essay will help to understand this isotopic technique in Spanish-speaking countries. Subsequently, this technique could be applied in researches and help to carry out effective measures to preserve ecosystems, at different geographic scales.

Soil is the layer of unconsolidated mineral and organic material found in the earth's surface; it contains solids, liquids, gases, and biota; and it is affected by physical, chemical, and biological processes (SSSA, 2018). Despite its importance for the ecosystem services and human life, this natural resource is not usually appreciated (Bertsch and Henríquez, 2015). However, soil is essential for the regulation of mass and energy fluxes and their transference between the atmosphere, the biosphere, the hydrosphere, and the lithosphere. Besides, soil helps to regulate the physical processes of the Earth (water and energy balance) and acts as the engine for several biogeochemical cycles on which life depends. Soil is also an important carbon reservoir: it has a higher content of this element than the combination of Earth's atmosphere and vegetation (FAO and ITPS, 2015).

en la regulación del flujo y transferencia de masa y energía entre la atmósfera, la biósfera, la hidrósfera y la litósfera. Además, el suelo ayuda en la regulación de los procesos físicos de la Tierra (balances de agua y energía), y actúa como motor de diversos ciclos bio-geoquímicos de los cuales depende la vida. El suelo también es un reservorio importante de carbono debido a que contiene una mayor cantidad de este elemento en comparación con la atmósfera y la vegetación terrestre, en combinación (FAO e ITPS, 2015).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) afirma que “no hay ningún lugar de la naturaleza con una mayor concentración de especies que los suelos”, ya que “albergan la cuarta parte de la biodiversidad de nuestro planeta” (FAO, 2015). Entre estos organismos destacan: bacterias, hongos, protozoarios, nemátodos, ácaros, termitas y lombrices, los cuales son los principales agentes en el ciclaje de nutrientes, la regulación de las dinámicas de la materia orgánica, el secuestro de carbono, y las emisiones de gases efecto invernadero (FAO, 2019).

Entre las funciones más importantes del suelo destaca el sostén y el suplemento de agua y nutrientes para la producción de cultivos agrícolas, que son fuente de alimentos y biocombustibles (Bertsch y Henríquez, 2015), cuya demanda se espera aumente en los próximos años como consecuencia del incremento acelerado de la población. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas está previsto que la población mundial aumente en más de mil millones de personas en los próximos 15 años, por lo que se alcanzarían los 8500 millones en 2030, 9700 millones en 2050 y 11200 millones en 2100 (ONU, 2019). Sin embargo, algunas actividades naturales y antropogénicas contribuyen —en cierto grado— a la pérdida de la fertilidad de este recurso, lo cual afecta el abastecimiento de energía y alimento. Entre ellas destacan las malas prácticas agrícolas (*e.g.* el monocultivo, la aplicación excesiva de agroquímicos, y la quema de residuos de las cosechas), el sobrepastoreo y la deforestación.

### Consecuencias de la erosión

Un concepto fundamental para comprender la degradación del suelo es la erosión, la cual se define como el proceso físico que consiste en el desprendimiento y arrastre de los materiales contenidos en él

The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) affirms that “soil is one of nature’s most complex ecosystems and one of the most diverse habitats on Earth: it contains a myriad of different organisms, which interact and contribute to the global cycles that make all life possible” and “soils host a quarter of our planet’s biodiversity” (FAO, 2015). These organisms include: bacteria, fungi, protozoa, nematode, mites, termites, and earthworms, which are the main agents of the nutrient cycling, the regulation of organic matter dynamics, carbon sequestration, and greenhouse gases (FAO, 2019).

Supporting and providing water and nutriment for crop production —which is the source of food and biofuel— is one of the most important functions of the soil (Bertsch and Henríquez, 2015). The demand for these crops is expected to increase during the following years, as a consequence of the rapid population growth. According to United Nations, the world population will increase by one thousand million during the next 15 years, reaching 8500 million, 9700 million and 11200 million in 2030, 2050, and 2100, respectively (ONU, 2019). However, some natural and anthropogenic activities, to a certain degree, contribute to this resource’s loss of fertility, which affects energy and food supplies. Bad agricultural practices (*e.g.*, monoculture, excessive use of agrochemicals, and burning harvest waste), overgrazing, and deforestation stand out among them.

### Consequences of erosion

Erosion is a fundamental concept to understand soil degradation: it is a physical process through which soil materials are loosened and carried away by the action of the wind and water, as well as geological processes (SEMARNAT, 2012). Soil erosion redistributes the soil and the organic matter that make up the soil (McCorkle *et al.*, 2016). These erosive processes intensify as a result of anthropogenic causes and result in a major problem, both at the sites where they originate and at the deposition zone to which the soil arrives.

*In situ* consequences are: 1) the loss of the topsoil; 2) a lower water retention capacity; and 3) the decrease of organic matter, nutrients, microbial resources, and fertility, which leads to their degradation. As a result,

por la acción del viento, agua y procesos geológicos (SEMARNAT, 2012). A través de la erosión edáfica se redistribuye continuamente el suelo y la materia orgánica que lo conforma. Sin embargo, a pesar de su importancia, pocos estudios evalúan las fuentes de carbono que se derivan de la erosión (McCorkle *et al.*, 2016). Estos procesos erosivos se intensifican por causas antropogénicas y contribuyen a un serio problema, tanto para los sitios donde se origina como para los lugares de destino donde este suelo se deposita.

Las consecuencias *in situ* de la erosión son: 1) la pérdida de la capa arable del suelo, 2) una menor capacidad de retención del agua, 3) la disminución del contenido de materia orgánica, nutrientes, recurso microbiano y la fertilidad de los mismos; lo cual conduce a su degradación. Por estas razones, la erosión es la causa principal que contribuye a la degradación edáfica en todo el mundo. Esto cerca de 1900 millones ha (aproximadamente dos tercios de este recurso en el mundo), y representa una pérdida de 75 000 millones t de suelo fértil al año (IAEA, 2015). El efecto neto de los eventos erosivos es la pérdida de la productividad, la cual restringe lo que puede cultivarse, y resulta en una demanda mayor de fertilizantes o el abandono de estos suelos. Lo anterior ocasiona consecuencias negativas para la producción de alimentos, la seguridad alimentaria, y una disminución substancial del valor de la tierra (Morgan, 2005).

Además, debido a que el arrastre de las partículas sucede sin discriminación, durante los procesos erosivos se movilizan diversos agentes contaminantes que se encuentran en los sitios donde ocurre dicho movimiento, tales como: fertilizantes, plaguicidas, metales pesados y desechos orgánicos. Éstos afectan directamente a las zonas de depósito, ya sean cuerpos de agua o suelos ladera abajo. Así, las consecuencias ambientales y socioeconómicas que se asocian a la acumulación de los suelos de depósito *ex situ* son la reducción de la capacidad de almacenamiento de ríos, lagunas y presas, que disminuyen la vida útil de éstas. Lo anterior se debe al proceso de eutrofización, y a la modificación del cauce natural del agua y del hábitat de seres vivos, entre otras razones.

### La estimación del movimiento del suelo

La cuantificación de la tasa de erosión y depósito de suelo en un sitio específico no es suficiente para

erosion is the main cause that contributes to edaphic deterioration in the world. This phenomenon affects about 1900 million ha (approximately two thirds of this resource in the world) and represents a 75 000 million t loss of fertile soil per year (IAEA, 2015). The net effect of erosive events is the loss of productivity, which restricts what can be grown and results in a higher demand for fertilizers or the abandonment of those soils. This has negative consequences for food production and food security, along with a substantial decrease in land value (Morgan, 2005).

Additionally, since the entrainment of particles is an indiscriminate phenomenon, erosive processes release various pollutant agents —such as fertilizers, insecticides, heavy metals, and organic waste— that can be found in the sites where those movements take place. These agents directly affect the deposition zones (both water bodies or downhill soils). Therefore, the environmental and socioeconomical consequences associated with the accumulation of *ex situ* soil deposition are the reduction of the storage capacity of rivers, pools, and dams, which diminishes their lifespan. These are some of the consequences of the eutrophication process and the modification of the natural course of water and the habitat of living beings.

### Soil movement estimation

The quantification of the erosion and soil deposition rate of a specific site is not enough to carry out actions that preserve this natural resource and mitigate the negative effects on the ecosystem caused by their movement. Therefore, it is important to find out which are the main sediment sources that contribute or have an impact on the final deposition zone (Gibbs, 2014).

Current techniques can estimate or predict soil movement using models based on such variables as torrents, rainfalls, erodibility factor, type of land use, topography, and weather. The Revised Universal Soil Loss Equation 10.6 and 2 (RUSLE1.06 and RUSLE2) stands out among those variables. These prediction technologies are frequently used to estimate erosion rates that cause rainfalls and their associated flux. These equations were mainly developed by the Agricultural Research Service (ARS) and the Natural Resource Conservation Service (NRCS) —both part of the United States

tomar acción dirigida a la conservación de este recurso natural, y la mitigación de los efectos negativos al ecosistema por su desplazamiento. Por lo tanto, es necesario conocer las principales fuentes de sedimentos que contribuyen o impactan al sitio del depósito final (Gibbs, 2014).

Las técnicas actuales permiten estimar o predecir el movimiento del suelo mediante el uso de modelos basados en variables, como escorrentía, precipitaciones, factor de erosionabilidad, tipo de uso del suelo, topografía, y clima. Entre ellas destaca la Ecuación Universal de Pérdida de Suelo Revisada 1.06 y 2 (RUSLE1.06 y RUSLE2, siglas en inglés de 'Revised Universal Soil Loss Equation', versiones 1.06 y 2). Estas tecnologías de predicción se usan con frecuencia para estimar tasas de erosión que causan las precipitaciones y su flujo asociado. Estas ecuaciones se desarrollaron principalmente por el Servicio de Investigación Agrícola (ARS, por sus siglas en inglés) y el Servicio de Conservación de Recursos Naturales (NRCS, por sus siglas en inglés), ambos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), así como la Universidad de Tennessee, entre otras instituciones de prestigio (USDA, 2016). Otro método utilizado es la medición directa; por ejemplo, el uso de bolsas de malla que se colocan sobre la superficie del suelo, y permite conocer su depósito o pérdida en los sitios de estudio después de uno o varios eventos erosivos (Hsieh *et al.*, 2009). Además, la química de los sedimentos también se utiliza en la determinación de sus orígenes. Esta técnica consiste en el análisis de disoluciones de hierro, fósforo, carbono, nitrógeno y manganeso de un suelo, y de muestras de sedimento suspendido, a través de un modelo de mezcla simple (Rhoton *et al.*, 2008). La susceptibilidad magnética de los suelos también permite identificar y cuantificar sus minerales (Bautista *et al.*, 2014), y relacionarlos con los eventos erosivos, lo cual permite delimitar las zonas afectadas por sedimentos contaminados con elementos de naturaleza tóxica como el arsénico, cadmio y plomo (Pérez-Martínez y Romero, 2015). Un enfoque adicional, es el empleo de la mineralogía del sedimento suspendido; sin embargo, esta metodología puede ocasionar problemas al emplearla de forma aislada, porque las arcillas son las partículas que principalmente se transportan de la superficie del suelo en erosión (Rhoton *et al.*, 2008).

Las técnicas ya mencionadas presentan limitaciones para la estimación del movimiento del suelo

Department of Agriculture (USDA)—, as well as the University of Tennessee, among other top academic institutions (USDA, 2016). Another method used is direct measurement: for example, placing mesh bags on the soil surface to find out the deposition or loss of the study sites, after one or several erosive events (Hsieh *et al.*, 2009). Additionally, sediment chemistry is also used to determine their origins. This technique analyzes iron, phosphorus, carbon, nitrogen, and manganese solutions from a given soil, as well as suspended sediment samples, using a simple mixture model (Rhoton *et al.*, 2008). The magnetic susceptibility of soil is another technique that identifies and quantifies minerals (Bautista *et al.*, 2014) and connects them with erosive events, thus delimiting the zones that have been affected by sediments polluted with toxic elements, such as arsenic, cadmium, and lead (Pérez-Martínez and Romero, 2015). An additional approach is suspended sediment mineralogy; however, this methodology can cause problems if used in isolation, because clay are the main particles that are removed from the surface of the eroded soil (Rhoton *et al.*, 2008).

As a result of the lack of historic field data and information, the use of the above-mentioned techniques to estimate soil movement at large scale faces limitations when the differences among potential erosion sources need to be established. Geographic information systems (GIS) is a technology that — through the processing of georeferencing information obtained from satellite imagery— allows the analysis of soil variations during various periods (days to years), depending on the satellite. The National Institute of Statistics and Geography (INEGI) defines GISs as: “a set of tools designed to obtain, store, recover, and display spatial data from the real world”. This technique allows researchers to evaluate large-scale temporary and spatial erosion and to implement models; however, one of its disadvantages is its inaccuracy (INEGI, 2014).

### Isotopic techniques

The use of isotope-based techniques has been explored to study soil movement caused by erosive events. Isotopes are atoms with the same number of protons, but with different number of neutrons in their nucleus; therefore, their mass is different (Kendall and Caldwell, 2012). This difference does not affect the chemical properties of the element

a grandes escalas, debido a la falta de datos históricos en campo e información para distinguir entre las potenciales fuentes de erosión. De esta manera, los sistemas de información geográfica (SIG) son una tecnología que, a través del procesamiento de información georreferenciada obtenida de imágenes satelitales, permite analizar las variaciones del suelo en periodos que comprenden desde días hasta años (según el satélite). El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) define a los SIG como: “un conjunto de herramientas diseñadas para obtener, almacenar, recuperar y desplegar datos espaciales del mundo real”. Estos permiten evaluar la erosión a escalas temporales y espaciales amplias e implementar modelos, pero una de sus desventajas es su inexactitud (INEGI, 2014).

### Las técnicas isotópicas

Para el estudio del movimiento del suelo por eventos erosivos se explora el uso de técnicas basadas en isótopos, los cuales son átomos con el mismo número de protones pero difieren en la cantidad de neutrones en su núcleo, por lo cual tienen masa desigual (Kendall y Caldwell, 2012). Esto no afecta las propiedades químicas del elemento y sus compuestos, pero sí causa sutiles diferencias físicas que dan como resultado el fraccionamiento isotópico (Sharp, 2017). En la naturaleza existen isótopos radiactivos e isótopos estables. Los primeros decaen espontáneamente, y emiten partículas alfa, beta o gamma, es decir, se transforman en otro elemento estable si el decaimiento radioactivo se detiene, o inestable si el decaimiento continúa hasta alcanzar un estado estable (Lewin y Goldstein, 2011), *e.g.* el decaimiento beta del  $^{14}\text{C}$ , que decae a su forma estable como  $^{14}\text{N}$  (Raven, 2002). Los isótopos estables no decaen a otro núclido y permanecen con sus características naturales (*e.g.*  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$ ).

Una técnica con relevancia en el estudio de la erosión del suelo es la FRN, siglas en inglés de radionúclidos de depósito atmosférico (‘fallout radionuclides’), los cuales se utilizan para estimar las tasas de erosión o sedimentación de suelo. Los FRN con mayor uso como trazadores del movimiento del suelo son :1) el  $^{137}\text{Cs}$ , cuyo origen data de las pruebas de armas termonucleares en las décadas de 1950 a 1960, y es el más usado para la evaluación de la erosión del suelo a mediano plazo (50 años); 2) el

and its compounds, but it does cause subtle physical differences that result in isotopic fractionation (Sharp, 2017). Radioactive and stable isotopes can be found in nature. The former spontaneously decay and emit alpha, beta, or gamma particles: *i.e.*, they turn into another stable element—if the radioactive decay stops—or unstable element—if the decay continues until it reaches a stable state (Lewin and Goldstein, 2011). For example, the beta decay  $^{14}\text{C}$  stabilizes as  $^{14}\text{N}$  (Raven, 2002). Stable isotopes do not decay into another nuclide and keep their natural characteristics (*v.gr.*,  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$ ).

Another outstanding technique used to study soil erosion is the Fallout Radionuclides (FRN) technique, which estimates the erosion or sedimentation rates of the soil. The most frequently FRNs used to trace the movement of soil are: 1)  $^{137}\text{Cs}$ , whose origin dates back to the thermonuclear weapons tests of the 1950s and 1960s and is used to evaluate medium-term soil erosion (50 years); 2)  $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ , which has a geogenic origin and is used in long-term soil and sediment redistribution studies (100 years); 3)  $^7\text{Be}$ , which has a cosmogenic origin and is used as a short-term tracer (1 day to a maximum of three months) (Mabit *et al.*, 2014). Some of the many outstanding advantages of the use of these radioactive isotopes include: they can be found in the environment of the whole world; they are easily measured; their erosion estimations are retrospective; and they can be obtained in a single visit to the study site, during a very relative short process (Mabit *et al.*, 2014). However, these techniques provide scarce information about the origin of the sediments that are deposited on the study soils, which is vitally important for the design of efficient soil conservation strategies.

### Compound-specific stable isotopes (CSSI)

Stable isotopes also have potentiality as a natural tracer of the organic matter origin. Its usefulness is based on the potential differences of the isotopic signatures between several soil erosion sources. Additionally, these signatures are relatively well preserved during the mineralization, transport, and sedimentation of the soil (Bouillon *et al.*, 2011).

Gibbs (2008) developed the CSSI technique to identify the origin of soils in deposition zones, to determine the erosion source, and to establish several conservation measures. These techniques use stable

$^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$  de origen geogénico usado en estudios de redistribución del suelo y sedimento a largo plazo (100 años); y 3) el  $^7\text{Be}$ , de origen cosmogénico y se utiliza como trazador para corto plazo (días a máximo tres meses) (Mabit *et al.*, 2014). Las ventajas del uso de estos isótopos radiactivos son muy variadas, entre las cuales destacan su presencia en el ambiente de todo el mundo, se miden con facilidad, sus estimaciones de erosión son retrospectivas y se pueden obtener en una sola visita al sitio de estudio, y en un periodo relativamente corto (Mabit *et al.*, 2014). Sin embargo, estas técnicas aportan información escasa del origen de los sedimentos que se depositan en los sitios de estudio, lo cual es de vital importancia para diseñar estrategias eficientes de conservación de suelo.

### Isótopos estables de compuestos específicos (CSSI)

Los isótopos estables también ofrecen posibilidades como trazadores naturales del origen de la materia orgánica. Su utilidad se basa en las potenciales diferencias en las huellas isotópicas entre varias fuentes de erosión del suelo y, además, estas huellas son relativamente bien preservadas durante la mineralización, transporte y sedimentación del suelo (Bouillon *et al.*, 2011).

Gibbs (2008) desarrolló la técnica de CSSI para identificar el origen de los suelos en sitios de depósito, determina las fuentes de erosión y permite el establecimiento de diversas medidas de conservación. Los isótopos estables utilizados en esta técnica corresponden al Carbono, es decir,  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$ . Los compuestos de interés son los ácidos grasos (AG), idealmente, aquellos de cadenas larga, de 22 carbonos o más. El neutrón extra del  $^{13}\text{C}$  lo hace más pesado y lento que el  $^{12}\text{C}$ , por lo cual, al atravesar una pared o compartimiento celular se obtiene ligeramente más  $^{13}\text{C}$  en el lado inicial, y ligeramente más  $^{12}\text{C}$  al llegar al otro. Este proceso se conoce como fraccionamiento isotópico (Gibbs, 2014). Así, las concentraciones de  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$  debido al fraccionamiento serán diferentes en 1 parte por 1000 (1‰), por cada evento de fraccionamiento o paso trófico. De esta manera, el contenido de  $^{13}\text{C}$  inicial es isotópicamente enriquecido en 1‰, mientras que el contenido de este isótopo en el destino se reduce isotópicamente en 1‰, lo cual se expresa en términos del isótopo pesado (Gibbs, 2014). Para facilitar la interpretación de esta diferencia de

isotopes of carbon: *i.e.*,  $^{13}\text{C}$  and  $^{12}\text{C}$ . The compounds of interest are fatty acids (FAs) —ideally, long-chain FAs, of 22 or more carbons. The extra neutron of  $^{13}\text{C}$  makes it heavier and slower than  $^{12}\text{C}$ ; therefore, when it goes through a cell wall or compartment, slightly more  $^{13}\text{C}$  is obtained on the initial side and slightly more  $^{12}\text{C}$  when it reaches the other side. This process is known as isotopic fractionation (Gibbs, 2014). Therefore, the  $^{13}\text{C}$  and  $^{12}\text{C}$  concentrations during fractionation will be different in 1 part per 1000 (1‰) per each fractionation event or trophic step. This way, the initial  $^{13}\text{C}$  content is isotopically enriched by 1‰, while the content of this isotope at the destination is isotopically diminished by 1‰, which is expressed as a heavy isotope (Gibbs, 2014). To facilitate the interpretation of this difference, this concentration is compared using an international standard, which has a known and unchanging proportion from  $^{13}\text{C}$  to  $^{12}\text{C}$ . This standard is a limestone known as Pee Dee Belemnite (PDB) from South Carolina (NOAA, 2019); although the original PDB specimen has already ran out for this use, other standards were calibrated to the same ratio (*v.gr.*, VPDB (Vienna PDB)). The isotopic difference between heavy and light isotopes can be expressed in delta notation ( $\delta$ ). The  $\delta$  value is calculated using the following equation:

$$\delta^{13}\text{C} = 1000 \cdot \left( \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} - 1 \right) \text{‰} \quad (1)$$

where:

$R$  is the molar ratio of the heavy *vs* the light isotope ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and the standard is the VPDB ( $R$  of 0.01118‰). The  $\delta^{13}\text{C}$  value of a sample is known as isotopic signature and it is expressed in units per thousands (‰).

The CSSI technique is based on the typical definition of land use as the plant community that grows in that space. Plants produce a variety of organic compounds that can be incorporated into the soil as biomarkers of that vegetation; therefore, the organic compounds produced by every plant must be strongly linked to soil particles and must be able to distinguish different species or vegetal communities. The chosen biomarkers are common fatty acids (FAs) (Gibbs *et al.*, 2015); all plants produce the same fatty

concentración se compara con un estándar internacional, el cual tiene una proporción conocida e inmutable de  $^{13}\text{C}$  a  $^{12}\text{C}$ . Este estándar es una caliza llama Pee Dee Belemnite (PDB) de Carolina del Sur (NOAA, 2019), y aunque el espécimen original de PDB ya se agotó para este uso, otros estándares se calibraron a la misma relación, *e.g.* uno conocido como VPDB (Vienna PDB). La diferencia isotópica entre el isótopo pesado y ligero se expresa en notación delta ( $\delta$ ). El valor  $\delta$  se calcula con la siguiente ecuación:

$$\delta^{13}\text{C} = 1000 \cdot \left( \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} - 1 \right) \text{‰} \quad (1)$$

donde:

$R$  es la relación molar del isótopo pesado *vs.* el ligero ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) y el estándar es la VPDB ( $R$  de 0.01118‰). Al valor  $\delta^{13}\text{C}$  de una muestra se le denomina huella isotópica y se expresa en unidades por mil (‰).

La técnica de CSSI se basa en que el uso del suelo típicamente se define por la comunidad de plantas que crecen en ese espacio. Las plantas producen una variedad de compuestos orgánicos que pueden unirse al suelo como biomarcadores de esa vegetación, por lo cual, dichos compuestos orgánicos producidos por todas las plantas deben estar fuertemente ligados a las partículas del suelo, y ser capaces de distinguir diferentes especies o comunidades vegetales. Los biomarcadores de elección son los AG comunes (Gibbs *et al.*, 2015), todas las plantas producen los mismos ácidos grasos, pero con una huella isotópica diferente. Al inicio, se sugirió el uso de los AG de cadena larga, de 14 a 24 átomos de carbono, de número par (*e.g.* ácido mirístico  $\text{C}_{14}$ , ácido palmítico  $\text{C}_{16}$ , ácido esteárico  $\text{C}_{18}$ ). Sin embargo, Reiffarth *et al.* (2016), después de un análisis basado en información disponible en la literatura, sugirieron utilizar como biomarcadores los AG saturados de cadena muy larga. Éstos contienen 22 carbonos o más en cada cadena y son principalmente de origen vegetal. Además, se sugirió evitar el uso de los AG saturados ubicuos ( $\text{C}_{16}$  y  $\text{C}_{18}$ ), y seleccionar los AG saturados debido a que los insaturados pueden atravesar procesos de transformación ocasionados por su grado de insaturación, como la auto-oxidación.

Al ocurrir los eventos erosivos, los suelos marcados con la huella isotópica de los AG provenientes de

ácidos, but with different isotopic signatures. At the beginning, the use of even-numbered long chain fatty acids (14 to 24 carbon atoms) was suggested—such as myristic acid  $\text{C}_{14}$ , palmitic acid  $\text{C}_{16}$ , and stearic acid  $\text{C}_{18}$ . However, having analyzed the information available on the literature, Reiffarth *et al.* (2016) suggested using very long-chain saturated fatty acid as biomarkers. They have 22 carbons or more in each chain and mainly have a vegetal origin. Additionally, avoiding the use of ubiquitous saturated fatty acids ( $\text{C}_{16}$  and  $\text{C}_{18}$ ) and choosing the saturated FAs was suggested: unsaturated fatty acid can undergo transformation processes as a result of their unsaturation degree (for example, auto-oxidation).

When erosive events take place, soils marked with the isotopic signature of FAs from their specific vegetation become mixed and reach the deposition zones. This is why land uses that undergo an erosion are called “sources”, while deposition zones are called “mixtures”. The latter’s soil is studied to trace the contribution of each source, analyzing the CSSI values in a mixing model.

This technique requires specific considerations to maximize its sensibility, ranging from safety and hygiene measures, sample collection, transport, and protection to lab analysis. Some of these considerations include: 1) using gloves; 2) labelling each sample in detail; and 3) transporting the sample in a cold and dark container, in order to reduce the microorganism action that could alter the results of the isotopic ratio.

Additionally, enough information of the study site is required (*v.gr.*, elevation maps, land topography, land types and uses, geographic location, and information directly obtained from local producers, inhabitants or both) to justify the selection of the sample places and their duly classification into mixtures and sources (Figure 1).

The CMO, %MO, %C, AG, and EMAGs acronyms mean organic matter content (OMC), organic matter percentage (%OM), carbon percentage (%C), fatty acids (FAs), and fatty acid methyl esters (FAMEs), respectively.

Planning is the first step of the CSSI technique; during this stage a list of the sites to be analyzed is developed and mixtures and possible sources are differentiated. Once the sites are located, the protocol suggested by Gibbs (2014) must be

su vegetación específica, se mezclan y llegan hasta los sitios de depósito. Por esta razón, los usos de suelo que sufren erosión se llaman “fuentes”, y a los sitios de depósito se los denomina “mezcla”. El suelo de estas últimas se estudia para rastrear las contribuciones de cada fuente, a través del análisis de los valores de CSSI en un modelo de mezcla.

Esta técnica requiere consideraciones específicas para maximizar su sensibilidad, las cuales incluyen desde medidas seguridad e higiene, recolección de muestras, transporte y resguardo, hasta el análisis en laboratorio. Algunas de estas consideraciones son: 1) el uso de guantes, 2) etiquetar con detalle cada muestra, y 3) transportarlas en frío y oscuridad, para reducir la acción de microorganismos que pudiera alterar el resultado de relación isotópica.

Además es necesario tener información suficiente del sitio de estudio (*e.g.* mapas de elevación, topografía del terreno, tipos y usos de suelo, su ubicación geográfica e información que se obtenga directamente de los productores o habitantes de la zona o ambos) que justifique la selección de los lugares a muestrear y su debida clasificación en mezclas y fuentes (Figura 1).

Las siglas CMO, %MO, %C, AG, EMAGs corresponden a contenido de materia orgánica, porcentaje de materia orgánica, porcentaje de carbono, ácidos grasos, y ésteres metílicos de los ácidos grasos, respectivamente.

followed. Ten samples must be taken in a grid pattern—at a depth of 2 cm and 5 m apart from each other—and homogenized in a container to obtain a representative sample of each source or mixture. Rocks, sticks, insects, or vegetal material should be removed. Subsequently, the samples must be freeze-dried (lyophilization) in an oven at 60 °C, until they reach a constant weight; a quality guarantee sample can be added at this point (*e.g.*, an aliquot of the soil that is already analyzed). Afterwards, the sample must be heated at 450 °C to measure the organic carbon percentage (%C) in about 5 g of dried sample; after 3 h, the sample is weighted once again. The total organic matter content (CMO) is calculated as mass loss on ignition, after subtracting the original weight from the final weight of the sample. One option to calculate the carbon percentage of the dry sample (%C) is to multiply CMO by 0.47, because the approximate carbon content of the vegetal dry matter is 47%, but changes depend on the type of soil.

The removal of inorganic carbon is a determinant factor in this process; therefore, adding 2-5 mL of HCl at 10% acidifies the sample (this procedure is not necessary for acid soils), causing a CO<sub>2</sub> emission. This procedure must be replicated until no more bubbles are observed. In order to eliminate the acid, distilled or deionized water must be added to the acidified sample; then, the sample is centrifuged at 3000 rpm during 10 min, the liquid is removed,

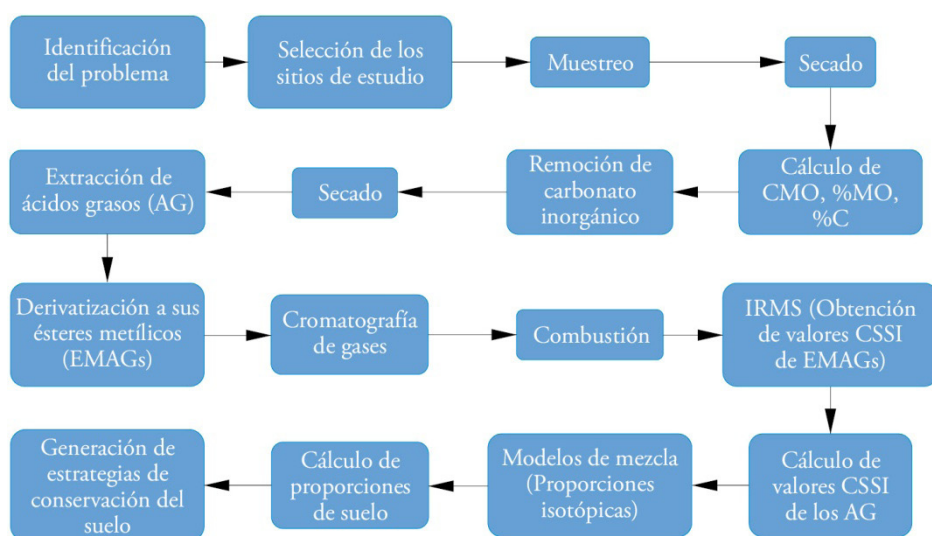


Figura 1. Flujo de trabajo para el uso de la técnica de CSSI.  
Figure 1. Work flow for the use of the CSSI technique.

El primer paso para utilizar la técnica de CSSI es la planeación, en la cual se enlistan los sitios a analizar y se discrimina entre mezclas y posibles fuentes. Una vez ubicados los sitios, se sigue el protocolo sugerido por Gibbs (2014). Diez muestras se toman en un patrón de cuadrícula, a 2 cm de profundidad, con separación de 5 m entre ellas y se homogenizan en un recipiente para obtener una muestra representativa de cada fuente o mezcla. Es importante remover rocas, palos, insectos o material vegetal. Luego, las muestras se secan por liofilización en un horno a 60 °C hasta peso constante y una muestra de garantía de calidad se puede añadir en este punto, la cual puede ser una alícuota de suelo ya analizado. Después, se mide el porcentaje de carbono orgánico (%C) en unos 5 g de muestra seca, para lo cual la muestra se calienta a 450 °C por 3 h y se pesa de nuevo. El contenido de materia orgánica total (CMO) se calcula como la pérdida de la masa por ignición luego de restar el peso original menos el peso final de la muestra. Se sugiere calcular el porcentaje de carbono de la muestra seca (%C) al multiplicar el CMO y 0.47, porque el contenido aproximado de carbono en la materia vegetal es 47%, pero varía según el tipo de suelo.

La remoción del carbonato inorgánico es determinante en este proceso, por lo cual la muestra se acidifica al añadir 2 a 5 mL de HCl al 10% (procedimiento que no es necesario para los suelos ácidos), lo cual causa la liberación de CO<sub>2</sub>. Este procedimiento se debe repetir hasta que no se observe burbujeo. Para eliminar el ácido se agrega agua destilada o desionizada a la muestra acidificada, se centrifuga a 3000 rpm por 10 min, se descarta el líquido, y se repiten estos últimos tres pasos. Después, la muestra se seca en un horno a 60 °C y se traslada en tubos al laboratorio analítico para medir el valor isotópico del contenido de <sup>13</sup>C orgánico en la muestra ( $\delta^{13}\text{C}$ ), y el porcentaje de carbono.

El siguiente paso es la extracción de los AG de la muestra seca y acidificada (con extracción acelerada de disolventes u otras técnicas de extracción equivalentes). Para ello se usa diclorometano (DCM) como disolvente, o su combinación con otros solventes de extracción de grado HPLC (siglas en inglés de cromatografía líquida de alta eficacia), por ejemplo, el metanol (CH<sub>3</sub>OH) (Blake *et al.*, 2018). Después, se añade un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) en lugar del grupo

and the last three steps are repeated. After that, the sample is dried in an oven at 60 °C and carried on test tubes to the analytical lab, where the <sup>13</sup>C organic content isotopic value and the carbon percentage of the sample ( $\delta^{13}\text{C}$ ) are measured.

The following step is the extraction of FAs from the dry and acidified sample (using the accelerated solvent extraction or other similar extraction techniques). This technique uses dichloromethane (DCM) as solvent or its combination with other High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) degree extraction solvents, such as methanol (CH<sub>3</sub>OH) (Blake *et al.*, 2018). Since fatty acids are polar and join any ionic surface [stationary phase of the column chromatography (Gibbs, 2014)], a methyl group (CH<sub>3</sub>) is added instead of the acid group, in order to derivatize the FA to its methyl ester or FAME. This process is also known as methylation. To carry out this process, a catalyst must be used, preferably a boron trifluoride solution (BF<sub>3</sub>) in 5% methanol (v/v) (Bravo-Linares *et al.*, 2018).

The derivatized samples are analyzed to find out the  $\delta^{13}\text{C}$  values of the FAMEs and of the methanol used during the derivatization stage (Gibbs, 2014). In order to carry out this analysis, a gas chromatography-combustion coordinated-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) is used. A prerequisite to use this equipment is that the compounds of the sample are volatile and thermally stable and, therefore, the samples are derivatized first and the derivatization agent's relative isotope ratio must also be determined. In addition, internal calibration standards (C12:0 or C13:0) are added, along with the reference mixtures for the calculation of the  $\delta^{13}\text{C}$  of the FAME of each sample (Bravo-Linares *et al.*, 2018). In the GC-C-IRMS, the sample is transported with ultra-high purity helium through the chromatography column. The CO<sub>2</sub> resulting from the combustion is directed towards the equipment's ion source. For the  $\delta^{13}\text{C}$  analysis, CO<sub>2</sub> ions with different masses are detected, as a result of each molecule's own isotopic composition. Therefore, the IRMS is used to determine the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C rate ( $\delta^{13}\text{C}$  or isotopic signature) of the FA plus the methanol used for the derivatization. Since the isotopic value of the FAME is different for each FA, a correction must be made for each one, using the following formula:

ácido, para derivatizar los AG a sus ésteres metílicos o EMAGs, porque los ácidos grasos son polares y se unen a cualquier superficie iónica [fase estacionaria de la columna cromatográfica (Gibbs, 2014)]. Este proceso también se llama metilación. Para realizar este proceso es necesario usar un catalizador, de preferencia una solución de trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3$ ) en metanol al 5% (v/v) (Bravo-Linares *et al.*, 2018).

Las muestras derivatizadas son analizadas para conocer los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de los EMAGs y del metanol utilizado en la etapa de derivatización (Gibbs, 2014). Para este análisis se usa un cromatógrafo de gases por combustión acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (GC-C-IRMS, por sus siglas en inglés). Un prerequisite para utilizar este equipo es que los compuestos de la muestra sean volátiles y térmicamente estables, por esta razón las muestras primero se derivatizan, y la relación isotópica relativa del agente de la derivatización también se debe determinar. Además, se añaden estándares internos calibrados ( $\text{C}_{12}:0$  o  $\text{C}_{13}:0$ ) y mezclas de referencia para los cálculos de  $\delta^{13}\text{C}$  de los EMAGs a cada muestra (Bravo-Linares *et al.*, 2018). En el GC-C-IRMS, la muestra se transporta con gas helio ultrapuro a través de la columna cromatográfica. El  $\text{CO}_2$  que resulta de la combustión se dirige a la fuente de iones del equipo. Para los análisis de  $\delta^{13}\text{C}$  se detectan iones de  $\text{CO}_2$  con masas diferentes debido a la composición isotópica propia de cada molécula. Así, mediante el IRMS se determina la proporción  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$  o la huella isotópica) del AG más el metanol utilizado para la derivatización. Debido a que el valor isotópico del EMAG es diferente en cada AG, se debe realizar una corrección por cada uno, con la fórmula siguiente:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{AG}} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{EMAG}} - (1 - X)\delta^{13}\text{C}_{\text{Metanol}}}{X} \quad (2)$$

donde:

$\delta^{13}\text{C}_{\text{AG}}$  es el valor isotópico del ácido graso.

X es la contribución fraccional del ácido graso al EMAG. X se calcula al dividir el número de carbonos en el AG entre el número de átomos de carbono presentes en el EMAG, *e.g.* el ácido esteárico ( $\text{C}_{18}$ ) tiene 18 átomos de carbono, mientras el EMAG producido, metilo estearato, tiene 19 (incluye un átomo de carbono añadido del metanol). X tiene un valor de 18/19 ó 0.9474.

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{AG}} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{EMAG}} - (1 - X)\delta^{13}\text{C}_{\text{Metanol}}}{X} \quad (2)$$

where:

$\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$  is the isotopic value of the fatty acid.

X is the fractional contribution of the fatty acid to the FAME. X is calculated by dividing the number of carbons in the FA by the number of carbon atoms in the FAME, *e.g.*, stearic acid ( $\text{C}_{18}$ ) has 18 carbon atoms, while the resulting FAME (stearate methyl) has 19 (including a carbon atom provided by the methanol). X has a value of 18/19 or 0.9474 (Gibbs, 2014).

$\delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}}$  is the isotopic value of the methyl ester of the AG.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{Methanol}}$  is the isotopic value of methanol.

The data obtained was analyzed using mixture models that use the CSSI value data of the sample's FAs and  $^{13}\text{C}$  to estimate the proportional contribution of each one to the mixtures. The analysis provides information about a basin's erosion sources. The most frequently used mixing model-based software is IsoSource (Phillips and Gregg, 2003) and SIAR (Parnell *et al.*, 2010). These programs can be used to calculate the isotopic ratio of the data obtained using the CSSI technique. However, there are some problems with the estimation of soil redistribution when those software programs are used. For example: IsoSource restricts the number of isotopes, sources, and mixtures that can be analyzed, which limits the study of larger areas; meanwhile, SIAR is a math tool that imposes limitations to the input and output of data. In addition, the users of both programs need to do calculations before and after using them, such as: isotopic correction by derivatization and soil ratio calculation of each source of the deposition zones (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2015). An advantage of SIAR over IsoSource is that its results include uncertainty and it works very well for large groups of data; however, inexperienced users can find it hard to analyze and understand its data. In that sense, some consideration must be taken into account before running SIAR, because it will always try to adjust to a model, even if the sources are outside the isotopic mixture polygon (Parnell *et al.*, 2010). Another factor that must be taken into account is that the results represent possible solutions.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{EMAG}}$  es el valor isotópico del éster metílico del AG.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{Metanol}}$  es el valor isotópico del metanol.

Los datos obtenidos se analizan bajo modelos de mezcla que usan datos de valores de CSSI de los AG y del  $^{13}\text{C}$  de la muestra, para estimar la contribución proporcional de cada uno de éstos en las mezclas. Lo anterior proporciona información acerca de las fuentes de erosión en una cuenca. Los programas más comunes basados en modelos de mezcla son IsoSource (Phillips y Gregg, 2003) y SIAR (Parnell *et al.*, 2010). Éstos se pueden usar para calcular proporciones isotópicas de los datos obtenidos por la técnica de CSSI. Sin embargo, dichos programas presentan algunos inconvenientes para estimar la redistribución de suelo. Por ejemplo, IsoSource restringe el número de isótopos, fuentes y mezclas a analizar, lo que limita el estudio de grandes áreas; y SIAR es una herramienta matemática que presenta limitantes en la entrada y salida de datos. Además, en ambos programas, los usuarios necesitan desarrollar cálculos antes y después de usarlos, como: corrección isotópica por la derivatización, cálculo de las proporciones de suelo de cada fuente en los sitios de depósito (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2015). Una ventaja de SIAR sobre IsoSource es que sus resultados incluyen incertidumbre y funciona muy bien con conjuntos numerosos de datos, pero no son fáciles de analizar e interpretar por inexpertos. En ese sentido, algunas consideraciones se deben tomar en cuenta antes de utilizar SIAR, por ejemplo, revisar la información a detalle antes de correr el programa, debido a que siempre intentará ajustarse a un modelo, incluso si las fuentes están fuera del polígono de mezcla isotópico (Parnell *et al.*, 2010). Además, se debe considerar que los resultados representan soluciones probables.

Es importante mencionar que los resultados de los modelos de mezcla (IsoSource y SIAR) son proporciones isotópicas y no proporciones de suelo de cada fuente presente en la mezcla. Es decir, estos modelos proveen información sobre la proporción de cada suelo de origen requerido para obtener un balance isotópico con la muestra de sedimento, basada en las huellas isotópicas del  $^{13}\text{C}$  de toda la muestra y los biomarcadores de AG en los suelos de origen y el sedimento (Gibbs, 2014). Por ello, es necesario convertirlos a proporción de suelo, con la fórmula siguiente:

It is important to mention that the results of the mixture models (IsoSource and SIAR) are isotopic ratios, rather than the soil ratios of each source present in the mixture: *i.e.*, these models provide information about the proportion of each origin soil—which is required to obtain an isotopic balance—to the sediment sample, based on the isotopic signatures of  $^{13}\text{C}$  in the whole sample, and FA biomarkers in the origin soils and sediment (Gibbs, 2014). Subsequently, they must be converted to a soil ratio, using the following formula:

$$\% \text{fuente}_n = \frac{\frac{I_n}{\%C_n}}{\sum_n \left( \frac{I_n}{\%C_n} \right)} \cdot 100 \quad (3)$$

where:

$\% \text{source}_n$  is the soil ratio of the  $n$  source,

$I_n$  is the average isotopic ratio of the  $n$  source in the mixture, estimated from the carbon's isotopic values according to the mixture model.

$\% C_n$  is the carbon percentage of the  $n$  source of the soil (Gibbs, 2014).

Based in some of the limitations of the above-mentioned mixture models, CSSIAR v2.00 software was developed to evaluate soil redistribution, using the CSSI technique, in sedimentation areas with different sources. This open source code software in R (an extensible language and environment for statistical and computing and graphics) is based in the Bayesian approach of SIAR. It solves mixture models with stable isotopes, but utilizing a user-friendly interface (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2017), which enables the analysis of large amounts of sources, mixtures, and isotopes in a simpler and quicker way. Therefore, CSSIAR v2.00 can be used to study a large number of samples from a basin, in a very short time.

Figure 2 shows the main work screen of the CSSIAR v2.00 software. The name of the project must be written on box number 1; the name of the file in which the results will be generated must be written on box number 2. Boxes numbers 3 and 4 are used to open the text files with the CSSI values of the mixtures and the sources, respectively; box number 5 is used to indicate whether or not they include a standard deviation. If the standard deviation is not

$$\% \text{fuente}_n = \frac{\frac{I_n}{\%C_n}}{\sum_n \left( \frac{I_n}{\%C_n} \right)} \cdot 100 \quad (3)$$

donde:

$\% \text{fuente}_n$  es la proporción de suelo de la fuente  $n$ ,  
 $I_n$  es la proporción isotópica media de la fuente  $n$  en la mezcla, estimada a partir de los valores isotópicos del carbono por el modelo de mezcla.

$\%C_n$  es el porcentaje de carbono en la fuente  $n$  de suelo (Gibbs, 2014).

Con base en algunas de las limitaciones de los modelos de mezcla anteriores, y con el objetivo de evaluar la redistribución del suelo en áreas de sedimentación provenientes de diferentes fuentes con el uso de la técnica de CSSI, se desarrolló el programa CSSIAR v2.00. Este programa de código abierto en R (ambiente para la computación estadística y gráfica, extensible a través de paquetes), se basa en el enfoque bayesiano de SIAR para resolver modelos de mezcla con isótopos estables, pero bajo una interfaz amigable con el usuario (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2017), lo cual permite analizar grandes cantidades de fuentes, mezclas e isótopos de una manera más sencilla y rápida. Así, es posible utilizar CSSIAR

included in the said file, it should be indicated in space number 6; if polygon graphics need to be generated, it should be pointed out in space number 7. The FAs with which the analysis will be carried out are determined in number 8 and they can be chosen in combinations of 2 or more. The sources that will be analyzed must be specified in number 9, while the carbon content file must be chosen in number 10. Number 11 will be used to indicate if the program will be run again with the same or different files. Finally, the methanol correction is carried out based on the option marked with number 12.

Some of the improvements that were made to this software include: 1) the packages that are required for a proper operation are automatically installed; 2) the software enables the analysis of the results of the isotopic signatures of the sources and the mixtures, as well as of %C and FAMES, through text files; and 3) the software can operate even with missing data (lost data). Additionally, if the sources do not include a standard deviation, it can be included by hand. Likewise, all or only some of the sources — as well as the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$  (isotopic values of the FAs)— can be analyzed. The interaction between each pair of isotopic values with the mixtures and sources is represented in graphics which enable a simple visual interpretation, helping the user to correctly identify the data that must be analyzed.

Figura 2. Pantalla de trabajo del programa CSSIAR v2.00.  
 Figure 2. Work screen of the CSSIAR software v2.00.

v2.00 para estudiar un amplio número de muestras de una cuenca, en un tiempo muy reducido.

La Figura 2 muestra la pantalla principal de trabajo del programa CSSIAR v2.00. En el recuadro con el número 1 se coloca el nombre del proyecto y, en el 2 el nombre del archivo en el que se generarán con los resultados. Los recuadros 3 y 4 se utilizan para colocar los archivos de texto con los valores de CSSI de las mezclas y las fuentes, respectivamente y, si éstos incluyen la desviación estándar o no, se indica en el 5. En el espacio indicado con el 6 se coloca el valor de la desviación estándar, si no se incluyen en el archivo anterior, y en el 7 se indica si se generarán gráficos de polígono. En el número 8 se determinan los AG con los que se hará el análisis en el programa, mismo que pueden seleccionarse en combinación de 2 ó más. Las fuentes a analizar se especifican en el 9 y, en el 10, el archivo con los contenidos de carbono. En el apartado 11 se indica si se volverá a correr el programa con los mismos o diferentes archivos. Al final, la corrección por el metanol se realiza a partir de la opción que aparece con el número 12.

Algunas de las mejoras de este programa son las siguientes: 1) los paquetes requeridos para funcionar de manera correcta se instalan automáticamente; 2) el programa permite analizar los resultados de las huellas isotópicas de las fuentes y las mezclas, así como el %C y los EMAGs, mediante archivos de texto; y 3) se puede trabajar con datos faltantes (datos perdidos). Además, si las fuentes no incluyen la desviación estándar puede incluirse manualmente al usar el programa. De igual forma, es posible analizar todas las fuentes o seleccionar sólo algunas, lo mismo para los  $\delta^{13}\text{C}_{\text{AG}}$  (valores isotópicos de los AG). La interacción de cada par de valores isotópicos, con las mezclas y las fuentes se representa en gráficas de sencilla interpretación visual, lo cual apoya al usuario en la identificación correcta de los datos a analizar.

En relación con los resultados, el programa CSSIAR v2.00 genera archivos de Excel. Éstos contienen: en la primera hoja, un resumen del análisis donde se especifican los archivos que se usaron como mezclas, fuentes y contenido de carbono, así como el valor que se utilizó como desviación estándar para las fuentes, el número e identidad de los isótopos y fuentes analizados en el estudio. En las cuatro hojas siguientes están los resultados de las proporciones isotópicas de las fuentes para cada mezcla, las desviaciones estándar de estas proporciones, las proporciones de suelo y sus desviaciones estándar, respectivamente.

With regard to the results, the CSSIAR v2.00 software generates Excel files. The first page of the file includes a summary of the analysis which specifies the files that were used as carbon mixtures, sources, and content, as well as the value that was used as standard deviation for the sources and the number and identity of the isotopes and sources that were analyzed in the study. The four following pages include the results of the isotope ratio of the sources for each mixture, the standard deviations for those ratios, the soil ratios and their standard deviations, respectively. Therefore, the analysis of these results serves as the basis for the identification of the main land uses that contribute to deposition of sediments in the study sites and for the decision making that generates and establishes soil conservation strategies.

### Some recent applications of CSSI in Latin America and the Caribbean

The CSSI technique and its use in the identification of sediment sources is experiencing a worldwide boom. It mainly focuses on mitigating the effects of soil degradation and evaluating the effectiveness of the measures that have been applied to preserve this resource. These efforts were significantly promoted by the participation in regional projects coordinated by the International Atomic Energy Agency (IAEA) and other agencies and institutions, such as Newton Picarte CONICYT, along with the Research Councils UK. For example, since 2014, the use of this technique was spread in Latin America and the Caribbean, through a regional Latin American project sponsored by the IAEA. This project has had promising results, including the studies carried out by Bravo-Linares *et al.* (2018) who tracked sediment transport in the basins of hillside forests in Chile, using the CSSI technique, which allowed them to identify the main sources of soil erosion. They also generated promising information and pilot strategies for the improvement of the runoff characteristics of forest paths, the main erosion sources in the study site.

Torres-Astorga *et al.* (2018) proposed the integrated application of two analytical techniques [CSSI and X-ray fluorescence (XFR)] to select environmental tracers, in order to identify the main sediment sources of an agricultural basin in central Argentina which is distinguished by the erodibility of its soils.

Así, se parte del análisis de estos resultados para identificar los principales usos de suelo que contribuyen al depósito de sedimentos en los sitios de estudio, y apoyar a la toma de decisión para generar y establecer estrategias de conservación del suelo.

### **Algunas aplicaciones recientes de CSSI en América Latina y el Caribe**

La técnica de CSSI y su aplicación en la identificación de las fuentes de sedimento tiene un auge creciente en el mundo. La cual se enfoca principalmente en la mitigación de los efectos de la degradación del suelo y la evaluación de la efectividad de las medidas de conservación de este recurso. Estos esfuerzos se impulsan de forma significativa por la participación en proyectos regionales coordinados por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y otros organismos e instituciones como Newton Picarte CONICYT, junto con Research Councils UK. Por ejemplo, en América Latina y El Caribe, desde el 2014, se difundió el uso de esta técnica en un proyecto regional latinoamericano auspiciado por el OIEA, del cual se generaron resultados promisorios. Entre ellos destacan los estudios realizados por Bravo-Linares *et al.* (2018), en el cual usaron la técnica de CSSI para rastrear el transporte de sedimentos en cuencas con bosques ladera en Chile, lo cual permitió identificar las principales fuentes de erosión edáfica. Además, se generó información promisoriosa y estrategias piloto para mejorar las características de la escorrenría en los caminos forestales, principales fuentes de erosión en el sitio de estudio. Torres-Astorga *et al.* (2018) propusieron la aplicación integrada de dos técnicas analíticas [CSSI y fluorescencia de Rayos X (FRX, por sus siglas en inglés)] para seleccionar trazadores ambientales con el fin de identificar las fuentes principales de sedimentos en una cuenca agrícola en el centro de Argentina, que se caracteriza por la erosionabilidad de sus suelos.

### **Discusión**

Para el estudio de la erosión de suelo en una gran extensión de territorio, como lo es una cuenca hidrológica, es indispensable comparar los resultados con el conocimiento de los sitios a partir de visitas a campo. Esto ayudará a comprender los procesos que ocurren en el suelo y conocer las causas de su movimiento.

### **Discussion**

To study soil erosion in a huge territory—such as a drainage basin—the results must be compared with the knowledge of the site provided by field visits. This will help to understand the processes that take place in the soil and to find out the causes of their movement. Consequently, preventive and mitigation smallholding-level measures can be formulated which are appropriate to the activities of the different land uses. These simple, yet effective measures include: 1) keeping the soil covered with some kind of plant cover that provides support, prevent entrainment, and diminish runoff speed; 2) changing the direction of the furrows; and 3) avoiding burning crop residues. Another measure is planting natural barriers or “green enclosures” (*e.g.*, trees surrounding certain plots of land) that diminish the amount of sediment that may be displaced, thus avoiding the removal of the plant cover. Additionally, erosion prevention must be a joint effort by the various members of society (*e.g.*, farmers, experts, researchers), with the support of government authorities, through specific plans that must be followed. These joint actions will build bridges between science, land owners, and the public at large, optimizing the efficiency of the measures that are planned.

Public policies on this matter must be reviewed, updated, and above all put into practice. The necessary measures should be established and maintained and they should also be monitored and followed-up on a regular basis, in order to evaluate their effectiveness and, if necessary, to consider improvements that enable the sustainability of the activities carried out on the soil. Finally, we must emphasize the importance of developing new technologies—based on the results of scientific research—that can be applied to soil conservation.

The CSSI technique requires the support of other quantitative techniques (such as sediment loads modelling) which use weather variables, the implementation of GIS, the estimation of the accumulation rates obtained with FRN, and the additional use of  $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and other isotopes. However, as a stand-alone technique, CSSI is a powerful tool that identifies the sources (of a deposition zone) that undergo erosion processes.

Finally, the information resulting from the development of these studies must be used to

Así, se podrán formular medidas preventivas y de mitigación a nivel de parcela acordes a las actividades de los diferentes usos de suelo. Estas medidas pueden ser simples, pero efectivas, por ejemplo: 1) mantener al suelo con algún tipo de cubierta vegetal, cuya finalidad es brindar soporte, prevenir su arrastre, disminuir la velocidad de la escorrentía; 2) cambiar la dirección de los surcos; y 3) evitar la quema de los residuos de las cosechas. Otra medida es plantar barreras naturales o “cercos verdes” (*e.g.* árboles que rodean determinados terrenos) que disminuyan la cantidad de sedimento que puedan ser desplazados, y así evitar la remoción de cobertura vegetal. Además, es imprescindible que la prevención de la erosión sea un trabajo en conjunto de los diversos actores de la sociedad (*e.g.* agricultores, expertos, investigadores) con el respaldo de autoridades gubernamentales, mediante planes concretos a seguir. Estas acciones conjuntas permitirán conectar a la ciencia con los dueños de la tierra y el público general, para optimizar la eficiencia de las acciones que se planifiquen.

Las políticas públicas en la materia se deben revisar, actualizar y, sobre todo, llevar a la práctica. Se debe procurar el establecimiento y el mantenimiento de las medidas necesarias, así como su respectivo monitoreo y seguimiento periódico, para evaluar su efectividad y, de ser necesario, explorar mejoras que permitan la sostenibilidad de las actividades realizadas en el suelo. Por último, es necesario enfatizar la importancia del desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la conservación del suelo basadas en los resultados de las investigaciones científicas.

La técnica de CSSI requiere el apoyo de otras técnicas cuantitativas, como la modelación de cargas de sedimento que utilizan variables climáticas, la implementación de SIG, las estimaciones de las tasas de acumulación obtenidas con FRN, y el uso adicional de  $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ , y otros isótopos. Sin embargo, por sí sola, la técnica de CSSI es una herramienta poderosa que identifica las fuentes (en una zona de deposición) que atraviesan procesos erosivos.

Finalmente, la información que se genera por el desarrollo de estos estudios debe utilizarse para el establecimiento de medidas efectivas de prevención de la pérdida de la capa arable del suelo (como ya ocurre en otros países), vital para la permanencia de las actividades agrícolas, para así evitar consecuencias mayores en los sitios a los que estos sedimentos terminan depositados.

establish effective prevention measures that stop the loss of the soil's arable layer (a phenomenon that already takes place in other countries), which is vital for the permanence of agricultural activities and to avoid major consequences at the final destinations of those sediments.

## CONCLUSIONS

The CSSI technique enables the identification of soil erosion sources and deposition sites through the analysis of the isotopic signature ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of the long-chain fatty acids. It is not a quantitative technique; therefore, combining it with other techniques that estimate sediment loads is recommended. Knowledge about soil erosion sources provides the information necessary to take preventive measures that preserve this natural resource and mitigate the *ex situ* negative effects. In this manner, joint efforts can be made to enhance the fertility of our soils and, consequently, the ecosystem services they provide.

-----\*

—End of the English version—

## CONCLUSIONES

La técnica de CSSI permite identificar las fuentes de erosión del suelo y los sitios de depósito mediante el análisis de las huellas isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de los AG de cadena larga. No es una técnica cuantitativa, por lo que se recomienda utilizarla en conjunto con otras que estimen las cargas de sedimento. El conocimiento de las fuentes de erosión del suelo brinda información precisa para tomar acciones preventivas de conservación de este recurso natural, y de mitigación de los efectos negativos *ex situ* y, así, unir esfuerzos para mejorar la fertilidad de nuestros suelos y con ello, los servicios ecosistémicos que proveen.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Guadalupe Lizeth Rojas Soto, por su apoyo en la revisión crítica y formato del presente manuscrito. Además, al proyecto “Making soil erosion understandable and

governable at the river basin scale for food, water and hydro-power sustainability in Latin America” auspiciado por Newton Picarte CONICYT, en conjunto con Research Councils UK, y al proyecto RLA5077 “Enhancing livelihood through improving water use efficiency associated with adaptation strategies and climate change mitigation in agriculture”, auspiciado por el Organismo Internacional de Energía Atómica.

## LITERATURA CITADA

- Bautista, F., R. Cejudo-Ruiz, B. Aguilar-Reyes, y A. Gogichashvili. 2014. El potencial del magnetismo en la clasificación de suelos: una revisión. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 66: 365-376.
- Bertsch, F., y C. Henríquez. 2015. 2015: El año internacional de los suelos. *Agronomía Costarricense.* 39: 150-155.
- Bouillon, S., R. M. Connolly, and D. P. Gillikin. 2011. Use of stable isotopes to understand food webs and ecosystem. *In: Wolanski, E., and D. S. McLusky (eds). Treatise on Estuarine and Coastal Science.* Waltham: Academic Press (Ed). pp: 143-173.
- Blake, W. H., K. J. Ficken, P. Taylor, M. A. Russell, and D. E. Walling. 2012. Tracing crop-specific sediment sources in agricultural catchments. *Geomorphology.* 139-140: 322-329.
- Bravo-Linares, C., P. Schuller, A. Castillo, L. Ovando-Fuentealba, E. Muñoz-Arcos, O. Alarcón, S. de los Santos-Villalobos, R. Cardoso, M. Muniz, R. dos Anjos, R. Bustamante-Ortega, and G. Dercon. 2017. First use of a compound-specific stable isotope (CSSI) technique to trace sediment transport in upland forest catchments of Chile. *Sci. Total Environ.* 618: 1114-1124.
- de los Santos-Villalobos, S., M. Ayala-Zepeda, y R. Bórquez-Holguín. 2015. Estrategia para la conservación del suelo. *CyD.* 282: 26-31.
- de los Santos-Villalobos, S., C. Bravo-Linares, R. Meigikos-dos Anjos, R. Cardoso, M. Gibbs, A. Swales, L. Mabit, and G. Dercon. 2017. The CSSIAR v1.00 software: A new tool based on SIAR to assess soil redistribution using compound specific stable isotopes. *SoftwareX.* 6: 13-18.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e Intergovernmental Technical Panel on Soils (ITPS). 2015. Global soil status, processes and trends. *In: L. Montanarella, V. Chude, K. Yagi, P. Krasilnikov, S. K. A. Panah, M. L. Mendonça-Santos, D. Pennock and N. McKenzie (eds). Status of the World's Soil Resources - Main Report.* Roma, Italia, 2015. pp: 100-169.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2019. FAO soils portal. Soil Biodiversity. <http://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/en/> (Consulta: junio 2019)
- Gibbs, M. 2008. Identifying source soils in contemporary estuarine sediments: A new compound-specific isotope method. *Estuar. Coast.* 31: 344-359.
- Gibbs, M. 2014. Protocols on the use of the CSSI Technique to identify and apportion soil sources from land use. National Institute of Water and Atmospheric Research (NIWA). <http://www.naweb.iaea.org/nafa/swmn/public/CSSI-technique-protocols-revised-2013.pdf> (Consulta: noviembre 2018).
- Gibbs, M., G. Olsen, and M. Stuart. 2015. New River Estuary sediment sources tracking pilot study. National Institute of Water & Atmospheric Research (NIWA). <http://www.es.govt.nz/Document%20Library/Research%20and%20reports/Estuarine%20reports/New%20River%20Estuary%20sediment%20tracking%20pilot%20study.pdf> (Consulta: noviembre 2018).
- Hsieh, Y. P., K. T. Grant, and G. C. Bugna. 2009. A field method for soil erosion measurements in agricultural lands. *J. Soil Water Conserv.* 64: 374-382.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). 2015. Un terreno estable: técnicas nucleares para frenar la erosión del suelo en Viet Nam. *In: Miklos, G. (ed). Átomos para la Paz y el Desarrollo. Edición especial del Boletín del OIEA sobre los usos pacíficos de la tecnología nuclear.* Marzo, 2015. pp: 14-15.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2014. Sistema de Información Geográfica. <http://www.inegi.org.mx/inegi/SPC/doc/internet/sistemainformaciongeografica.pdf> (Consulta: junio 2019).
- Kendall, C., and E. A. Caldwell. 2012. Fundamentals of isotope geochemistry. *In: Kendall, C. and J. J. McDonnell (eds). Isotope Tracers in Catchment Hydrology.* Países Bajos, 2012. Elsevier (Ed). pp: 51-84.
- Lewin, W., and W. Goldstein. 2011. From the nucleus to deep space. *In: Loose, E. (ed). For the Love of Physics: From the End of the Rainbow to the Edge of Time - A Journey Through the Wonders of Physics.* New York, United States of America, 2011. Free Press (Ed). pp: 1-20.
- Mabit, L., F. Zapata, G. Dercon, M. Benmansour, C. Bernard, and D. E. Walling. 2014. Assessment of soil erosion and sedimentation: the role of fallout radionuclides. *In: Guidelines for using fallout radionuclides to assess erosion and effectiveness of soil conservation strategies.* IAEA-TECDOC-1741. Viena, Austria, Junio, 2014. International Atomic Energy Agency. pp: 3-26.
- McCorkle, E. P., A. A. Berhe, C. T. Hunsaker, D. W. Johnson, K. J. McFarlane, M. L. Fogel, and S. C. Hart. 2016. Tracing the source of soil organic matter eroded from temperate forest catchments using carbon and nitrogen isotopes. *Chem. Geol.* 445: 172-184.
- Morgan, R. P. C. 2005. Soil Erosion and Conservation. 3a. ed. Blackwell Publishing (Ed). Reino Unido. pp: 1-10.
- National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). 2019. Stable and radiocarbon isotopes of carbon dioxide. The technical details: determining delta values. Earth System Research Laboratory (ESRL). Global Monitoring Division <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/education/isotopes/deltavalues.html> (Consulta: junio 2019).
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). 2019. Población. Asuntos que nos importan. <http://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html> (Consulta: junio 2019).
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2015. Suelos y biodiversidad. Roma, Italia. <http://www.fao.org/3/a-i4551s.pdf> (Consulta: junio 2019).
- Parnell, A. C., R. Inger, S. Bearhop, and A. Jackson. 2010. Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation. *PLoS One.* 5: e9672.
- Pérez-Martínez, I., y F. M. Romero. 2015. Uso de parámetros indirectos para la evaluación de la contaminación de suelos

- por metales pesados en una zona minera de San Luis Potosí, México. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 67: 01-12.
- Phillips, D. L., y J. W. Gregg. 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Springer-Verlag. Oecologia.* 136: 261-269.
- Raven, J. A. 2002. Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems. *In: Unkovich, M., J. Pate, A. McNeill, and D. J. Gibbs (eds). Annals of Botany.* Dordrecht, Países Bajos, 2001. Kluwer Academic Publishers (Ed). pp: 499-500.
- Reiffarth, D., E. Petticrew, P. Owens, and D. Lobb. 2016. Sources of variability in fatty acid (FA) biomarkers in the application of compound-specific stable isotopes (CSSIs) to soil and sediment fingerprinting and tracer: A review. *Sci Total Environ.* 565: 8-27.
- Rhoton, F. E., W. E. Emmerich, D. A. DiCarlo, D. S. McChesney, M. A. Neaig, and J. C. Ritchie. 2008. Identification of suspended sediment sources using soil characteristics in a semiarid watershed. *Soil Sci Soc Am J.* 72: 1102-1112.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2012. Consulta temática. Suelos. Glosario. [http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi\\_apps/WFServlet?IBIF\\_ex=D3\\_GLOS\\_SUELO&IBIC\\_user=dgeia\\_mce&IBIC\\_pass=dgeia\\_mce](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_GLOS_SUELO&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce) (Consulta: noviembre 2018).
- Sharp, Z. D. 2017. Principles of Stable Isotope Geochemistry. 2a. Ed. Pearson (Ed). Upper Saddle River, New Jersey, United States of America. pp: 1-6.
- Soil Science Society of America (SSSA). 2018. Glossary of soil science terms. <https://www.soils.org/publications/soils-glossary/#> (Consulta: junio 2019).
- Torres-Astorga, R., S. de los Santos-Villalobos, H. Velasco, O. Domínguez-Quintero, R. Cardoso, R. Meigikos dos Anjos, Y. Diawara, G. Dercon, and L. Mabit. 2018. Exploring innovative techniques for identifying geochemical elements as fingerprints of sediment sources in an agricultural catchment of Argentina affected by soil erosion. *Environ. Sci. Pollut. R.* 25: 20868-20879.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2016. Revised Universal Soil Loss Equation (RUSLE) - Welcome to RUSLE 1 and RUSLE 2. Agricultural Research Service. <https://www.ars.usda.gov/southeast-area/oxford-ms/national-sedimentationlaboratory/watershed-physical-processes-research/docs/revised-universal-soil-loss-equation-rusle-welcome-to-rusle-1-and-rusle-2/> (Consulta: junio 2019).

# AN ORGANOGENIC *in vitro* SYSTEM FOR THE CONSERVATION AND MASS PRODUCTION OF *Haworthia truncata*

## UN SISTEMA ORGANOGENICO *in vitro* PARA LA CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN EN MASA DE *Haworthia truncata*

Estrella K. Hernández-Vázquez<sup>1</sup>, Hye Hyeon-Kim<sup>2</sup>, Gee Young-Lee<sup>2</sup>, Youn Hee-Kim<sup>2</sup>, María de la L. Guerrero-González<sup>1</sup>, Jae Hong-Lee<sup>2</sup>, Jae Hong-Jung<sup>2</sup>, Pablo Delgado-Sánchez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano Sánchez, SLP, 78321. México. (pablo.delgado@uaslp.mx). <sup>2</sup>Cactus and Succulents Research Institute, Gyeonggi Agricultural Research and Extension Services, Goyang-si, Gyeonggi-do, 0224. Republic of Korea.

### ABSTRACT

*Haworthia truncata*, a species from South Africa, is characterized by truncated leaves at its flat and translucent apex, making it a species with great ornamental value. The objective of this research was to develop a micropropagation protocol for *Haworthia truncata*, for its future application on massive production of the species. A completely random design was established with 16 treatments for the induction of calluses with 12 repetitions for the combination of thidiazuron (TDZ) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA), and five treatments for 6-benzylaminopurine (BA). For the induction of shoots and roots 16 treatments were established with five repetitions. Therefore, we developed an efficient and rapid *in vitro* micropropagation system where the formation of multiple calluses was achieved from different sections of leaves. Leaves were submerged in Murashige and Skoog (MS) 0.5X and 1X media, supplemented with two concentrations of NAA (1 mg L<sup>-1</sup> and 2 mg L<sup>-1</sup>), each one combined with TDZ (1 mg L<sup>-1</sup> or 2 mg L<sup>-1</sup>). A second experiment was carried out for the induction of callus in a 0.5X MS basal medium, adding 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA. The induction stage of shoots used basal medium 0.5X MS. The growth regulators used were 0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA; and 0.1 and 1 mg L<sup>-1</sup> NAA. The highest percentage of callus induction was observed with the growth regulators 1 mg L<sup>-1</sup> NAA+1 mg L<sup>-1</sup> TDZ and 2 mg L<sup>-1</sup> NAA+1 mg L<sup>-1</sup> TDZ. When BA was used, the highest percentage of callus emerged in 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA. The treatment of 4 mg L<sup>-1</sup> BA showed the highest number of shoots 140 d after sowing. For the acclimatization of plants in substrate there was a

### RESUMEN

*Haworthia truncata*, una especie sudafricana, se caracteriza por presentar hojas truncadas en su ápice plano y translúcido, lo cual le otorga un importante valor ornamental. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo de micropropagación para la producción masiva de *Haworthia truncata*. Un diseño completamente aleatorio se estableció con 16 tratamientos para inducir la formación de callos y 12 repeticiones para la combinación de thidiazuron (TDZ) y ácido 1-naftalenacético (NAA), así como cinco tratamientos para 6-bencilaminopurina (BA). Para la inducción de brotes y raíces se establecieron 16 tratamientos con cinco repeticiones. De esta forma, desarrollamos un sistema de micropropagación *in vitro* rápido y eficiente capaz de producir múltiples callos a partir de diferentes secciones foliares. Las hojas se sumergieron en medio Murashige y Skoog (MS) 0.5X y 1X, y un suplemento con dos concentraciones de NAA (1 mg L<sup>-1</sup> y 2 mg L<sup>-1</sup>), cada una combinada con TDZ (1 mg L<sup>-1</sup> o 2 mg L<sup>-1</sup>). Un segundo experimento se realizó para inducir la formación de callos en medio basal de MS 0.5X, adicionado con 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg de BA. Para la fase de inducción de brotes se empleó el medio basal de MS 0.5X. Los reguladores de crecimiento usados fueron 0, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de BA; y 0.1 y 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA. El porcentaje más alto de inducción de brotes se observó con las siguientes combinaciones de reguladores de crecimiento: 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ y 2 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ. El porcentaje más alto de inducción de callos con BA se obtuvo con la concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup>. El tratamiento con 4 mg L<sup>-1</sup> de BA presentó el mayor número de brotes 140 d después de la siembra. Para la aclimatización de las plantas en el sustrato, el porcentaje de supervivencia fue 80-90%. En este estudio se presenta un sistema organogénico eficiente empleando medio de cultivo para la producción masiva de *H. truncata*.

\* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.  
Received: April, 2019. Approved: December, 2019.  
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 619-630. 2020.

survival of 80-90%. An efficient organogenic system with culture medium for *H. truncata* mass production is shown in this study.

**Key words:** Organogenesis, plant growth regulators, succulents, tissue culture.

## INTRODUCTION

The genus *Haworthia* belongs to the Xanthorrhoeaceae family (The Plant List, 2013) and has about 68 species with 41 subspecies (Jessy *et al.*, 2005). *Haworthia truncata* is a succulent plant, with seven to nine leaves arranged neatly in two exactly opposite rows, ending in a truncated flat and translucent apex. Leaves are 2.5-3.5 cm long, 1.5-3 cm wide, 5-7 mm thick, and slightly curved. The inflorescence of *H. truncata* is approximately 23 cm high and flowering takes place in February, March and April (Scoot, 1985). The flowers are white, about 1 cm long, with five petals, which appear at the end of the stems grouped in clusters (Lee, 2010). *Haworthia* is from South Africa and is mainly concentrated in the eastern and western provinces of the Cape (RSA), where it grows along the Indian Ocean and on the slopes and hills (Nuzhyna and Gaydarzhy, 2015) in various habitats at an altitude of 2000 m; besides, it tends to grow in shallow soils in open to closed scrublands and stony soils (Scoot, 1985). Intensive agricultural practices and land-use-change have a strong impact on the stability of this species population (Mycock *et al.*, 1997; Wiersema and León, 2013).

Japanese farmers have raised some extraordinary variations of this species and several of them are available in the market. *Haworthia* species grows by seeds that germinate very easily because they can be pollinated by hand. Besides, it is cultivated by cuttings, in which a leaf is carefully cut and roots are expected to come out. However, it can be a very slow process that takes several months for the plant to be ready for planting (Mycock *et al.*, 1997). The survival of the genus is also threatened by the high demand of collectors because it is a plant of great ornamental value (OVATA, 2017). Efforts to find new alternatives to establish efficient *in vitro* protocols of *Haworthia* are very scarce. A protocol that produces efficient differentiation, development and regeneration of whole plants, is essential for the conservation and mass production of these plants.

**Palabras clave:** organogénesis, reguladores de crecimiento vegetal, suculentas, cultivo de tejidos.

## INTRODUCCIÓN

El género *Haworthia* pertenece a la familia Xanthorrhoeaceae (The Plant List, 2013) y tiene alrededor de 68 especies y 41 subespecies (Jessy *et al.*, 2005). *Haworthia truncata* es una planta suculenta, con siete a nueve hojas dispuestas de forma ordenada en dos hileras exactamente opuestas, las cuales terminan en un ápice truncado plano y translúcido. Las hojas son ligeramente curvas y miden 2.5-3.5 cm de largo, 1.5-3 cm de ancho, 5-7 mm de grosor. La inflorescencia de *H. truncata* mide aproximadamente 23 cm de alto; la floración ocurre en febrero, marzo y abril (Scoot, 1985). Las flores son blancas, longitud aproximada de 1 cm, con cinco pétalos agrupados al final de los tallos (Lee, 2010). *Haworthia* es de Sudáfrica y se concentra principalmente en las provincias orientales y occidentales del Cabo (RSA), donde crece a lo largo del Océano Índico y en las laderas y colinas (Nuzhyna y Gaydarzhy, 2015) en diversos hábitats a una altitud de 2000 m; también suele crecer en suelos poco profundos, en matorrales abiertos o cerrados y suelos rocosos (Scoot, 1985). Las prácticas agrícolas intensivas y el cambio del uso del suelo tienen un fuerte impacto en la estabilidad poblacional de esta especie (Mycock *et al.*, 1997; Wiersema y León, 2013).

Agricultores japoneses han cultivado variaciones extraordinarias de esta especie, y varias están disponibles en el mercado. La especie *Haworthia* crece a partir de semillas que germinan con facilidad porque se pueden polinizar de forma manual. También se cultiva a partir de explantes, en los que se corta con cuidado una hoja y se espera que crezcan raíces. Sin embargo, puede ser un proceso muy lento que tarda varios meses para que la planta esté lista para plantar (Mycock *et al.*, 1997). La supervivencia del género también está amenazada por la alta demanda de colectores, ya que es una planta de gran valor ornamental (OVATA, 2017). Los esfuerzos para encontrar nuevas alternativas para establecer protocolos *in vitro* para *Haworthia* son muy escasos. Un protocolo que genere la diferenciación, el desarrollo y la regeneración eficiente de plantas completas es esencial para la conservación y producción en masa de estas plantas.

For developing an efficient propagation *in vitro* and the massive multiplication of the species, the appropriate selection of a basal medium and the correct selection of the growth regulators such as auxins and cytokinins, are elementary for indirect organogenesis and to obtain a favorable response (Singh *et al.*, 2016). Cytokinins can be divided into two main groups: naturally occurring adenine derivatives such as kinetin (KT) and 6-benzylaminopurine (BA), and synthetic phenyl urea derivatives as thidiazuron (TDZ) (Jiang *et al.*, 2004). TDZ is involved in cytokinin metabolism and it induces the accumulation of endogenous cytokinins (Mok *et al.*, 1982; Murthy *et al.*, 1995). Auxins, such as 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA), induce root formation and elongation of shoots in various species (Soto *et al.*, 2019). However, knowledge about the distribution of extra and intracellular auxins and cytokinins, as well as levels in cell compartments, is needed (Skalicky *et al.*, 2018).

The hypothesis was that the division and differentiation of leaf explants may be possible with the optimal balance of the culture medium and growth regulators. The objective of this study was to establish the optimal conditions for the *in vitro* propagation of *H. truncata* through the induction of organogenesis as a strategy for the rescue, conservation and mass production of this species.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and its disinfection

Mother plants of *H. truncata* were obtained from the greenhouse “La Biznaga Vagabunda” located in Ezequiel Montes, Querétaro, México. Rosette leaves were carefully separated and used as explants and they were washed thoroughly under flow water for 2 min to remove surface particles. Under aseptic conditions, the explants were immersed in 96% ethanol for 1 min, and the leaves were immersed in a solution with 2% sodium hypochlorite (v/v) and 0.25 ml L<sup>-1</sup> tween-20 with constant shaking for 15 min, followed by three rinses with sterile distilled water. Finally, leaves were immersed in 70% ethanol for 3 min and rinsed with sterile distilled water.

### Culture medium for callus induction

Sterile leaves were cut into two segments, apical and base, and incubated on bottles containing basal medium MS

Para desarrollar una eficiente propagación *in vitro* y la multiplicación masiva de *H. truncata*, la selección adecuada del medio basal y los reguladores de crecimiento, como auxinas y citoquininas, son esenciales para la organogénesis indirecta y para obtener una respuesta favorable (Singh *et al.*, 2016). Las citoquininas se pueden clasificar en dos grupos: naturales derivadas de la adenina como la cinetina (KT) y la 6-bencilaminopurina (BA), y sintéticas derivadas de la fenilurea como el thidiazuron (TDZ) (Jiang *et al.*, 2004). El TDZ está involucrado en el metabolismo de la citoquinina, e induce la acumulación de citoquininas endógenas (Mok *et al.*, 1982; Murthy *et al.*, 1995). Las auxinas, como el ácido 1-naftalenacético (NAA) y el ácido indol-3-butírico (IBA), inducen la formación de la raíz y la elongación de los brotes en diferentes especies (Soto *et al.*, 2019). Sin embargo, se requiere conocer más acerca de la distribución de las auxinas y citoquininas extra e intracelulares, así como de sus concentraciones en los compartimentos celulares (Skalicky *et al.*, 2018).

La hipótesis fue que la división y diferenciación de los explantes foliares se puede lograr con el balance óptimo del medio de cultivo y los reguladores de crecimiento. El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones óptimas para la propagación *in vitro* de *H. truncata* por medio de la inducción de la organogénesis como una estrategia para el rescate, la conservación y la producción en masa de esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y desinfección

Las plantas madre de *H. truncata* se obtuvieron del invernadero “La Biznaga Vagabunda” ubicado en Ezequiel Montes, Querétaro, México. La roseta de hojas se separó con cuidado y sus hojas se utilizaron como explantes. Los explantes se lavaron bajo un chorro de agua durante 2 min para retirar las partículas superficiales. Bajo condiciones asépticas, los explantes se sumergieron en etanol al 96% durante 1 min, y las hojas se sumergieron en una solución con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) y 0.25 ml L<sup>-1</sup> de tween-20 con agitación constante durante 15 min, seguido por tres enjuagues con agua destilada estéril. Al final, las hojas se sumergieron en etanol al 70% durante 3 min y enjuagaron con agua destilada estéril.

### Medio de cultivo para la inducción de callos

Las hojas estériles se cortaron en dos segmentos, apical y basal, y se incubaron en frascos con medio basal de MS (Murashige y

(Murashige and Skoog, 1962) at 0.5X or 1X, pH 6.0, 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 2.2 g L<sup>-1</sup> phytagel and growth regulators. For induction of callus, MS medium was supplemented with concentrations of: 1) 6-benzylaminopurine (BA, 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L<sup>-1</sup>), or 2) 1-naphthalene acetic acid (NAA, 1 mg L<sup>-1</sup> and 2 mg L<sup>-1</sup>) and thidiazuron (TDZ, 1 mg L<sup>-1</sup> and 2 mg L<sup>-1</sup>). Then, the bottles were sterilized in an autoclave. Treatments were five replicates for BA and twelve for NAA+TDZ (Table 1), and each replicate was one leaf cut in four segments.

The concentrations of the growth regulators were 1 mg L<sup>-1</sup> and 2 mg L<sup>-1</sup> NAA, and each was combined with 1 mg L<sup>-1</sup> and 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ; thus, there were five treatments and twelve replicates for each treatment. For BA the treatments were 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L<sup>-1</sup>, and five replicates for each treatment (Table 1). All the cultures were maintained seven weeks under constant light (LED fluorescent lamps at 150  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) at 23 $\pm$ 2 °C for the induction of callus. Basal medium was changed every four weeks. Callus evaluation was performed with the color (green, lime green, and intense green) and friable callus.

### Induction of shoots

Friable callus showing a green color, lime green or intense green were selected for shoots induction. These calluses were placed on 0.5X MS added with a combination of BA (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup>) and NAA (0.0, 0.1, and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) at different concentrations. All cultures were maintained 20 weeks in plant growth chambers with light provided LEDs and a constant PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) of 150  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at 23 $\pm$ 2 °C, and sub-cultured to fresh basal medium was changed every four weeks.

### Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized. All cultures were observed daily to record the callus or shoots induction. The mean values, standard deviations and standard error of callus formation, shoot formation, average number of shoot/explants, and shoot survival were calculated using SAS<sup>®</sup> and Excel<sup>™</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Callus induction

For *H. truncata* species, callus were obtained at the fourth week after planting leaf explants, in a basal medium 1X and 0.5X MS without growth

**Table 1. Treatments for callus induction using NAA, TDZ, and BA growth regulators.**

**Cuadro 1. Tratamientos para la inducción de callos usando los reguladores de crecimiento NAA, TDZ y BA.**

| Treatment (num) | NAA (mg L <sup>-1</sup> ) | TDZ (mg L <sup>-1</sup> ) | BA (mg L <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1               | 0                         | 0                         | 0                        |
| 2               | 1                         | 1                         | 0                        |
| 3               | 1                         | 2                         | 0                        |
| 4               | 2                         | 1                         | 0                        |
| 5               | 2                         | 2                         | 0                        |
| 1               | 0                         | 0                         | 0.1                      |
| 2               | 0                         | 0                         | 0.5                      |
| 3               | 0                         | 0                         | 1                        |
| 4               | 0                         | 0                         | 2                        |
| 5               | 0                         | 0                         | 4                        |

Skoog, 1962) 0.5X o 1X, con pH 6.0, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.2 g L<sup>-1</sup> de Phytagel y reguladores de crecimiento. Para la inducción de callos, el medio MS tuvo un suplemento con concentraciones de: 1) 6-bencilaminopurina (BA, 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup>) o 2) ácido 1-naftalenacético (NAA, 1 mg L<sup>-1</sup> y 2 mg L<sup>-1</sup>) y thidiazuron (TDZ, 1 mg L<sup>-1</sup> y 2 mg L<sup>-1</sup>). Después, los frascos se esterilizaron en una autoclave. Cinco repeticiones se realizaron para el tratamiento con BA y 12 para el tratamiento con NAA+TDZ (Tabla 1), y cada repetición correspondió a una hoja cortada en cuatro segmentos.

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento fueron 1 mg L<sup>-1</sup> y 2 mg L<sup>-1</sup> de NAA, cada concentración se combinó con 1 mg L<sup>-1</sup> y 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ; así hubo cinco tratamientos y 12 repeticiones para cada tratamiento. Para la BA, los tratamientos fueron 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup>, con cinco repeticiones para cada tratamiento (Tabla 1). Todos los cultivos se mantuvieron siete semanas bajo luz constante (lámparas LED fluorescentes a 150  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) a 23 $\pm$ 2 °C para la inducción de los callos. El medio basal se cambió cada cuatro semanas. Los callos se evaluaron con base en su color (verde, verde lima y verde intenso) y mediante la obtención de callos friables.

### Inducción de brotes

Los callos friables de color verde, verde lima o verde intenso se seleccionaron para la inducción de los brotes. Estos callos se colocaron en medio MS 0.5X adicionado con una combinación de BA (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup>) y NAA (0.0, 0.1 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>) a diferentes concentraciones. Todos los cultivos se mantuvieron 20 semanas en cámaras de crecimiento con luz proporcionada por LED a una PPFD constante de 150  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>

regulators. This basal medium MS was used in most studies for the micropropagation of various succulent species (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015), including the micropropagation of *Haworthia* species such as: *H. chloracantha* Haw., *H. atrojusca*, *H. angustifolia* var. *Albensis* (schoenl.) V. Polln., *H. maughanii* V. Polln., *Haworthia* spp. aff. *baccata*. All these species developed and differentiated in the MS medium without growth regulators from inflorescence and gynaceous (Kaul and Shabarwal, 1972). Addition of growth regulators to MS medium caused a higher percentage of callus, as compared to MS medium without regulators.

The differentiation level of explants varies with the MS salts concentration in culture medium, the segment of the cultivated leaf (apex or base) and the type of plant growth regulators used (Figure 1). Thus, explants were classified according to the differentiation level as no callus formation, explants with a 25% of callus formation, callus formation in 50% of the explant, and explant exhibiting an abundant callus formation with amorphous mass of undifferentiated cells (Figure 1).

The establishment of *in vitro* cultures of plant tissues from different species of succulents plants were used with media supplemented with complex nutrients; for example, coconut milk, casein and yeast extract, and with chemically defined media (Starling and Dodds, 1983; Kordi *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2013; Youssef *et al.*, 2016; Cabahug *et al.*, 2018). However, in our experiment it was not necessary to use these supplements, since favorable responses were obtained in a basal medium with the lowest concentration of MS salts (*i.e.* 0.5X). Thus, we selected 0.5x MS medium basal for induction shoots.

Under control condition, both 0.5X and 1X MS, apex explants exhibit a higher callus formation than the base explants (Figure 2A, B). By using the basal medium 0.5X MS supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> NAA + 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ or 2 mg L<sup>-1</sup> NAA + 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ we obtained a 100% of callus from base explant at seven weeks. The use of TDZ and NAA can help to the proliferation of callus (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016), whereas TDZ growth regulator cause callus differentiation in *H. turgida* (Liu *et al.*, 2017). Cell division explants were increased by using NAA and TDZ, whereas utilization of TDZ, NAA and the 0.5X MS medium caused >60% at seven weeks, as compared to the control treatment

s<sup>-1</sup> a 23±2 °C, y se subcultivaron en medio basal fresco, el cual se cambió cada cuatro semanas.

### Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio. Todos los cultivos se observaron día para registrar la inducción de callos y brotes. Los valores de las medias, las desviaciones y el error estándar de la formación de los callos y brotes, así como el número promedio de brotes/explante y la supervivencia del brote se calcularon con SAS<sup>®</sup> y Excel<sup>™</sup>.

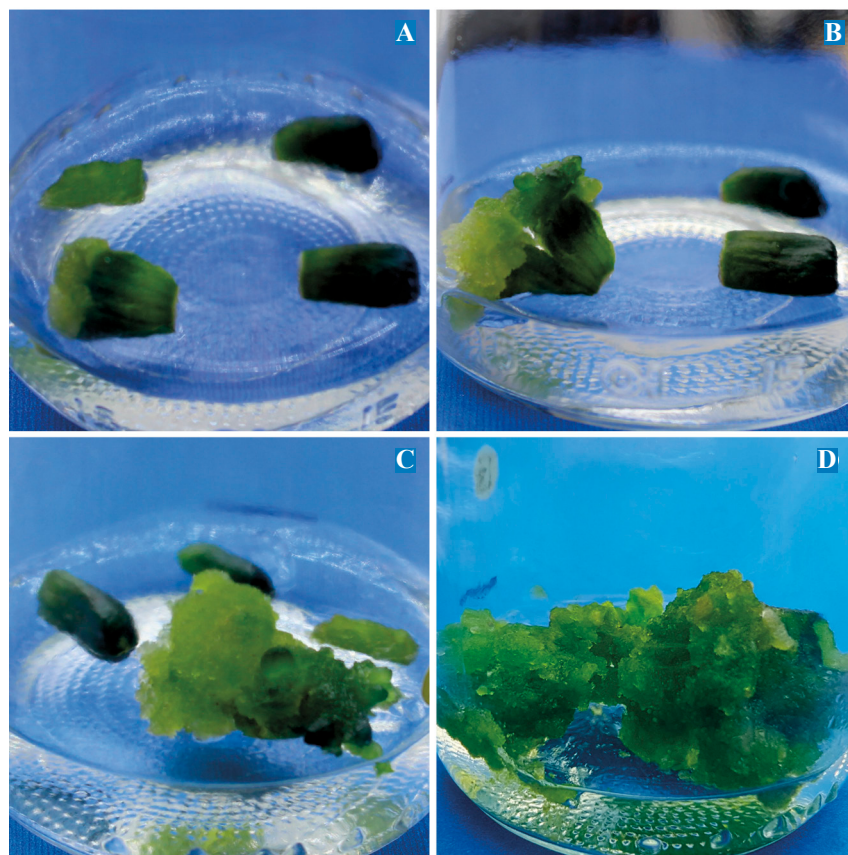
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inducción de callos

Para la especie de *H. truncata*, los callos se obtuvieron en la cuarta semana después de sembrar los explantes de hojas, en un medio basal de MS 1X y 0.5X sin reguladores de crecimiento. El medio basal de MS se ha usado en la mayoría de los estudios para la micropropagación de varias especies de suculentas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015), e incluyen diversas especies de *Haworthia*: *H. chloracantha* Haw., *H. atrojusca*, *H. angustifolia* var. *Albensis* (schoenl.) V. Polln., *H. maughanii* V. Polln., *Haworthia* spp. aff. *baccata*. Todas estas especies se desarrollaron y diferenciaron en el medio MS sin reguladores de crecimiento a partir de inflorescencias y gineceos (Kaul y Shabarwal, 1972). La adición de los reguladores de crecimiento al medio MS aumentaron el porcentaje de callos, en comparación con el medio MS sin reguladores.

El nivel de diferenciación de los explantes varía con la concentración de sales MS en el medio de cultivo, el segmento de hoja cultivado (ápice o base) y el tipo de reguladores de crecimiento vegetal utilizados (Figura 1). Así, los explantes se clasificaron conforme al nivel de diferenciación como: explantes sin formación de callos, explantes con una formación de callos de 25%, formación de callos en 50% de los explantes y explantes con una abundante formación de callos con una masa amorfa de células indiferenciadas (Figura 1).

El establecimiento de cultivos *in vitro* de tejidos vegetales de diferentes especies de suculentas se usaron con medios adicionados con nutrientes completos; por ejemplo, leche de coco, caseína y extracto de levadura, así como medios químicamente definidos



**Figure 1.** Representative images of explants showing different differentiation levels. A) Explants growing in with no evident callus formation in basal medium 0.5X MS without grow regulators; B) callus formation on the margins of the explant (25%) in basal medium 0.5X MS without grow regulators; C) callus formation in 50% of the explant in 1X MS 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ+1 mg L<sup>-1</sup> NAA; D) abundant callus formation, amorphous mass of undifferentiated cells in 0.5X MS 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ+1 mg L<sup>-1</sup> NAA.

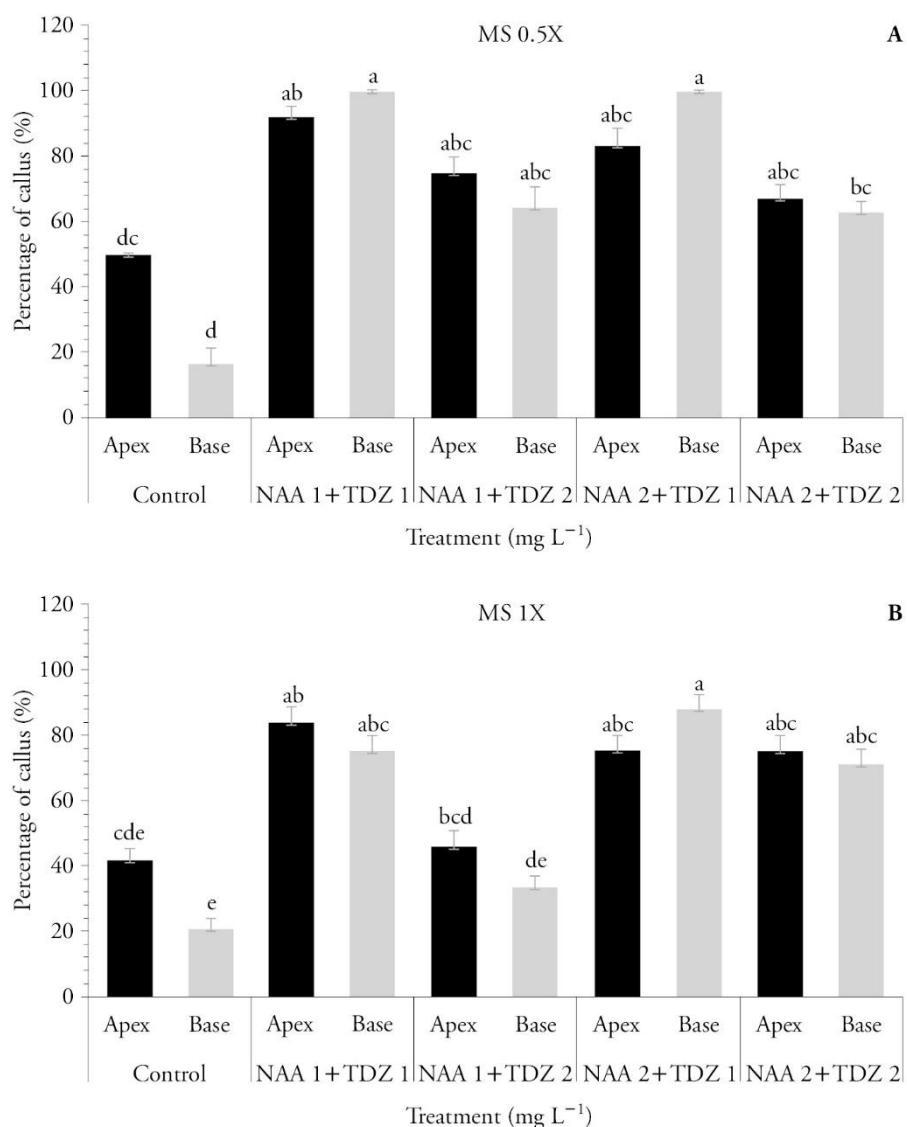
**Figura 1.** Imágenes representativas de explantes con diferentes niveles de diferenciación. A) Explantes sin formación de callos creciendo en medio basal de MS 0.5X sin reguladores de crecimiento; B) formación de callos en los márgenes del explante (25%) en medio basal de MS 0.5X sin reguladores de crecimiento; C) formación de callos en 50% de los explantes en MS 1X adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ+1 mg L<sup>-1</sup> de NAA; D) formación abundante de callos, masa amorfa de células indiferenciadas en medio MS 0.5X adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ+1 mg L<sup>-1</sup> de NAA.

(without growth regulators). Besides, the percentage of callus is <50% for the apex explant and <20% for the base explant (control).

With the 1X MS basal medium (2 mg L<sup>-1</sup> NAA+1 mg L<sup>-1</sup> TDZ) we obtained >80% callus formation using the base as explant. For the apex explant, 1 mg L<sup>-1</sup> NAA+1 mg L<sup>-1</sup> TDZ caused the highest percentage of callus (80%) (Figure 2B). A similar result was reported for *H. maughanii*, with 100% callus percentage at 16 weeks after planting leaf segment in a medium with 1 mg L<sup>-1</sup> NAA+1 mg L<sup>-1</sup> TDZ (Kim *et al.* 2018). With 0.5X MS medium the differentiation of callus was higher in all treatments with growth regulators, except in the

(Starling y Dodds, 1983; Kordi *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2013; Youssef *et al.*, 2016; Cabahug *et al.*, 2018). Sin embargo, en nuestro experimento no fue necesario emplear estos suplementos, porque se obtuvieron respuestas favorables con un medio basal con las concentraciones más bajas de sales MS (es decir, 0.5X). Por lo cual seleccionamos el medio basal de MS 0.5X para la inducción de brotes.

Bajo condiciones controladas, en MS 0.5X y 1X, los explantes provenientes del ápice exhiben una mayor formación de callos que los explantes de la base (Figura 2A, B). Con el uso del medio basal de MS 0.5X más un suplemento con 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ o 2 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de



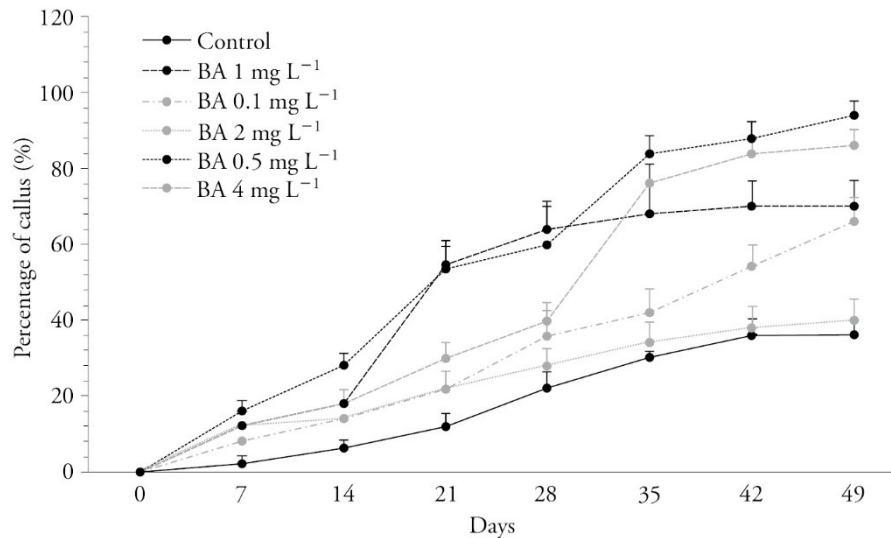
**Figure 2.** Percentage of callus according to the concentration of salts of the basic medium MS (0.5X and 1X), the segment of the explant (apex and base), and the combinations of growth regulators (NAA+TDZ). The vertical bar represents  $\pm$ SD,  $n=12$  ( $p \leq 0.05$ ).

**Figura 2.** Porcentaje de callos con respecto a la concentración de las sales del medio basal de MS (0.5X y 1X), al segmento del explante (ápice o base) y a las combinaciones de los reguladores de crecimiento (NAA+TDZ). La barra vertical representa la  $\pm$ DE,  $n=12$  ( $p \leq 0.05$ ).

control medium (without growth regulators) of the explant with  $<20\%$  percentage of callus.

We also carried out an experiment using 0.5X MS+BA for callus induction from *H. truncata*, and found that the differentiation of calluses began seven days after sowing explants in all treatments. The treatments with  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BA and  $4 \text{ mg L}^{-1}$  BA presented higher differentiation of callus (94% and 86%, respectively) (Figure 3). Zang *et*

TDZ, obtuvimos callos en 100% de los explantes de la base de la hoja a las siete semanas. El uso de TDZ y NAA puede ayudar a la proliferación de callos (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016), mientras que el regulador de crecimiento TDZ genera la diferenciación de los callos en *H. turgida* (Liu *et al.*, 2017). La división celular de los explantes aumentó con el NAA y el TDZ, mientras que la adición de TDZ y NAA al medio MS 0.5X generó  $>60\%$  a



**Figure 3.** Percentage of callus induction according to evaluation days and concentration of growth regulator BA. Data obtained with analysis of variance of repeated measurements. The vertical bar represents  $\pm$  SE,  $n=5$  ( $p \leq 0.05$ ).

**Figura 3.** Porcentaje de inducción de callos respecto a los días de evaluación y la concentración del regulador de crecimiento BA. Datos obtenidos con un análisis de varianza con medidas repetidas. La barra vertical representa el  $\pm$  EE,  $n=5$  ( $p \leq 0.05$ ).

*al.* (2016) reported that the use of BA can generate compact and granular calluses. However, in our experiment the callus generated for *H. truncata* was of appearance friable. At 49 d after planting under control conditions (without growth regulators) we obtained a low percentage ( $<40\%$ ) of callus formation, compared to the treatments with BA as growth regulator (Figure 3).

Treatments for callus induction were grouped using cytokinin BA at the seventh week after sowing (49 d after sowing), and significant differences were found between treatments (Table 2).

### Induction of shoots

This friable calluses from *H. truncata* obtained in the previous experiments were evaluated in 0.5X basal medium MS with 0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.1 and 1 mg L<sup>-1</sup> NAA during 140 d for the appearance of shoots. Twenty weeks of after cultivation with the 4 mg L<sup>-1</sup> BA treatment, 15.7140% of *H. truncata* calluses developed 110 shoots (Table 3). Richwine *et al.* (1995) used flower explants and obtained buds 8 weeks after sowing “Haworthias” and Aloe; however, in a subsequent *in vitro* experiment with shoots placed in a medium

**Table 2.** Callus induction analysis at 7 weeks after planting for *Haworthia truncata* with the use of cytokinin BA.

**Cuadro 2.** Análisis de la inducción de callos siete semanas después de la siembra para *Haworthia truncata* con el uso de la citoquinina BA.

| Treatment BA (mg L <sup>-1</sup> ) | Callus induction (%) |
|------------------------------------|----------------------|
| 0.5                                | 94.00 a              |
| 4                                  | 86.00 a              |
| 1                                  | 70.00 a,b            |
| 0.1                                | 66.00 a,b,c          |
| 2                                  | 40.00 b,c            |
| Control                            | 36.00 c              |

Values are means of five replicates for each treatment. Means with different letters are significantly different ( $p \leq 0.05$ ). ♦ Los valores representan la media de cinco repeticiones para cada tratamiento. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

las siete semanas en comparación con el tratamiento testigo (sin reguladores de crecimiento). Además, el porcentaje de callos es  $<50\%$  para el explante del ápice y  $<20\%$  para el explante de la base (testigo).

Con el medio basal de MS 1X (2 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ) obtuvimos  $>80\%$  de

**Table 3. Production of shoots and callus 140 days after sowing *H. truncata*.****Cuadro 3. Producción de brotes y callos 140 d después de sembrar *H. truncata*.**

| Treatment (num.) | BA + NAA (mg L <sup>-1</sup> ) | Shoots (num.) | Callus (%)   |
|------------------|--------------------------------|---------------|--------------|
| 6                | 4 + 0                          | 110           | 15.7140 a    |
| 8                | 0.5 + 0.1                      | 55            | 7.8571 a,b,c |
| 13               | 0.5 + 1                        | 39            | 9.4286 a,b,c |
| Control          | 0 + 0                          | 10            | 1.4286 b,c   |
| 4                | 1 + 0                          | 33            | 4.7143 b,c   |
| 5                | 2 + 0                          | 40            | 5.7413 b,c   |
| 9                | 1 + 0.1                        | 14            | 2.8571 b,c   |
| 10               | 2 + 0.1                        | 6             | 1.7143 b,c   |
| 12               | 0.1 + 1                        | 9             | 1.5714 b,c   |
| 14               | 1 + 1                          | 15            | 4.0000 b,c   |
| 2                | 0.1 + 0                        | -             | 0.0000 c     |
| 3                | 0.5 + 0                        | -             | 0.0000 c     |
| 7                | 0.1 + 0.1                      | -             | 0.0000 c     |
| 11               | 4 + 0.1                        | -             | 0.0000 c     |
| 15               | 2 + 1                          | -             | 0.000 c      |
| 16               | 4 + 1                          | -             | 0.000 c      |

Values are means of five replicates for each treatment. Means with different letters are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) ♦ Los valores representan la media de cinco repeticiones para cada tratamiento. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

with 4  $\mu$ M BA during 9 months, there were no callus or shoots. Our results indicate that using leaves as explants may be more feasible for mass production from *H. truncata*, since vegetative material such as seeds and inflorescences might not be obtained. Similarly, the use of BA as cytokinin at higher rates (2 mg L<sup>-1</sup>-4 mg L<sup>-1</sup>) induces shoots proliferation (Balch *et al.*, 1998; Gratton and Fray, 1999; Rosa-Carrillo *et al.*, 2012; Kordi *et al.*, 2013; Razib *et al.*, 2016; Yen-Ming *et al.*, 2019).

At the 9<sup>th</sup> week after planting, the first differentiations of shoots in the treatments was observed (Figure 4). The generation of roots in the *in vitro* culture was low; however, in the rooting of shoots in perlite, vermiculite and peat moss (1:1:3), higher rooting was obtained and with an adequate acclimatization process, 80-90% survival of the species (Figure 4F). Our research may contribute to the conservation and sustainable use of *H. truncata*, since it shows a protocol for clonal micropropagation from leaf segments, which allows producers and

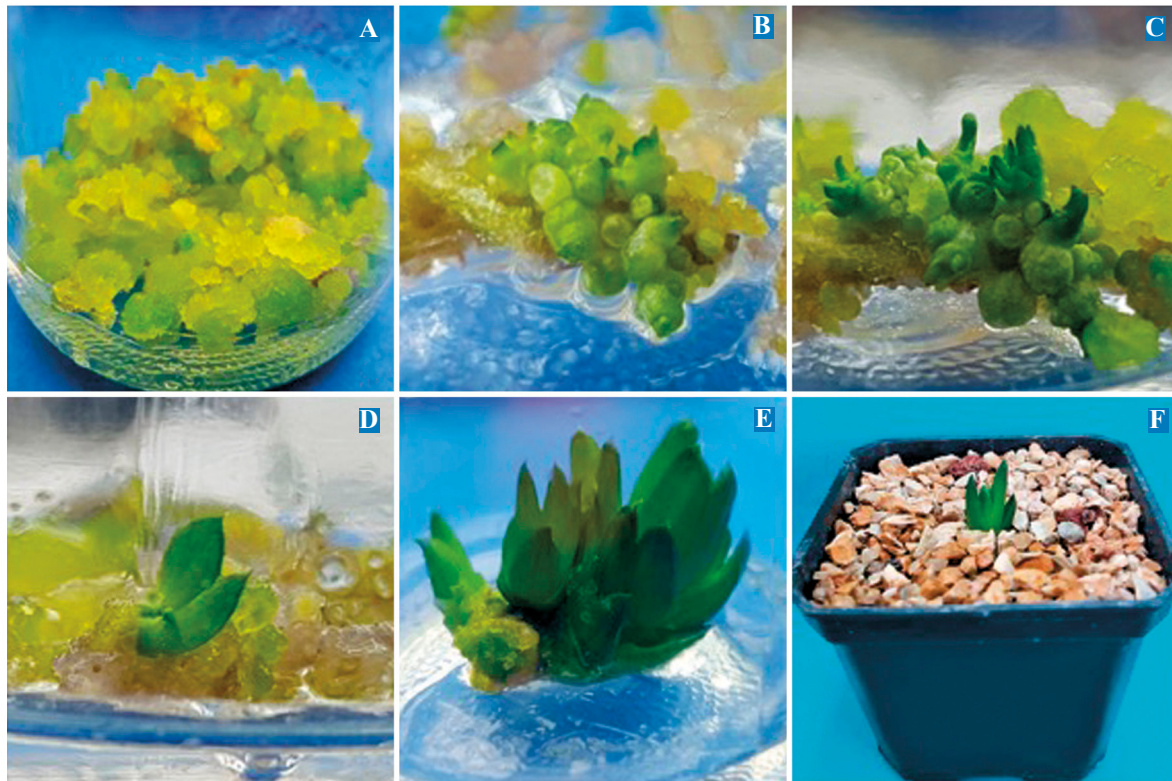
formación de callos al usar los explantes obtenidos de la base foliar. Para los explantes obtenidos del ápice, el tratamiento con 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ generó el porcentaje de formación de callos más alto (80%) (Figura 2B). Un resultado similar se reportó para *H. maughanii*, con un porcentaje de formación de callos del 100% 16 semanas después de sembrar el segmento foliar en un medio con 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ (Kim *et al.* 2018). Con el medio MS 0.5X, la diferenciación de los callos fue mayor en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento, excepto en el medio testigo (sin reguladores de crecimiento) del explante con <20% de callos.

También realizamos un experimento con medio MS 0.5X+BA para la inducción de callos de *H. truncata*, y encontramos que la diferenciación de los callos iniciaba siete días después de sembrar los explantes en todos los tratamientos. Los tratamientos con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA y 4 mg L<sup>-1</sup> de BA presentaron una mayor diferenciación de los callos (94% y 86%, respectivamente) (Figura 3). Zang *et al.* (2016) reportaron que el uso de BA puede generar callos compactos y granulares. Sin embargo, en nuestro experimento, los callos generados para *H. truncata* tenían un aspecto friable. A los 49 d después de sembrar los explantes bajo condiciones controladas (sin reguladores de crecimiento) obtuvimos un porcentaje bajo (<40%) de formación de callos, en comparación con los tratamientos con BA como regulador de crecimiento (Figura 3).

Los tratamientos para la inducción de callos se agruparon utilizando citoquinina BA en la séptima semana después de la siembra (49 d después de la siembra) y se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2).

### Inducción de brotes

A partir de los callos friables de *H. truncata* obtenidos en los experimentos anteriores, evaluamos, durante 140 d la inducción de brotes en un medio basal de MS 0.5X con 0, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de BA, y 0.1 y 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA. Veinte semanas después del cultivo con el tratamiento de 4 mg L<sup>-1</sup> de BA, 15.7140% de los callos de *H. truncata* desarrolló 110 brotes (Tabla 3). Richwine *et al.* (1995) utilizaron explantes de flores y obtuvieron yemas ocho semanas después de sembrar “Haworthias” y Aloe;



**Figure 4.** Stages of differentiation of *Haworthia truncata* with  $4 \text{ mg L}^{-1}$  BA. A) Friable callus of the species *H. truncata* at seven days after sowing; B) development of shoots at 42 d after sowing; C) buds with an approximate size of 2 mm at 70 d; D) intense green shoots with leaves approximately 4 mm in size; E) shoots of *H. truncata* developed *in vitro* culture; F) *H. truncata* planted in substrate (perlite, vermiculite, and peat moss).

**Figure 4.** Etapas de diferenciación de *Haworthia truncata* con  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA. A) Callos friables de la especie *H. truncata* siete días después de la siembra; B) desarrollo de brotes 42 días después de la siembra; C) yemas con un tamaño aproximado de 2 mm a los 70 días; D) brotes color verde oscuro con hojas de aproximadamente 4 mm; E) brotes de *H. truncata* desarrollados en cultivos *in vitro*; F) *H. truncata* en sustrato (perlita, vermiculita y musgo de turba).

researchers to exploit the potential that this succulent plant offer.

A culture medium for one species could not be adequate for another, since each responds differently (Martínez-Vázquez and Rubluo, 1989; Infante, 1992; Balch *et al.*, 1998). Therefore, the study of *Haworthia* species must have a micropropagation protocol established for each of the species. The growth regulators were used in previous experiment with good results by induction of callus and shoots, and they are inexpensive growth regulators as compared to others.

sin embargo, en un experimento *in vitro* con brotes en un medio con  $4 \mu\text{M}$  de BA durante nueve meses, no observaron callos ni brotes. Nuestros resultados indican que los explantes obtenidos a partir de hojas pueden ser más factibles para la producción en masa de *H. truncata*, ya que es posible que no se obtenga material vegetativo como semillas e inflorescencias.

De manera similar, el uso de concentraciones más altas de BA como citoquinina ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ - $4 \text{ mg L}^{-1}$ ) induce la proliferación de brotes (Balch *et al.*, 1998; Gratton y Fray, 1999; Rosa-Carrillo *et al.*, 2012; Kordi *et al.*, 2013; Razib *et al.*, 2016; Yen-Ming *et al.*, 2019).

## CONCLUSION

An effective disinfection protocol for the *in vitro* propagation of *Haworthia truncata* was established. The culture medium for the induction of morphogenic callus in the *in vitro* culture of *H. truncata* should contain 1 mg L<sup>-1</sup> NAA+1 mg L<sup>-1</sup> TDZ and 2 mg L<sup>-1</sup> NAA+1 mg L<sup>-1</sup> TDZ growth regulators, plus base leaf in MS salts at 0.5X or 1X, to accelerate the differentiation process. The use of the cytokinin 4 mg L<sup>-1</sup> BA for this succulent species can be useful for shoot induction. With an adequate acclimatization of the species *H. truncata* can reach up to 90% survival. We have described a protocol for propagation by means of organogenesis using leaves of *H. truncata*.

## ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the international cooperative research of Rural Development Administration (RDA) from Republic of Korea, Project No. PJ012429012016. Authors also thank Cactus & Succulent Research Institute. Hernández-Vázquez was awarded with the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología fellowship (930646).

## LITERATURE CITED

- Balch, E. P. M., M. E. P. Reyes, E. V. Amador, E. M. Rangel, L. R. Ruiz, and H. J. L. Viramontes. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34: 131-135.
- Cabahug, R. A. M., S. Y. Nam, K. B. Lim, J. K. Jeon, and Y. J. Hwang. 2018. Propagation techniques for ornamental succulents. *Flower Res. J.* 26: 90-101.
- Gratton J., and F. M. Fay. 1999. *In vitro* propagation of succulent plants. In: R. D. Hall (ed). *Plant Cell Culture Protocols*. Vol III. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp: 135-140.
- Infante, R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocractus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 31: 155-159.
- Jessy, N. S., R. Begum, M. Khatun, and S. S. Alam. 2005. Differential fluorescent chromosome banding of four species in *Haworthia* Duval (Aloaceae). *Cytologia* 70: 435-440.
- Jiang, B. O., Y.G. Yang, Y. M. Guo, Z. C. Guo, and Y. Z. Chen. 2005. Thidiazuron-induced *in vitro* shoot organogenesis of the medicinal plant *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41: 677-681.
- Kaul, K., and P. S. Sabharwal. 1972. Morphogenetic studies on *Haworthia*: Establishment of tissue culture and control of differentiation. *Amer. J. Bot.* 59: 377-385.
- Kim, Y. H., H. H. Kim, G. Y. Lee, J. H. Lee, J. H. Jung, P. Delgado-Sánchez, and S. D. Lee. 2018. Effect of growth

Nueve semanas después de la siembra se observaron las primeras diferenciaciones de los brotes en los tratamientos evaluados (Figura 4). La formación de raíces en el cultivo *in vitro* fue baja; sin embargo, se observó un mayor enraizamiento de los brotes en perlita, vermiculita y musgo de turba (1:1:3) y con un proceso de aclimatización adecuado, 80-90% de supervivencia de la especie (Figura 4F). Nuestra investigación puede contribuir a la conservación y al uso sustentable de *H. truncata*, ya que presentamos un protocolo para la micropropagación clonal a partir de segmentos foliares, lo que permite a los productores e investigadores explotar el potencial que ofrece esta planta suculenta.

Un medio de cultivo para una especie podría no ser adecuado para otra, ya que cada una responde de forma diferente (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Infante, 1992; Balch *et al.*, 1998). Por lo que, el estudio de especies de *Haworthia* debe tener un protocolo de micropropagación establecido para cada una de las especies. Los reguladores de crecimiento se han utilizado en experimentos anteriores con buenos resultados para la inducción de callos y brotes, y son reguladores de crecimiento económicos en comparación con otros.

## CONCLUSIONES

Un protocolo de desinfección eficaz se estableció para la propagación *in vitro* de *Haworthia truncata*. El medio de cultivo para la inducción de callos morfogénicos *in vitro* a partir de explantes de hoja de *H. truncata* debería contener 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ y 2 mg L<sup>-1</sup> de NAA+1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, más un suplemento con sales de MS 0.5X o 1X para acelerar el proceso de diferenciación. Para esta suculenta, el uso de 4 mg L<sup>-1</sup> de la citoquinina BA puede ser útil para la inducción de brotes. Con la aclimatización adecuada de plantas *in vitro* de *H. truncata*, se puede alcanzar una supervivencia de hasta 90%. Hemos descrito un protocolo para la propagación de *H. truncata* mediante la organogénesis a partir de segmentos foliares.

—End of the English version—



- regulators on *in vitro* mass propagation of *Haworthia maughanii*. J. Plant. Biotechnol. 45: 369-374.
- Kordi, M., B. Kaviani, and D. Hashemabadi. 2013. *In vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* using BA and NAA. Euro. J. Exp. Bio. 3: 285-288.
- Lee, D. V. 2010. Succulents Container Gardens. Design Eye-Catching Displays with 350 Easy-Care Plants. Portland. London. Timber Press, Inc. 248 p.
- Liu, B., H. Z. Fang, C. R. Meng, M. Chen, Q. D. Chai, K. Zhang, and S. J. Liu. 2017. Establishment of a rapid and efficient micropropagation system for succulent plant *Haworthia turgida* Haw. J. Hortic. Sci. 52: 1278-1282.
- Liu, B., Y. Zhang, K. Zhang, H. Fang, X. Zhang, and R. Fu. X. Qiu, and R. Xu. 2016. The efficient tissue culture system of *Orostachys fimbriata*. Agric. Sci. 7: 175-180.
- Martínez-Vázquez, O., and A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria San-angelensis*. J. Hortic. Sci. 61: 99-105.
- Mok, M. C., D.W.S Mok, D. J. Armstrong, K. Shudo, Y. Isogai, and T. Okamoto. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). Phytochemistry. 21: 1509-1511.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murthy, B. N. S., S. Murch, and P. K. Saxena. 1995. TDZ-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*). Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. Physiol Plant. 94: 268-276.
- Mycok, D. J., M. P. Watt, K. F. Hannweg, K. Naicker, M. Makwarela, and P. Berjak. 1997. Somatic embryogenesis of two indigenous South African *Haworthia* spp. (*H. linnifolia* and *H. koelmaniorum*). Afr. J. Bot. 63: 345-350.
- Nuzhyna, N. V., and M. M. Gaydarzhy. 2015. Comparative characteristics of anatomical and morphological adaptations of plants of two subgenera *Haworthia* Duval to arid environmental conditions. Acta Agrobot. 68: 23-31.
- OVATA. 2017. Market Research Succulents. *OVATA pure succulents*. 18 p.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. S. Santos-Díaz, R. Ramírez-Malagón, and N. Ochoa-Alejo. 2015. Tissue culture of ornamental cacti. Sci. Agric. 72: 540-561.
- Razib, M. A., A. N. K. Mamun, M. H. Kabir, S. M. S. Al Din, M. E. Hossain, and M. F. Alam. 2016. High frequency *in vitro* propagation of *Aloe vera* L. through shoot tip culture. Int. J. Appl. Biol. Pharm. 7: 28-32.
- Richwine, A. M., J. L. Tipton, and G. A. Thompson. 1995. Establishment of *Aloe*, *Gasteria*, and *Haworthia* shoot cultures from inflorescence explants. Hortscience 30: 1443-1444.
- Rosa-Carrillo, M. L., M. S. Domínguez-Rosales, M. E., Pérez-Reyes, and E. Pérez-Molphe-Balch. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. Interciencia 37: 114-120.
- Scoot, C. 1985. The Genus *Haworthia* (Liliaceae): A Taxonomic Revision. Johannesburg: Aloe Books. South Africa. 150 p.
- Singh, C. K, S. R. Raj, P. S. Jaiswal, V. R. Patil, B. S. Punwar, J. C. Chavda, and N. Subhash. 2016. Effect of plant growth regulators on *in vitro* plant regeneration of sandalwood (*Santalum album* L.) via organogenesis. Agroforestry Syst. 90: 281-288.
- Skaliký, V., M. Kubeš, R. Napier, and O. Novák. 2018. Auxins and cytokinins - the role of subcellular organization on homeostasis. Int. J. Mol. 19: 3115-3136.
- Solis, J. J., M. Reyna, M. Fera, M. A. Cardona, and D. Rojas. 2013. *In vitro* propagation of *Echeveria elegans*, a species of the flora endangered Mexican. J. Environ. Eng. Sci. B2: 555-558.
- Soto, G. M., M. L. Robert, M. E. T. Hernández, A. Gutiérrez, and M. Esqueda. 2019. Organogénesis de rizoma de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) por combinación de auxinas y citocininas. Agrociencia. 53: 549-561.
- Starling, R. J., and J. H. Dodds. 1983. Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. Bradleya 1: 84-90.
- The Plant List. 2013. Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/> (Accessed: January 2019).
- Wiersema, J. H., and B. León. 2013. World Economic Plants: A Standard Reference, Second Edition. CRC Press. 1336 p.
- Yen-Ming, C., H. Jian-Zhi, H. Ting-Wen, and P. I-Chun. 2019. Effects of light intensity and plant growth regulators on callus proliferation and shoot regeneration in the ornamental succulent *Haworthia*. Bot. Stud. 60: 10-17.
- Youssef, H. H., M. A. Hamza, M. Fayed, E. F. Mourad, M. Y. Saleh, M. S. Sarhan, R. M. Suker, A. A. Eltahlawy, R. A. Nemr, M. El-Tahan, S. Ruppel, and N. A. Hegazi. 2016. Plant-based culture media: Efficiently support culturing rhizobacteria and correctly mirror their *in-situ* diversity. J. Adv. Res. 7: 305-316.
- Zang, Q., L. Zhou, F. Zhuge, H. Yang, X. Wang, and X. Lin. 2016. Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. SpringerPlus. 5: 1799.

# EFECTO DE LA RIZOBACTERIA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL *Azospirillum brasilense* SP245 EN LA FOSFOLIPASA D EN PLÁNTULAS DE TRIGO

## EFFECT OF THE PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA *Azospirillum brasilense* SP245 ON THE PHOSPHOLIPASE D IN WHEAT SEEDLINGS

Roberto Daniel Iñaki Durán-Baltazar, Elda Castro-Mercado, Ernesto García-Pineda\*

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edificio A1', Morelia, Michoacán CP 58040, México. (egpineda@umich.mx), (egapineda04@gmail.com).

### RESUMEN

*Azospirillum brasilense* es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal muy utilizada en agricultura. Los cambios moleculares estimulados en la planta por esta rizobacteria durante la interacción se conocen de manera parcial. Uno de los sitios primarios de contacto de la rizobacteria con la célula vegetal es la membrana plasmática. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de *A. brasilense* en la actividad de la fosfolipasa D (PLD) en raíces de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.). La actividad de la enzima se determinó mediante la producción de ácido fosfatídico (AF), el cual es el producto de su catálisis. Plántulas inoculadas con una concentración de  $10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>) de la rizobacteria mostraron una reducción en la producción de AF, en un periodo de inoculación de 5 a 15 min. Esta reducción reflejó un descenso en la actividad de la PLD. La disminución se mantuvo 12 a 48 h, tiempo de duración del estudio y coincidió con la disminución en el crecimiento de las plántulas. La adición exógena de AF estimuló el crecimiento de las plántulas. La producción de AF también disminuyó cuando se adicionó ácido indol-3-acético a las plántulas, lo que permitió sugerir un papel en la modulación de la actividad de la PLD. Los resultados mostraron que la inoculación de plántulas de trigo con *A. brasilense* Sp245 disminuye la actividad de la PLD.

**Palabras clave:** *Azospirillum brasilense*, trigo, fitoestimulantes, fosfolipasa D, auxinas.

### ABSTRACT

*Azospirillum brasilense* is a growth-promoting rhizobacterium in plants, widely used in agriculture. The molecular changes stimulated in the plant by this rhizobacterium during interaction are partially known. One of the primary points of contact of rhizobacteria with the plant cell is the plasma membrane. The aim of this study was to analyze the effect of *A. brasilense* on the activity of phospholipase D (PLD) on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling roots. The enzyme activity was determined by the production of phosphatidic acid (PA), which is the product of PLD catalysis. Seedlings inoculated with a concentration of  $10^6$  colony forming units per milliliter (CFU mL<sup>-1</sup>) of the rhizobacterium displayed a reduction in the production of PA in an inoculation period of 5 to 15 min. This reduction revealed a reduction in the activity of PLD. The reduction was maintained for 12 to 48 h, the duration of the study, and it correlated with the reduction in plant growth. The exogenous addition of PA stimulated the growth of the seedlings. The production of PA also decreased when indol-3-acetic acid was added to the seedlings, which suggested a role in the modulation of PLD activity. The results showed that the inoculation of wheat seedlings with *A. brasilense* Sp245 reduces the activity of PLD.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, wheat, phospholipase D, auxins.

### INTRODUCTION

Bacteria that colonize plant roots and promote their growth are known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). The members of the *Azospirillum* genus are free life rhizobacteria that live in soils of diverse ecological conditions (Bashan *et al.*, 2004). *Azospirillum brasilense* is a model rhizobacterium, used to study

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2019. Aprobado: noviembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 631-642. 2020.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias que colonizan las raíces de las plantas, y promueven su crecimiento se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). Los miembros del género *Azospirillum* son rizobacterias de vida libre que habitan suelos de diversas condiciones ecológicas (Bashan *et al.*, 2004). *Azospirillum brasilense* es una rizobacteria modelo, utilizada para estudiar la promoción del crecimiento vegetal (Cassán *et al.*, 2015). Esta bacteria modifica la morfología y la fisiología del sistema radical de las plantas, e incrementa la proliferación y la elongación de la raíz (Khalid *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2009). Estos cambios aumentan la capacidad de las plantas para absorber nutrientes esenciales y agua (Richardson *et al.*, 2009). Los mecanismos para inducir estos cambios en la raíz incluyen la producción de fitohormonas, como el ácido indol-3-acético (AIA), y el etileno, entre otras (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Sin embargo, los blancos moleculares primarios que activan los cambios en los tejidos de la raíz se desconocen y su estudio permitirá saber cuáles moléculas intervienen en la respuesta de las plantas a la rizobacteria.

La membrana celular es la estructura de la célula donde ocurre el contacto inicial de la planta con los microorganismos. Es uno de los sitios potenciales donde se inicia la respuesta de las plantas y también el proceso de estimulación del metabolismo relacionado con el crecimiento inducido por las rizobacterias. Los fosfolípidos son componentes estructurales principales de la membrana, a los cuales hidrolizan las fosfolipasas. Estas enzimas tienen una función importante durante el proceso normal de crecimiento y desarrollo en las plantas (Frank *et al.*, 2000; Zien *et al.*, 2001).

La fosfolipasa D (PLD; EC 3.1.4.4) es la enzima principal que metaboliza fosfolípidos en las plantas. Esta enzima hidroliza fosfolípidos de membrana y produce ácido fosfatídico (AF), el cual funciona como un segundo mensajero en rutas de transducción de señales (Munnik, 2001). El AF se relaciona con procesos como la germinación (Ritchie y Gilroy, 1998), respuestas a heridas, daño por patógenos (Li y Wang, 2019; den Hartog *et al.*, 2001; van der Luit *et al.*, 2000), y senescencia (Fan *et al.*, 1997). Al menos hay 12 PLD en *Arabidopsis*, con distintas propiedades catalíticas y regulatorias y con diferentes preferencias

the promotion of plant growth (Cassán *et al.*, 2015). This bacterium modifies the morphology and physiology of the plant root system and increase proliferation and elongation of roots (Khalid *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2009). These changes increase the ability of plants to absorb essential nutrients and water (Richardson *et al.*, 2009). The mechanisms to induce these changes in the root include the production of phytohormones, such as indol-3-acetic acid (IAA), ethylene, and others (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). However, the primary molecular targets that activate the changes in root tissues are unknown, and their study will contribute to identify which molecules mediate in the response of plants to rhizobacterium.

Cell membrane is the structure of the cell in which plant initial contact with the microorganisms takes place. It is one of the potential sites where the plant responses begin, along with the stimulation process of the metabolism related to the growth induced by rhizobacteria. Phospholipids are main structural components of cell membrane, which are hydrolyzed by phospholipase enzymes. These enzymes play an important role during normal growth and development processes in plants (Frank *et al.*, 2000; Zien *et al.*, 2001).

Phospholipase D (PLD; EC 3.1.4.4) is the main phospholipid metabolizing enzyme in plants. This enzyme hydrolyzes membrane phospholipids and it produces phosphatidic acid (PA), which acts as the second messenger in signal-transduction pathways (Munnik, 2001). PA is related to processes such as germination (Ritchie and Gilroy, 1998), responses to wounds, damage by pathogens (Li and Wang, 2019; den Hartog *et al.*, 2001; van der Luit *et al.*, 2000), and senescence (Fan *et al.*, 1997). There are at least 12 PLD in *Arabidopsis*, with different catalytic and regulatory properties and with different specific preferences for phospholipids (Wang, 2002, 2000). These isoforms are divided into six types (PLD $\alpha$ , PLD $\beta$ , PLD $\gamma$ , PLD $\delta$ , PLD $\epsilon$  and PLD $\zeta$ ), based on homologies of isoforms genetic sequence and related enzyme activities (Bargmann and Munnik, 2006). Some isoforms participate in the changes in root morphology. For example, the PLD $\epsilon$  isoform promotes growth and biomass accumulation (Hong *et al.*, 2009). PLD activity is studied applying 1-butanol, a specific inhibitor of PA production dependent on PLD (Gardiner *et al.*, 2001).

específicas por fosfolípidos (Wang, 2002, 2000). Estas isoformas se dividen en seis clases (PLD $\alpha$ , PLD $\beta$ , PLD $\gamma$ , PLD $\delta$ , PLD $\epsilon$  and PLD $\zeta$ ), con base en las homología de su secuencia genética y actividades enzimáticas relacionadas (Bargmann y Munnik, 2006). Algunas isoformas participan en los cambios de la morfología de la raíz. Por ejemplo, la isoforma de la PLD $\epsilon$  promueve crecimiento y acumulación de biomasa (Hong *et al.*, 2009). La actividad de la PLD se estudia con la aplicación de 1-butanol, un inhibidor específico de la producción de AF, dependiente de la PLD (Gardiner *et al.*, 2001).

Todavía se desconoce la función de esta enzima durante la estimulación inicial de *A. brasilense* a las raíces de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar si la actividad de la PLD es mediadora de las repuestas estimuladas por *A. brasilense* en plántulas de trigo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

La cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 es una rizobacteria endófitas, aislada de raíces de trigo (Baldani *et al.*, 1986), y amablemente donada por la Dra. Gladys Alexandre, de la Universidad de Tennessee, EE. UU. La cepa bacteriana se mantuvo en medio Luria-Bertani (10 g L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 5 g L<sup>-1</sup> de NaCl, 0.186 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 0.277 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, y 15 g L<sup>-1</sup> de agar).

Las bacterias crecieron en 50 mL de medio de cultivo durante 20 h (hasta la fase exponencial), a 27 °C, con agitación (0.21 x g) constante (Labnet 211DS, Edison, NJ, USA), para preparar el inoculo. El cultivo primero se centrifugó 10 min 12 000 x g (Terlab, Zapopan, Jal, México) y después se lavó dos veces con una solución de NaCl al 0.9%. Las bacterias se resuspendieron en 200  $\mu$ L de NaCl al 0.9% y se realizó un conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Las densidades del inóculo se ajustaron a la concentración final deseada en UFC por mL.

### Germinación de las semillas y tratamientos

Las semillas de trigo (*T. aestivum*) usadas en el estudio fueron del cultivar Nana F2007, una variedad de trigo harinero para siembras de temporal en México. Nana F2007 es de ciclo precoz (85 a 134 d), una altura promedio de 84 cm, y las donó el Dr. Mario González Chavira, del Instituto Nacional de Investigaciones

The function of this enzyme during the initial stimulation of *A. brasilense* in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling roots is still unknown. Therefore, the aim of this investigation was to evaluate whether the activity of PLD mediates those responses stimulated by *A. brasilense* on wheat seedlings.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

The wild strain *A. brasilense* Sp245 is an endophytic rhizobacterium, isolated from wheat roots (Baldani *et al.*, 1986), and kindly donated by Dr. Gladys Alexandre, from the University of Tennessee, U.S.A. The bacterial strain was maintained in Luria-Bertani medium (10 g L<sup>-1</sup> of tryptone, 5 g L<sup>-1</sup> of yeast extract, 5 g L<sup>-1</sup> of NaCl, 0.186 g L<sup>-1</sup> of MgSO<sub>4</sub>, 0.277 g L<sup>-1</sup> of CaCl<sub>2</sub>, and 15 g L<sup>-1</sup> of agar).

Bacteria grew in 50 mL of culture medium for 20 h (until the exponential phase), at 27 °C constantly stirred (0.21 x g) (Labnet 211DS, Edison, NJ, U.S.A.) for the inoculant preparation. The culture was first centrifuged for 10 min 12 000 x g (Terlab, Zapopan, Jal, Mexico), and then washed twice with a 0.9% NaCl solution. The bacteria were resuspended in 200  $\mu$ L of the 0.9% NaCl and the Colony Forming Units (CFU) were counted. The densities of the inoculant were adjusted to the final desired concentration in CFU per mL.

### Germination of seeds and treatments

The wheat (*T. aestivum*) seeds used in the study were taken from the cultivar Nana F2007, a variety of bread wheat for seasonal planting in Mexico. Nana F2007 has a precocious cycle (85 to 134 d), with an average height of 84 cm, and were donated by Dr. Mario González Chavira, of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campus Celaya, Mexico. The seeds were submerged in a sodium dodecyl sulfate (SDS) solution at 1%, stirred for 3 min, and washed 3 times with sterile distilled water. They were then disinfected for 5 min with a chlorine solution at 1%, stirring constantly, and washed four times with sterile distilled water.

Germination took place on beds of cotton filter paper moistened in distilled water in Petri dishes in the dark, at 28 °C for 3 d. After germination, seedlings were selected by their homogeneity in size and transferred to Petri dishes containing solid MS (Murashige and Skoog 1962) medium, pH 5.7, with bacteria or chemical compounds which were added to the MS medium before it solidified at approximately 40 °C.

Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campus Celaya, México. Las semillas se sumergieron en una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, se mantuvieron en agitación 3 min, y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Después se desinfectaron 5 min con una solución de cloro al 1% en agitación constante y se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril.

La germinación fue en camas de algodón de papel filtro humedecido con agua destilada estéril dentro de cajas Petri, en obscuridad a 28 °C durante 3 d. Después de que las semillas germinaron, las plántulas se seleccionaron por su homogeneidad en tamaño y se transfirieron a cajas Petri que contenían medio sólido MS (Murashige y Skoog 1962), pH 5.7, adicionado con bacterias o compuestos químicos, los cuales se adicionaron al medio MS antes de que solidificara, aproximadamente a 40 °C.

Cinco semillas germinadas se colocaron en cada caja, y se usaron cinco cajas por tratamiento (25 semillas en cada una), con dos concentraciones de inóculo,  $1 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. En los tratamientos con los compuestos químicos se utilizaron las siguientes concentraciones de 1-butanol, 1, 10 y 100 mM; etanol y propanol, 10 mM; ácido indol-3-acético, 1  $\mu$ M; ácido fosfatídico, 500 nM. Las longitudes de la hoja y la raíz, y el peso fresco total se analizaron después de tres días de crecimiento.

Raíces de plántulas de 4 d de germinación se sumergieron en una suspensión de bacterias con una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, o bien, en 1  $\mu$ M de ácido indol-3-acético, para las pruebas de la actividad de la PLD en diferentes instancias, y también se realizó la extracción de AF.

### Extracción de ácido fosfatídico

Para la extracción de ácido fosfatídico, 200 mg de tejido de raíz se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido y el polvo se homogenizó en 1 mL de agua desionizada estéril. Las muestras se calentaron por ebullición en baño de agua durante 1 min para desactivar enzimas lipolíticas, y se dejaron enfriar. Los lípidos se extrajeron con modificaciones ligeras de acuerdo con el procedimiento descrito por Bligh y Dyer (1959). Las muestras se mezclaron con 1 mL de cloroformo durante 2 min, en agitador vórtex, se agregó 1 mL de agua, y se mezcló por 30 s. Luego se acidificaron con HCl 6N, se mezclaron durante 5 s y se centrifugaron 10 min a 13 000 x g. El sobrenadante se recuperó y secó bajo el flujo de nitrógeno gaseoso.

Las muestras se resuspendieron en metanol, se aplicaron en láminas para cromatografía en placa fina (TLC) y se desarrollaron en el sistema de solventes (60:35:8, v/v) cloroformo:metanol:amoniaco al 28% (Tanaka *et al.*, 2012). Las placas se revelaron con vapores de yodo durante 3 min. La identificación de AF se realizó con un estándar comercial. Los resultados se registraron con una cámara digital. Después se determinó

Five germinated seeds were placed in each Petri dish and five dishes were used per treatment (25 seeds each), with two concentrations of inoculant,  $1 \times 10^6$  and  $4 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>. For treatments, the following chemical compounds and concentrations were used: 1, 10 and 100 mM 1-butanol; 10 mM ethanol and propanol; 1  $\mu$ M indol-3-acetic acid; and 500 nM phosphatidic acid. Leaf length, root length and total fresh weight were analyzed after three days of growth.

Root seedlings 4 d after germination were submerged in a suspension of  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> bacteria, or in 1  $\mu$ M of indol-3-acetic acid to assess PLD activity at different terms, and the PA extraction was also carried out.

### Extraction of phosphatidic acid

For the extraction of phosphatidic acid, 200 mg of root tissue were crushed in a mortar with liquid nitrogen and the dust was homogenized in 1 mL of sterile deionized water. The samples were boiled for 1 min to neutralize lipolytic enzymes and allowed to cool. Lipids were extracted with slight modifications following the procedure described by Bligh and Dyer (1959). Samples were mixed with 1 mL of chloroform in a vortex stirrer, 1 mL of water was added then and mixed for 30 s. Later, they were acidified with 6N HCl, mixed for 5 s and centrifuged for 10 min at 13 000 x g. The supernatant was recovered and dried under the flow of gaseous nitrogen.

The samples were resuspended in methanol, applied on thin layer chromatography (TLC) plates, and developed in the chloroform:methanol:ammonia (60:35:8, v/v) 28% solvent system (Tanaka *et al.*, 2012). The plates were revealed with iodine vapors for 3 min. The PA was identified with a commercial standard. The results were recorded using a digital camera. Then, the amount of phosphorous in the samples was determined following the procedure by Mrsny *et al.* (1986). The samples were scraped from the plate using a spatula and placed in open glass tubes containing 500  $\mu$ L of perchloric acid. The mixture was homogenized by stirring for 1 min in a vortex and heated in a fume cupboard at 130 °C for 30 min. The tubes were left to cool in ice and after that 3 mL of water, 1 mL of 2.5% ammonium molybdate and 500  $\mu$ L of 10% ascorbic acid were added, and the samples were homogenized by stirring in a vortex for 1 min. The reaction was incubated for 1.5 h at 37 °C in water bath and the absorbance was registered at 820 nm in a spectrophotometer. In order to quantify the amount of phosphorous, a standard curve was created with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

All chemical compounds were obtained from the Sigma-Aldrich company (St. Louis, MO, U.S.A.). The experiments were carried out in triplicate and statistical analysis for each experiment was performed.

la cantidad de fósforo de las muestras de acuerdo con el procedimiento de Mrsny *et al.* (1986). Las muestras se rasparon de la placa con una espátula y se colocaron en tubos de vidrio destapados con 500  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico. La mezcla se homogenizó por agitación en vórtex por 1 min y se calentó en una campana de extracción a 130 °C durante 30 min. Los tubos se enfriaron en hielo y se adicionaron 3 mL de agua, 1 mL de molibdato de amonio al 2.5% y 500  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico al 10%, y las muestras se homogenizaron por agitación en vórtex durante 1 min. La reacción se incubó 1.5 h a 37 °C en baño María y se registró la absorbencia a 820 nm en espectrofotómetro. Para cuantificar la cantidad de fósforo se realizó una curva estándar con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Todos los compuestos químicos se obtuvieron de la compañía Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los experimentos se realizaron por triplicado, y se realizó un análisis estadístico para cada experimento.

#### Análisis estadístico

Los resultados experimentales se expresaron como medias  $\pm$  desviación estándar (DE). El análisis incluyó ANDEVA y prueba de comparación de medias de Tukey para muestras independientes ( $p \leq 0.05$ ).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plántulas de trigo se inocularon con dos concentraciones  $1 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de inóculo de la rizobacteria para el análisis de su efecto sobre el crecimiento. Las dos concentraciones disminuyeron la longitud de la hoja y de la raíz, pero la reducción fue mayor en la raíz. El peso fresco aumentó de forma notable sólo con la concentración más alta (Figura 1). La concentración  $1 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  se utilizó en los demás experimentos para evitar efectos no deseados, debidos a una concentración excesiva de inóculo.

Después se analizó la función de la enzima PLD sobre el crecimiento de plántulas de trigo, con el inhibidor 1-butanol. Para este experimento se usaron concentraciones de inhibidor de 1 a 100 mM. Después de 3 d de tratamiento se analizaron las longitudes de la hoja y de la raíz, las cuales disminuyeron en ambos tejidos y fue dependiente de la concentración del inhibidor (Figura 2A). Un análisis más detallado sobre la morfología de la raíz, tejido en el cual se analizó también el efecto de la rizobacteria sobre la PLD, mostró que el inhibidor redujo la longitud de los pelos de la raíz en presencia de *A. brasilense* (Figura 2B).

#### Statistical analysis

The experimental results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). The analysis included an ANOVA and Tukey's mean comparison test for independent samples ( $p \leq 0.05$ ).

### RESULTS AND DISCUSSION

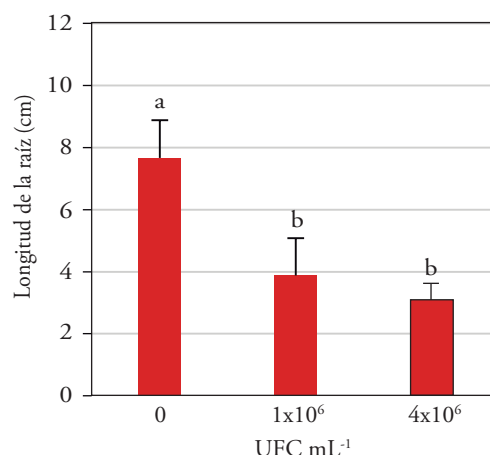
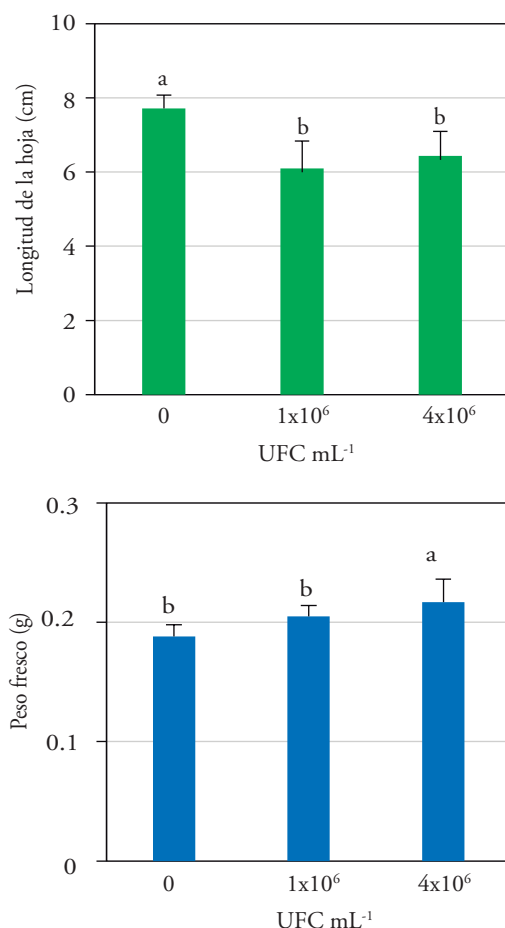
Wheat seedlings were inoculated with two different concentrations,  $1 \times 10^6$  and  $4 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , of rhizobacterium inoculum to analyze at first the effect on the growth. Both concentrations decreased leaf and root lengths, although the decrease was higher in the roots. The fresh weight noticeably increased at the highest concentration alone (Figure 1). The  $1 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  concentration was used for the subsequent experiments to avoid undesired effects due to an excessive concentration of inoculant.

The function of the PLD enzyme on the growth of wheat seedlings was analyzed with the inhibitor 1-butanol. For this experiment, different inhibitor concentrations ranging from 1 to 100 mM were used. After 3 d of treatment, leaf and root lengths were analyzed. There was a decrease in the length of both tissues, and it was dependent of the inhibitor concentration (Figure 2A). A detailed analysis of the root morphology, where rhizobacterium effect on PLD was also assessed, showed that the inhibitor reduced the length of root hairs in the presence of *A. brasilense* (Figure 2B).

In order to study the specificity of 1-butanol on seedlings growth, its effect was compared with two primary alcohols, ethanol, and propanol, using a concentration of 10 mM (Table 1).

The treatments with ethanol and propanol did not reduce the length of leaves and roots; moreover, a growth stimulating effect which was higher in the roots, was observed due to both alcohols. By contrast, 1-butanol reduced 50% the length of both organs, in comparison with untreated seedlings (control). Results suggest a specific inhibitory effect of 1-butanol on seedlings growth, perhaps due to a reduction in the production of PA, the catalytic product of the enzyme. The PA is the second messenger involved in the stimulation of growth and development in plants (Hong *et al.*, 2009; Munnik, 2001).

Rhizobacterium effect on the PLD activity was then analyzed. During the former 15 min, there



**Figura 1.** Efecto de dos concentraciones de *A. brasilense* ( $1 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) en el crecimiento de plántulas de trigo (N=15). Los resultados experimentales se expresaron como media  $\pm$  DE. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos.

**Figure 1.** Effect of two concentrations of *A. brasilense* ( $1 \times 10^6$  and  $4 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) on the growth of wheat seedlings (N=15). The experimental results were expressed as mean  $\pm$  SD. The letters on the bars indicate statistical differences among treatments.

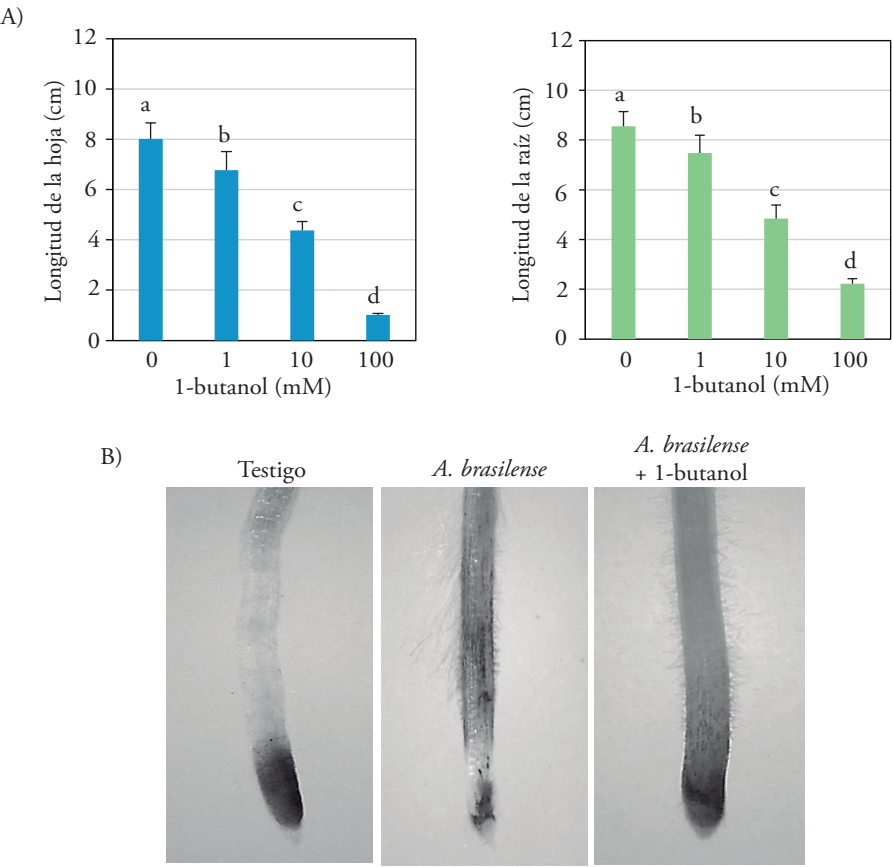
Para estudiar si el efecto del 1-butanol es específico sobre el crecimiento de las plántulas, se comparó su efecto con el de los alcoholes primarios, etanol y propanol, con una concentración de 10 mM (Cuadro 1).

Los tratamientos con el etanol y el propanol no disminuyeron las longitudes de la hoja y de la raíz; incluso hubo un efecto estimulante en el crecimiento de estos dos órganos, en particular el crecimiento fue mayor en la raíz, con ambos alcoholes. En contraste, el 1-butanol redujo en 50% la longitud de los dos órganos, respecto a las plántulas sin tratamientos (testigo). Los resultados sugieren un efecto inhibitorio específico del 1-butanol sobre el crecimiento de las plántulas, que pudo deberse a una disminución en la producción de AF, el producto catalítico de la enzima. El AF es un segundo mensajero relacionado con la estimulación del crecimiento y desarrollo en las plantas (Hong *et al.*, 2009; Munnik, 2001).

was a reduction on PA production, and a further decrease at incubation terms of 24 to 48 h (Figure 3A). These results indicate that the interaction stimulated a reduction on PLD activity, that began within short interaction times. Also, indicating that the rhizobacterium is able to modify the enzyme activity, thus displaying effects on wheat seedlings growth. Experimental results suggest that the decrease of seedlings growth may be partially due to the inhibition of enzymatic activity.

In order to further analyze the enzyme effect on growth, seedlings were grown in presence of exogenous 500 nM PA added to the medium for 3 d, and leaf and root lengths were measured. PA stimulated the growth of both tissues in comparison to untreated control, indicating that PA production is important for seedlings growth (Figure 3B).

PA is the second messenger involved in germination, senescence, and responses to wounds



**Figura 2.** Efecto de 1-butanol sobre el crecimiento de las plántulas y la morfología de la raíz. A) efecto sobre el crecimiento de la hoja y la raíz, B) efecto 10 mM de 1-butanol sobre la morfología de la raíz (N=15). Los resultados experimentales se expresan como media  $\pm$  DE. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas entre las concentraciones.

**Figure 2.** Effect of 1-butanol on seedlings growth and root morphology. A) effect on leaf and root growth, B) effect of 10 mM of 1-butanol on root morphology (N=15). The experimental results are expressed as mean  $\pm$  SD. The letters on the bars indicate statistical differences among concentrations.

Después se analizó el efecto de la rizobacteria sobre la actividad de la PLD. Durante los primeros 15 min disminuyó la producción de AF, la cual fue mayor con tiempos de incubación de 24 a 48 h (Figura 3A). Estos resultados indican que la interacción estimuló una disminución en la actividad de la PLD, y que esta estimulación comienza en tiempos cortos de interacción. Además, que la rizobacteria es capaz de modificar la actividad de la enzima, lo cual tiene efecto en el crecimiento de las plántulas de trigo. Los resultados de este experimento sugieren que la reducción en el crecimiento de las plántulas se podría deber, en parte, a la inhibición de la actividad de la enzima.

**Cuadro 1.** Efecto de diferentes alcoholes sobre el crecimiento de plántulas de trigo.

**Table 1.** Effect of different alcohols on wheat growth seedlings.

| Tratamiento | Crecimiento en longitud (%) |        |
|-------------|-----------------------------|--------|
|             | Hoja                        | Raíz   |
| Testigo     | 100                         | 100    |
| 1-butanol   | 57.79                       | 53.45  |
| Etanol      | 122.01                      | 137.21 |
| Propanol    | 101.14                      | 142.85 |

Los alcoholes se aplicaron a una concentración de 10 mM ♦ Alcoholes were used at 10 mM.  
Control= Plántulas testigo sin tratamiento ♦ Control=Untreated seedlings.

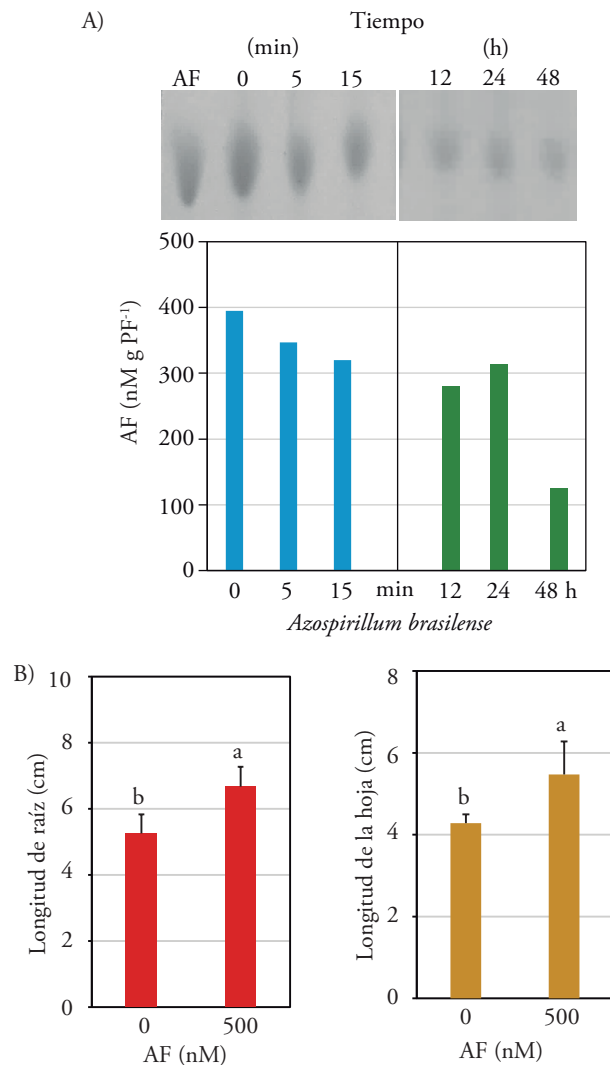
Para analizar con más detalle el efecto de la enzima sobre el crecimiento, plántulas se cultivaron en presencia de 500 nM de AF agregados al medio de crecimiento, durante 3 d, y las longitudes de la hoja y de la raíz se midieron. El AF estimuló el crecimiento de ambos tejidos, respecto al testigo no tratado, lo cual indica que su producción es importante para el crecimiento de la plántula (Figura 3B).

El AF es un segundo mensajero involucrado en la germinación, en la senescencia, en la respuesta a heridas y a patógenos (Ritchie y Gilroy, 1998; Fan *et al.*, 1997; den Hartog *et al.*, 2001). Además, algunos de sus blancos moleculares incluyen las proteínas cinasas y los canales de potasio (Lee *et al.*, 2001; Jacob *et al.*, 1999), lo cual manifiesta su importancia como estimulador de múltiples respuestas celulares. Los resultados de este estudio muestran que el potasio también podría tener una función durante la interacción de *A. brasilense* con plántulas de trigo.

*A. brasilense* es una rizobacteria que produce auxinas (AIA) como un mecanismo para estimular cambios en la morfología de las plantas. Por lo tanto, para analizar si las auxinas se involucran en la modulación de la actividad de la PLD, las raíces de las plántulas se sumergieron en 1  $\mu$ M de AIA durante 0, 5, 15, 30, 60 min y 12, 18, 24 h, para medir el contenido de AF. Este disminuyó según la concentración de AIA, en los primeros 60 min de tratamiento; a las 12 y 24 h, el contenido se redujo más y de forma sostenida (Figura 4). Lo anterior sugiere que la rizobacteria podría modular la actividad de la PLD con la intervención del AIA.

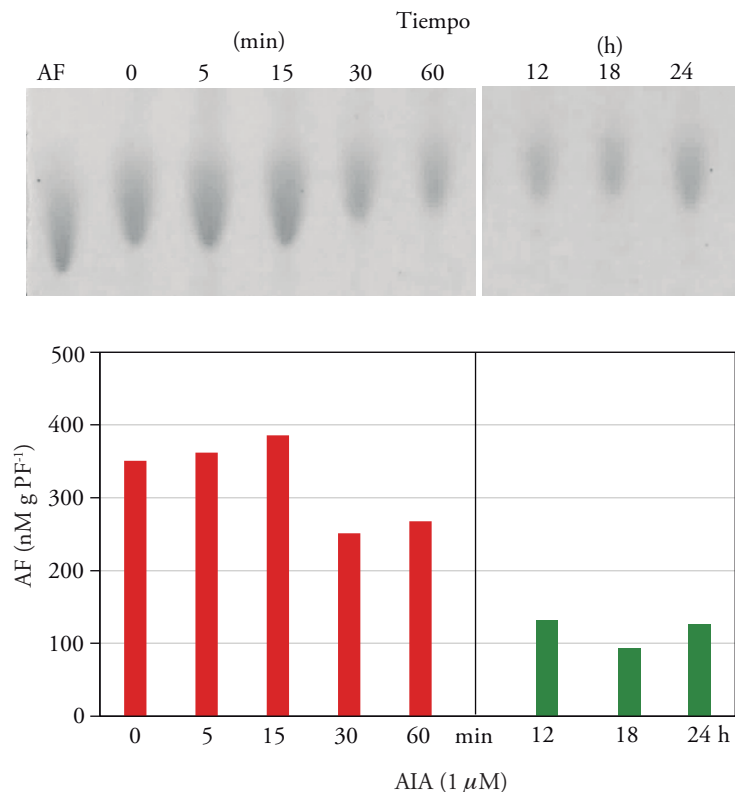
En *Arabidopsis*, se ha informado que una mutación, la cual anula la actividad de la PLD $\epsilon$ , disminuye el crecimiento de la raíz. Mientras que una sobreexpresión incrementa su crecimiento y la elongación de los pelos radicales; el nivel de AF disminuyó o aumentó de acuerdo con la actividad de la enzima (Hong *et al.*, 2009). Es probable que la disminución del tamaño de la raíz en plántulas de trigo inoculadas con la rizobacteria se deba a una disminución en la cantidad de AF.

Las clases de PLD en plantas son PLD $\alpha$ , PLD $\beta$ , PLD $\gamma$ , PLD $\delta$ , PLD $\epsilon$ , y PLD $\zeta$ , las cuales regulan procesos biológicos diversos (Wang *et al.*, 2006). Sin embargo, las estrategias experimentales aplicadas en nuestro estudio no permitieron distinguir con precisión cuál de estas clases estuvo relacionada con la respuesta a la rizobacteria.



**Figura 3.** Efecto de *Azospirillum brasilense* sobre el contenido de AF en la raíz y del AF sobre el crecimiento de plántulas. A) Análisis de AF por TLC (la fotografía en el panel superior) y cuantificación por liberación de fósforo (panel inferior) (ver MM) en diferentes tiempos de interacción con la rizobacteria (N=3). Los resultados experimentales expresados como la media de un experimento representativo. B) Efecto del AF sobre el crecimiento de las plántulas (N=15). AF = ácido fosfatídico. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

**Figure 3.** Effect of *Azospirillum brasilense* on the PA content on the root, and of PA on seedlings growth. A) PA analysis by TLC (photograph on the top panel) and quantification by phosphorous release (lower panel) (see MM) in different times of interaction with the rhizobacterium (N=3). Experimental results are expressed as the mean of a representative experiment. B) Effect of PA on seedlings growth (N=15). PA = phosphatidic acid. Letters on bars indicate statistical differences among treatments.



**Figura 4.** Efecto del AIA sobre el contenido de AF en la raíz.

Las raíces se trataron con 1  $\mu$ M de AIA, se incubaron por tiempos diferentes, se extrajo el AF y se analizó por TLC (fotografía en el panel superior). La cuantificación se realizó por liberación de fósforo (en el panel inferior, ver MM) AF (N=3). Los resultados experimentales se expresaron como la media de un experimento representativo.

**Figure 4.** Effect of AIA on the content of PA in the root.

The roots were treated with 1  $\mu$ M AIA, incubated for different times, and the PA was extracted by TLC (photograph in top panel). Quantification was performed with the release of phosphorous (lower panel, see MM) PA (N=3). Experimental results were expressed as the mean of a representative experiment.

Este estudio mostró evidencia de que la rizobacteria disminuye la actividad de la PLD. Un mecanismo probable para explicar este efecto es que la rizobacteria modula su actividad a través de la producción de auxinas, porque su adición exógena disminuyó la actividad. Otro posible mecanismo, no explorado hasta ahora, es que se podría regular a través de la producción de N-aciletanolaminas (NAEs) por la planta, estimulada por la rizobacteria. Las NAEs son un grupo de lípidos producidos por la hidrólisis catalizada por PLD de N-acilfosfatidiletanolamina, un lípido presente en cantidades bajas en la membrana plasmática (Schmid *et al.*, 1996).

*In vitro*, las NAEs son potentes inhibidores no competitivos de la actividad PLD $\alpha$ , y esta forma específica de PLD no produce NAEs, pero las clases PLD $\beta$  y PLD $\gamma$  sí las producen, lo cual sugiere la

and pathogens (Ritchie and Gilroy, 1998; Fan *et al.*, 1997; den Hartog *et al.*, 2001). PA molecular targets include kinase proteins and potassium channels (Lee *et al.*, 2001; Jacob *et al.*, 1999). These functions display PA relevance as a stimulator of multiple cell responses. The results of this study show that potassium may also have a role while the interaction of *A. brasilense* and wheat seedlings occurs.

*Azospirillum brasilense* is a rhizobacterium that produce auxins (AIA) as a mechanism to stimulate changes in the morphology of plants. Therefore, to analyze whether auxins are involved in the modulation of the PLD activity, root seedlings were immersed in 1  $\mu$ M AIA for 0, 5, 15, 30, 60 min and 12, 18, 24 h and PA content was quantified. A decrease in PA was detected depending on AIA concentration, in the first 60 min of treatments; and at 12 to 24 h,

posibilidad de que los lípidos mediadores, producidos por un tipo de PLD, regulen la actividad de otro tipo de PLD en plantas (Pappan *et al.*, 1998). Experimentos de Chapman (2004) y Blancaflor *et al.* (2003) apoyaron esta hipótesis, porque en ellos, semillas de *Arabidopsis* germinadas en presencia de N-lauriletanolamina (NAE 12:0), una NAE natural, mostraron una inhibición en la elongación de la raíz y una reducción en la formación de pelos de la raíz. Todavía se desconoce si *A. brasilense* estimula la producción de NAEs en las plantas, lo cual representa un aspecto interesante para investigaciones subsecuentes.

Los efectos positivos de *Azospirillum* sobre las plantas han llamado la atención debido a la necesidad de reducir la aplicación de agroquímicos en la agricultura, y se han desarrollado inoculantes basados en esta rizobacteria con aplicación comercial en cultivos de maíz, trigo, arroz y algodón (Coniglio *et al.*, 2019). El uso de *A. brasilense* es parte importante de la agricultura sostenible porque genera un incremento en la productividad de los cultivos y no es un riesgo para el ambiente, pues se trata de uno de los microorganismos del suelo.

El estudio de las respuestas bioquímicas y moleculares que se establecen durante su interacción con las plantas permitirá conocer con más detalle los mecanismos involucrados en los efectos benéficos que esta bacteria provoca en las plantas. Nuestros resultados revelaron una función de la PLD en las plántulas de trigo durante la interacción con *A. brasilense* y abren la probabilidad para explorar el nivel de participación de esta enzima en los cambios estimulados por la rizobacteria en plantas.

## CONCLUSIONES

La inoculación de plántulas de trigo con la rizobacteria *Azospirillum brasilense* disminuyó la actividad de la enzima PLD y mostró que esta tiene una función importante durante la respuesta de la planta a la rizobacteria.

## AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por el apoyo económico para realizar esta investigación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca

PA content showed constant further decrease (Figure 4). This suggest that rhizobacterium modulates PLD activity through AIA.

In *Arabidopsis* it was reported that a null mutation in PLD $\epsilon$  decrease root growth, whereas overexpression increases root hairs growth and elongation. The level of PA decreased or increased according to enzyme activity (Hong *et al.*, 2009). Probably, the decrease in root size of inoculated wheat seedlings with the rhizobacterium is due to a decrease in the amount of PA.

Plant PLD are grouped in a number of classes (PLD $\alpha$ , PLD $\beta$ , PLD $\gamma$ , PLD $\delta$ , PLD $\epsilon$ , and PLD $\zeta$ ), which regulate several biological processes (Wang *et al.*, 2006). However, our experimental strategies did not allow to determine which PLD was related with the response to the rhizobacterium.

This showed evidence on the rhizobacterium reducing PLD activity. An expected mechanism to explain this effect is that rhizobacterium modulates that activity through auxins production, since their exogenous addition reduced PLD activity. Another possible mechanism, unexplored to date, is via the production of N-acylphosphatidylethanolamine (NAEs) by the plant and stimulated by the rhizobacterium. NAEs are a group of lipids produced by hydrolysis catalyzed by the PLD of N-acylphosphatidylethanolamine, a lipid found in low amounts in the plasmatic membrane (Schmid *et al.*, 1996).

*In vitro*, NAEs are powerful, non-competitive inhibitors of PLD $\alpha$  activity; this specific PLD isoenzyme does not produce NAEs, but they are produced by PLD $\beta$  and PLD $\gamma$ , suggesting the possibility that lipids produced by a type of PLD regulate the activity of another PLD type in plants (Pappan *et al.*, 1998). Experiments carried out by Chapman (2004) and Blancaflor *et al.* (2003) supported this hypothesis, for example, *Arabidopsis* seeds germinated in the presence of N-lauryl ethanolamine (NAE 12:0), a natural NAE, inhibited root elongation and reduced the formation of root hairs. Whether *A. brasilense* stimulates the production of NAEs in plants is yet unknown, but it is an interesting issue to further investigation.

The positive effects of *Azospirillum* on plants have drawn attention due to the need to reduce the amounts of agrochemicals used in agriculture, and inoculants have been developed based on this rhizobacterium with commercial uses on maize,

académica No. 598340 otorgada a R. Durán Baltazar, en el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la UMSNH.

## LITERATURA CITADA

- Baldani, J. I., V. L. D. Baldani, L. Seldin, and J. Dobereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bact.* 36: 86-93.
- Bargmann, B. O., and T. Munnik. 2006. The role of phospholipase D in plant stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 515-522.
- Bashan, Y., G. Holguin, and L. E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-77.
- Blancaflor, E. B., G. Hou, and K. D. Chapman. 2003. Elevated levels of *N*-lauroylethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta* 217: 206-217.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Cassán, F. D., Y. Okon, and C. M. Creus. 2015. Handbook for *Azospirillum*. Technical issues and Protocols. Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-06542-7
- Coniglio, A., Mora, V., Puente, M., and F. Cassán. 2019. *Azospirillum* as biofertilizer for sustainable agriculture: *Azospirillum brasilense* AZ39 as a model of PGPR and field traceability. In: Zúñiga-Dávila D., González-Andrés F., Ormeño-Orrillo E. (eds) Microbial Probiotics for Agricultural Systems. Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer, Cham. 256 p.
- Chapman, K. D. 2004. The occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acylethanolamines in plants. *Prog. Lipid Res.* 43: 302-327.
- den Hartog, M., A. Musgrave, and T. Munnik. 2001. Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant J.* 25: 55-65.
- Fan, L., S. Zheng, and X. Wang. 1997. Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 9: 2183-2196.
- Frank, W., T. Munnik, K. Kerkmann, F. Salamini, and D. Bartles. 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12: 111-123.
- Gardiner, J. C., J. D. I. Harper, N. D. Weerakoon, D. A. Collings, S. Ritchie, S. Gilroy, R. J. Cyr, and J. Marc. 2001. A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell* 13: 2143-2158.
- Hong, Y., D. P. Devaiah, B. N. Thamasandra, S. C. Bahn, M. Li, R. Welti, and X. Wang. 2009. Phospholipase D $\alpha$  and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. *Plant J.* 58: 376-87.
- Jacob, T., S. Ritchie, S. M. Assmann, and S. Gilroy. 1999. Abscissic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12192-12197.
- wheat, rice, and cotton crops (Coniglio *et al.*, 2019). *A. brasilense* application is an important component for sustainable agriculture because it produces increases in crop productivity and does not pose risks on the environment, since it is part of soil microbiota.
- The study of biochemical and molecular responses established during the interaction of *Azospirillum* with plants will lead to know those mechanisms involved in the beneficial effects this bacterium produces in plants. Our results revealed a PDL function on wheat seedlings during the interaction with *A. brasilense* and open up the plausibility to explore the level of participation of PDL enzyme on those changes stimulated by the rhizobacterium in plants.

## CONCLUSIONS

The inoculation of wheat seedlings with the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* decreased the activity of PLD enzyme and it showed an important function during the response of the plant to the rhizobacterium.

—End of the English version—



- Khalid, A., M. Arshad, and Z. A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473-480.
- Lee, S., H. Hirt, and Y. Lee. 2001. Phosphatidic acid activates a wound activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J.* 26: 479-486.
- Li, J., and X. Wang. 2019. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity. *Plant Science*. 279: 45-50.
- Mrsny, R. J., Volwerk, J. J., and O. H. Griffith. 1986. A simplified procedure for lipid phosphorus analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure. *Chem. Phys. Lip.* 39: 185-191
- Munnik, T. 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* 6:227-233. *D. Sci. STKE* 111: pe42
- Murashige T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pappan, K., S. Austin-Brown, K. D. Chapman, and X. Wang. 1998. Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D alpha, beta and gamma. *Arch. Biochem. Biophys.* 353: 131-140.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. McNeill, and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in

- the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321: 305-339.
- Ritchie, S., and S. Gilroy. 1998. Absciscic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2697-2702.
- Schmid, H. H., P. C. Schmid., and V. Natarajan. 1996. The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signaling. *Chem. Phys. Lipids* 80: 133-142.
- Steenhoudt, O., and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical, and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 487-506.
- Tanaka, T., A. Kassai, M. Ohmoto, K. Morito, Y. Kashiwada, Y. Takaishi, M. Urikura, J. Morishige, K. Satouchi, and A. Tokumura. 2012. Quantification of phosphatidic acid in foodstuffs using a thin-layer-chromatography-imaging technique. *J. Agric. Food Chem.* 60: 4156-4161.
- van der Luit, A. H., T. Piatti, A. van Doorn, A. Musgrave, G. Felix, T. Boller, and T. Munnik. 2000. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol.* 123: 1507-1515.
- Wang, X. 2000. Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog. Lipid Res.* 39: 109-149.
- Wang, X. 2002. Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 408-414.
- Wang, X. M., S. P. Devaiah, W. H. Zhang, and R. Welti. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* 45: 250-278.
- Zien, C. A., C. Wang., X. Wang, and R. Welti. 2001. *In vitro* substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLD $\alpha$  to wound-induced metabolism of lipids in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1530: 236-248.

# IMPACT OF A SHIFT FROM CONVENTIONAL TO ORGANIC WHEAT FARMING ON SOIL CULTIVABLE FUNGAL COMMUNITIES IN THE YAQUI VALLEY, MEXICO

## IMPACTO DEL CAMBIO EN EL MANEJO DEL CULTIVO DE TRIGO DE CONVENCIONAL A ORGÁNICO SOBRE LAS COMUNIDADES FÚNGICAS CULTIVABLES DEL SUELO EN EL VALLE DEL YAQUI, MÉXICO

Arlett Leticia **Ibarra-Villarreal**<sup>1</sup>, Fannie Isela **Parra-Cota**<sup>2</sup>, Enrico A. **Yepez**<sup>1</sup>, Marco Antonio **Gutiérrez-Coronado**<sup>1</sup>, Luis Carlos **Valdez-Torres**<sup>1</sup>, Sergio **de los Santos-Villalobos**<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Sonora 5 de Febrero 818 Sur, C.P. 85000, Colonia Centro, Ciudad Obregón, Sonora, México. <sup>2</sup>Campo Experimental Norman E. Borlaug-INIFAP Norman E. Borlaug Km 12, C.P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. (sergio.delossantos@itson.edu.mx).

### ABSTRACT

In the Yaqui Valley, the use of organic fertilizers tends to reduce soil degradation in wheat production; however, biological impacts of this practice on soils are not evaluated yet. The aim of this experiment was to quantify the impact of a shift from conventional to organic wheat farming on reduction of the soil fungal degradation, by analyzing cultivable soil fungal population and diversity. The hypothesis was that the input of organic fertilizers to wheat farming leads to positive changes on soil physicochemical properties, which benefits soil fungal populations and decrease degradation. Three wheat commercial fields under 1) conventional synthetic fertilization (SF), 2) synthetic fertilization plus organic fertilization (SF+OF) and 3) only organic fertilization (OF) were selected. The study site under OF and SF+OF sites *vs.* SF showed higher organic matter content (1.5, 1.6 *vs.* 0.45%), fungal population ( $1.7 \times 10^5$ ,  $9.1 \times 10^4$  *vs.*  $1.6 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> dry soil) and diversity (12, 12 *vs.* 2). Based on phylogenetic analysis, 9, 11, and 2 fungal genera were isolated from the study site under organic, synthetic + organic, and synthetic fertilization, respectively. The metabolic diversity of obtained fungal strains showed that the indole production ranged from 0.5 to 65.4 µg mL<sup>-1</sup> where the higher fungal indole producer was *Stachybotrys* sp. TSM35. The higher phosphate solubilization (21%) was observed by the strain *Talaromyces pinophilus* TSO42, and the higher siderophore producer strain was *Volutella ciliata* TSM43, 33.9%. In addition, 60% of the

### RESUMEN

El uso de fertilizantes orgánicos en el Valle del Yaqui tiende a reducir la degradación del suelo en la producción de trigo, sin embargo, todavía no se han evaluado los impactos biológicos de esta práctica en el suelo. El objetivo de este experimento fue cuantificar el impacto del cambio en el manejo del cultivo de trigo, de convencional a orgánico, sobre la reducción de la degradación fúngica del suelo, por medio del análisis de sus poblaciones fúngicas cultivables y su diversidad. La hipótesis fue que la aportación de fertilizantes orgánicos al cultivo de trigo produce cambios positivos en las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo cual beneficia a las poblaciones de hongos, y disminuye su degradación. Tres campos comerciales de trigo se seleccionaron con 1) fertilización sintética convencional (SF), 2) fertilización sintética más fertilización orgánica (SF+OF) y 3) sólo fertilización orgánica (OF). Los sitios de estudio bajo OF y SF+OF *vs.* SF mostraron mayores, contenidos de materia orgánica (1.5, 1.6 *vs.* 0.45%), población de hongos ( $1.7 \times 10^5$ ,  $9.1 \times 10^4$  *vs.*  $1.6 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> de suelo seco) y diversidad (12, 12 *vs.* 2). Con base en el análisis filogenético, se aislaron 9, 11 y 2 géneros de hongos de los sitios de estudio bajo fertilización orgánica, sintética + orgánica y sintética, respectivamente. La diversidad metabólica de las cepas fúngicas obtenidas mostró que la producción de indoles osciló entre 0.5 y 65.4 µg mL<sup>-1</sup>; el hongo *Stachybotrys* sp. TSM35 fue el productor de indoles mayor. La solubilización de fosfatos mayor (21%) se observó en la cepa *Talaromyces pinophilus* TSO42 y la cepa con producción de sideróforos mayor (33.9%) fue *Volutella ciliata* TSM43. Además, el 60% de las cepas mostraron riesgos potenciales para la salud (α- o β-hemólisis). La rotación de convencional a orgánico en el cultivo del trigo logró cambios positivos en las propiedades fisicoquímicas del suelo, en la diversidad

\* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: June, 2019. Approved: December, 2019.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 643-659. 2020.

strains showed potential health risks ( $\alpha$ - or  $\beta$ -hemolysis). Shift from conventional to organic wheat farming accomplished positive changes on soil physicochemical properties and cultivable soil fungal populations, in diversity and metabolic traits. Microbiologic quality control of organic fertilizers is needed to avoid microbial hazards in agronomic systems, caused by the introduction of potentially pathogenic strains.

**Key words:** farming practices, organic matter, fungal diversity, biofertilizers, pathogens.

## INTRODUCTION

The Yaqui Valley, located in the state of Sonora (Mexico), contributes with 49% of the national wheat production ( $1.7 \times 10^6$  Mg  $y^{-1}$ ) (SIAP-SAGARPA, 2018). In this region, agricultural practices have evolved towards maintaining or increasing the wheat productivity ( $\sim 7.0$  Mg  $ha^{-1}$ ) by application of high amounts of synthetic fertilizers, *i.e.* nitrogen (N) ( $263$  kg  $ha^{-1}$ , which has increased 25% from 1980 to 2000),  $P_2O_5$  ( $120$  kg  $ha^{-1}$ ), and  $K_2O$  ( $60$  kg  $ha^{-1}$ ) (Matson, 2012). This intensive agricultural practice combined with semi-arid climatic conditions in the Yaqui Valley probably had negatively impacted the soil fertility, causing low organic matter content ( $<1\%$ ), and saline ( $>4$  dS  $m^{-1}$ ) or alkaline (pH 8.1) soils.

In addition, in that region, the uptake of applied synthetic fertilizers by wheat is low, *i.e.* the N use efficiency is about 38% (Cortés *et al.*, 2011), which generates high economic costs for farmers due to synthetic fertilizers represent 32.7% of the total cost for wheat production. But also, environmental hazards by N leaching and volatilization, producing greenhouse gasses, pollution of groundwater, and ecological and nutrimental imbalances in soils (Cortés *et al.*, 2011; Santiago *et al.*, 2017). In order to reduce these economic and environmental risks, farmers have chosen the application of organic fertilizers to wheat, which improves the soil structure and porosity, water retention capacity, and nutrient bioavailability (Priyadharsini and Muthukumar, 2015).

However, the application of organic fertilizers also modifies the structure, and functional and genetic diversity of the native soil microbiota in agronomic systems (Matson, 2012), which is involved in vital eco-systemic services for the biosphere, such as:

y características metabólicas de las poblaciones fúngicas cultivable. El control de la calidad microbiológica de los fertilizantes orgánicos se necesita para evitar riesgos microbiológicos en los sistemas agronómicos, causados por la introducción de cepas con potencial patógeno.

**Palabras clave:** prácticas agrícolas, materia orgánica, diversidad de hongos, biofertilizantes, patógenos.

## INTRODUCCIÓN

El Valle del Yaqui, situado en el estado de Sonora (México), contribuye con el 49% de la producción nacional de trigo ( $1.7 \times 10^6$  Mg  $y^{-1}$ ) (SIAP-SAGARPA, 2018). En esta región, las prácticas agrícolas han evolucionado hacia el mantenimiento o el aumento de la productividad del trigo ( $\sim 7.0$  Mg  $ha^{-1}$ ), por medio de la aplicación de cantidades altas de fertilizantes sintéticos, *i.e.* nitrógeno (N), cuya aplicación incrementó en un 25% ( $263$  kg  $ha^{-1}$ ) de 1980 a 2000;  $P_2O_5$  ( $120$  kg  $ha^{-1}$ ) y  $K_2O$  ( $60$  kg  $ha^{-1}$ ) (Matson, 2012). Esta práctica agrícola intensiva combinada con las condiciones climáticas semiáridas en el Valle del Yaqui es probable que tuvo un impacto negativo en la fertilidad de sus suelos, al causar un contenido bajo de materia orgánica ( $<1\%$ ) y suelos salinos ( $> 4$  dS  $m^{-1}$ ) o alcalinos (pH 8.1).

Además, en dicha región, la absorción por el trigo de los fertilizantes sintéticos aplicados es baja. Por ejemplo, la eficiencia del uso de N es alrededor del 38% (Cortés *et al.*, 2011), lo cual genera costos económicos altos para los agricultores, debido a que los fertilizantes sintéticos representan el 32.7% del costo total de la producción de este cereal. Sin embargo, el uso ineficiente de N genera peligros ambientales por su lixiviación y volatilización que produce gases de efecto invernadero, contaminación de las aguas subterráneas y desequilibrios ecológicos y nutricionales en los suelos (Cortés *et al.*, 2011; Santiago *et al.*, 2017). Para reducir estos riesgos económicos y ambientales, los agricultores han optado por la aplicación de fertilizantes orgánicos al cultivo de trigo, los cuales mejoran la estructura y la porosidad del suelo, la capacidad de retención de agua y la biodisponibilidad de los nutrimentos (Priyadharsini y Muthukumar, 2015).

Además, la aplicación de fertilizantes orgánicos también modifica la estructura y la diversidad funcional y genética de la microbiota nativa del suelo en los

transformation of organic matter, nutrient cycling, formation and aeration of soil aggregates, carbon sequestration, xenobiotic bioremediation, and growth regulation of plants and phytopathogens (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

Within this microbiota, fungi represent a diverse group of living organisms playing essential roles in agronomic systems, *i.e.* organic matter decomposition, biological control of phytopathogens, and plant growth regulation, by phosphatase activity, succinate, citrate, and lactate production, siderophore biosynthesis, phytohormones production, and activity of hydrolytic enzymes (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013; Priyadharsini and Muthukumar, 2015). However, the incorporation of organic fertilizers with different nutrients composition and quality modifies the fungal microbiota.

Organic fertilizers containing a low C:N ratio (from 20 to 40) favors the short term activation of fungal communities involved in the decomposition of manure, green debris or fresh compost, litter wastes, and root exudates (sugars, starches, and proteins). Organic fertilizers with a high C:N ratio (>80) help the long term activation of fungal communities specialized in decomposition of straw, woody debris or mature compost (cellulose, fats, waxes, resins and lignin) (Leite *et al.*, 2017).

Soil fungal community modifications and their metabolic regulations generated by organic fertilizer applications need to be studied in order to avoid fungal degradation, a key factor driving the soil to limited food production (Mulvaney *et al.*, 2014). In addition, the identification of potential ecological and environmental roles of resulting fungal communities, focused on increasing the crop productivity and quality without potential pathogenic hazards for plants, animals or human (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018); since fungi represent 70% of the total edaphic microbiota, and soil can serve as an infection reservoir for pathogenic microorganisms (Priyadharsini and Muthukumar, 2015).

The aim of this experiment was to quantify the impact of a shift from conventional to organic wheat farming on mitigation of soil fungal degradation, analyzing several approaches, such as: cultivable soil fungal population and diversity, as well as the metabolic traits of resulting strains to identify promising plant growth promoting fungi and phytopathogens. Hypothesis was that the input

sistemas agronómicos (Matson, 2012). Esta participa en diversos servicios ecosistémicos vitales para la biósfera, como la transformación de la materia orgánica, el ciclaje de los nutrientes, la formación y la aireación de los agregados del suelo, el secuestro de carbono, la biorremediación de compuestos xenobióticos y la regulación del crecimiento de los cultivos y microorganismos fitopatógenos (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

Dentro de esta microbiota, los hongos representan un grupo diverso de organismos vivos que desempeñan funciones esenciales en los sistemas agronómicos, *i.e.* la descomposición de la materia orgánica, el control biológico de fitopatógenos y la regulación del crecimiento de las plantas, por medio de la actividad de fosfatasas, la producción de succinato, citrato y lactato, la biosíntesis de sideróforos, la producción de fitohormonas y la actividad de las enzimas hidrolíticas (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013; Priyadharsini y Muthukumar, 2015). Sin embargo, la incorporación de fertilizantes orgánicos con diferente composición y calidad de nutrientes modifica la microbiota fúngica del suelo.

Los fertilizantes orgánicos que contienen una baja relación C:N (de 20 a 40) favorecen la activación a corto plazo de las comunidades fúngicas que intervienen en la descomposición del estiércol, los desechos verdes o la composta fresca, los desechos de la hojarasca y los exudados de las raíces (azúcares, almidones y proteínas). Los fertilizantes orgánicos con una elevada relación C:N (>80) ayudan a la activación a largo plazo de las comunidades fúngicas especializadas en la descomposición del rastrojo, los desechos leñosos o la composta madura (celulosa, grasas, ceras, resinas y lignina) (Leite *et al.*, 2017).

Por eso es necesario estudiar las modificaciones de la comunidad fúngica del suelo y sus regulaciones metabólicas generadas por las aplicaciones de fertilizantes orgánicos a fin de evitar la degradación de dichas comunidades, un factor clave para la producción sostenible de alimentos (Mulvaney *et al.*, 2014). Además, es determinante la identificación de las funciones ecológicas y ambientales de las comunidades fúngicas resultantes involucradas en el aumento de la productividad y la calidad de los cultivos, sin riesgos de contaminación por patógenos a plantas, animales o humanos (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018), dado que los hongos representan el 70% del total de la microbiota edáfica y el suelo puede servir como un

of organic fertilizers to wheat farming leads to positive changes on soil physicochemical properties, which benefit soil fungal populations and decrease degradation.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling sites

This study was carried out selecting three 5 ha- wheat commercial fields (during the 2014 autumn-winter cycle), located at the Yaqui Valley, Sonora (26° 45'-27° 33' N and 109° 30'-110° 37'). These fields received different agricultural practices in terms of fertilizer sources applied to wheat: 1) conventional synthetic fertilizer (SF), 2) synthetic fertilizer plus organic fertilizer (SF+OF), and 3) organic fertilizer (OF). The studied wheat commercial fields received the incorporation of those sources of fertilizers, for long periods of time. The site under SF received the application of ammonia gas and phosphorus for 40 y. The site under SF + OF was managed under SF for 15 y, and the next 25 y it received the application of urea, phosphorus, and bat guano. The study site under OF incorporated chicken manure, earthworm humus, and fish concentrate for 10 y to soil (and the previous 30 y was managed under SF).

Although, for years, study sites incorporated different sources of nutrients, regularly received similar nutrients amounts according to the wheat nutrimental requirements (N, 263 kg ha<sup>-1</sup>; P, 120 kg ha<sup>-1</sup>; and K, 60 kg ha<sup>-1</sup>) (Cortés *et al.*, 2011). Additionally, all sites had the same conventional tillage (subsoiling, fallow, and leveling), irrigation (four times, 13 cm irrigation per time), and planting density (180 kg ha<sup>-1</sup>), resulting in similar wheat yields (~7 Mg ha<sup>-1</sup>).

Four composite soil samples by triplicate of each study site were collected (30 cm depth). Samples collected for physicochemical and nutrimental analyses were transferred to paper bags to dry (60 °C), and then analyzed according to NOM-021-SEMARNAT-2000; while those collected for microbiological analysis (fungal population and diversity) were placed in moist chambers and transported in a cooler at 4 °C (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

### Fungal isolation

This experiment was performed by serial dilutions (1:10) method until 10<sup>-4</sup>. Thus, 10 g of soil were homogenized, during 1 h at 12 x g (using a Lab Companion AAH23475U rotary shaker), with 90 mL of sterile distilled water (121 °C and 103.42 kPa for 15 min). Later, 1 mL of each dilution was inoculated on Petri dishes containing Potato Dextrose Agar as culture medium,

reservorio de microorganismos patógenos (Priyadharsini *et al.*, 2015).

El objetivo de este estudio fue cuantificar el impacto del cambio en el sistema de producción de trigo, de forma convencional a orgánica, sobre la mitigación de la degradación de las poblaciones fúngicas cultivables del suelo, por medio de analizar enfoques tales como la diversidad de las poblaciones de hongos edáficos, así como las características metabólicas de las cepas resultantes, para identificar hongos promotores del crecimiento vegetal o patógenos potenciales. La hipótesis fue que la aportación de fertilizantes orgánicos al cultivo de trigo produce cambios positivos en las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo cual beneficia a las poblaciones de hongos, y disminuye su degradación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitios de muestreo

Para realizar este estudio se seleccionaron tres campos comerciales de trigo de 5 ha (durante el ciclo otoño-invierno de 2014), situados en el Valle del Yaqui, Sonora (26° 45'-27° 33' N y 109° 30'-110° 37'). Los campos se sujetaron a prácticas agrícolas diferentes en cuanto a las fuentes de fertilizantes aplicados al trigo: 1) fertilizante sintético convencional (SF), 2) fertilizante sintético más fertilizante orgánico (SF+OF) y 3) fertilizante orgánico (OF). Los campos comerciales de trigo estudiados recibieron la incorporación de estas fuentes de fertilizantes durante períodos de tiempo largos. El sitio bajo SF recibió la aplicación de gas de amonio y fósforo durante 40 años. El sitio bajo SF + OF se manejó bajo SF durante 15 años y los siguientes 25 años recibió la aplicación de urea, fósforo y guano de murciélago. El sitio de estudio bajo OF incorporó estiércol de pollo, humus de lombriz y concentrado de pescado al suelo durante 10 años (y los 30 años anteriores se manejó bajo SF).

Aunque durante años los sitios de estudio incorporaron fuentes de nutrimentos diferentes, recibieron en forma regular cantidades similares de nutrimentos de acuerdo con los requerimientos nutricionales del trigo (N, 263 kg ha<sup>-1</sup>; P, 120 kg ha<sup>-1</sup>; y K, 60 kg ha<sup>-1</sup>) (Cortés *et al.*, 2011). Además, todos los sitios tuvieron la misma labranza convencional (subsulado, barbecho y nivelación), riego (cuatro veces, 13 cm de riego cada vez) y densidad de siembra (180 kg ha<sup>-1</sup>), todo lo cual dio como resultado rendimientos de trigo similares (~ 7 Mg ha<sup>-1</sup>).

Cuatro muestras compuestas de suelo se recolectaron por triplicado de cada sitio de estudio (30 cm de profundidad). Las muestras para los análisis fisicoquímicos y nutricionales se

supplemented with 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of nalidixic acid. Inoculated Petri dishes were incubated for 2 d, at 28 °C, and Colony Forming Units (CFU) were counted and isolated in order to estimate the fungal population and the macroscopic and microscopic diversity (based on single-spored isolates) for each study site. All obtained fungal isolates were preserved in Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA, [www.itson.edu.mx/COLMENA](http://www.itson.edu.mx/COLMENA)) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

### Molecular identification of fungal isolates

Genomic DNA was extracted from obtained fungal isolates showing different macroscopic and microscopic traits, using the phenol-chloroform method reported by de los Santos-Villalobos *et al.* (2012). The 5.8S rRNA gene amplification was carried out using 50  $\mu\text{L}$  PCR mixture, containing 100 ng genomic DNA as template, 0.2  $\mu\text{mol}$  of ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primers, and 4 U MyTaq DNA polymerase (Bioline). The PCR had an initial denaturation step at 94 °C (3 min), 35 cycles of denaturation at 94 °C (30 s), followed by annealing at 55 °C (30 s), and extension at 72 °C (1 min), and a final step at 72 °C (10 min). The PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose-TAE gel, and the expected amplicons were sequenced by the Sanger platform (Sanger ABI 3730 XL, Applied Biosystem).

The obtained DNA sequences were edited and analyzed using the software FinchTV 1.4.0 by Geospiza, Seattle, WA; and BLAST (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), respectively. In addition, obtained DNA sequences were aligned with ClustalX 2.0.12 (<http://www.clustal.org/>), and analyzed using MEGA 7.0 by the Neighbor-Joining method. 5.8S rRNA sequences of *Coemansia aciculifera* (JN942676) and *Syncephalis depressa* (KY001699) were used as the outgroup. Stability of clades was assessed with 1000 bootstrap replications.

### Indoles production

The production of indole compounds was quantified by a colorimetric experiment described by de los Santos-Villalobos *et al.* (2013).  $1 \times 10^6$  spores of each isolate were inoculated in 10 mL of nutrient broth, supplemented with 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tryptophan, and incubated at 28 °C for 5 d at 12 x g (using a Lab Companion AAH23475U rotary shaker). After the incubation period, the cellular culture was centrifuged at 14000 x g (using a Labnet Hermle Z446K centrifuge) for 10 min, and the supernatant was mixed in a 1:2 volume ratio with Salkowsky reagent, incubating for 30 min in the dark at room temperature. The quantification of the total indole produced by isolates were analyzed at 540 nm in a Biotek ELx800 spectrometer, using an indole acetic acid standard curve (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50 y 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

transfirieron a bolsas de papel para secarlas (60 °C) y luego se analizaron de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000; mientras que las muestras colectadas para los análisis microbiológicos (poblaciones fúngicas y diversidad) se colocaron en cámaras húmedas y transportaron en una hielera a 4 °C (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

### Aislamiento fúngico

Este experimento se realizó por el método de diluciones en serie (1:10) hasta  $10^{-4}$ . Así, se homogeneizaron 10 g de suelo, durante 1 hora a 12 x g (en un agitador rotatorio, Lab Companion AAH23475U), con 90 mL de agua destilada estéril (121 °C y 103.42 kPa durante 15 min). Después, se inoculó 1 mL de cada dilución en cajas Petri que contenían agar dextrosa de papa (PDA) como medio de cultivo, complementado con 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido nalidíxico. Las cajas Petri inoculadas se incubaron durante 2 d a 28 °C y se contaron y aislaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para estimar la población de hongos y la diversidad macroscópica y microscópica (basada en aislamientos de esporulación única) para cada sitio de estudio. Todos los aislados fúngicos obtenidos se conservaron en la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA, [www.itson.edu.mx/COLMENA](http://www.itson.edu.mx/COLMENA)) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

### Identificación molecular de los aislados fúngicos

El ADN genómico se extrajo de aislados fúngicos obtenidos que mostraban diferentes rasgos macroscópicos y microscópicos, con el método de fenol-cloroformo documentado por de los Santos-Villalobos *et al.* (2012). La amplificación del gen 5.8S rRNA se llevó a cabo con el uso de una mezcla de PCR de 50  $\mu\text{L}$ , que contenía 100 ng de ADN genómico como molde, 0.2  $\mu\text{mol}$  de los iniciadores ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y 4 U de ADN polimerasa MyTaq (Bioline). La PCR tuvo un paso de desnaturalización inicial a 94 °C (3 min), 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 s), seguidos de un alineamiento a 55 °C (30 s), una extensión a 72 °C (1 min) y finalización a 72 °C (10 min). Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa TAE al 2% y los amplicones esperados se secuenciaron por medio de la plataforma Sanger (Sanger ABI 3730 XL, Applied Biosystem).

Las secuencias de ADN obtenidas se editaron y analizaron con el software FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA) y BLAST (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), respectivamente. Además, las secuencias de ADN obtenidas se alinearon con ClustalX 2.0.12 (<http://www.clustal.org/>) y analizaron con MEGA 7.0, por el método de unión de vecinos (Neighbor-Joining). Secuencias de los genes 5.8S rRNA de *Coemansia aciculifera* (JN942676) y *Syncephalis depressa* (KY001699) se utilizaron como grupo externo. La estabilidad de los clados se evaluó con 1000 réplicas bootstrap.

### Production of siderophore

Siderophore production by fungal isolates was quantified using CAS- agar (Chromo Azurol S).  $1 \times 10^6$  spores of each isolate were inoculated in Petri dishes containing the culture medium mentioned previously, and incubated at 28 °C during 7 d, then the presence of an orange-yellow halo was observed. CAS-agar was prepared by combining four sterile solutions (121 °C and 103.42 kPa for 15 min). The Fe-CAS indicator solution (solution 1) was prepared with 10 mL of 1 mM  $\text{FeCl}_3$  (dissolved in 1 mM HCl) and 50 mL of CAS ( $1.21 \text{ mg mL}^{-1}$ ), then 40 mL of CTAB ( $1.82 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were added to the resulting blue solution.

The buffer solution (solution 2) was prepared by dissolving 30.24 g of PIPES in 750 mL salt solution (0.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g NaCl, and 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), the pH was adjusted to 6.8 with KOH at  $500 \text{ g L}^{-1}$ , the volume was adjusted to 800 mL, and 15 g agar was added. Solution 3 was prepared by dissolving 2 g glucose, 2 g mannitol, 493 mg  $\text{MgSO}_4$ , 11 mg  $\text{CaCl}_2$ , 1.17 mg  $\text{MnSO}_4$ , 1.4 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.04 mg  $\text{CuSO}_4$ , 1.2 mg  $\text{ZnSO}_4$ , and 1 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  in 70 mL of water. Finally, a solution of 30 mL of  $100 \text{ g L}^{-1}$  casamino acids was sterilized by filtration (solution 4). All solutions were mixed carefully adding at the end the solution 1 (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012).

### Solubilization of phosphates

Spores of each fungal isolate ( $1 \times 10^6$ ) were inoculated on Petri dishes containing Pikovskaya culture medium [0.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g NaCl, 0.1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g KCl, 0.002 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , and 0.002 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ] supplemented with 5 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 10 g glucose, 0.5 g yeast extract, 15 g agar, 0.025 g bromophenol blue. The final volume was adjusted to 1000 mL with distilled water, and pH at 7.0. This culture medium was sterilized at 121 °C and 103.42 kPa for 15 min. The presence of a white-translucid halo by inoculated fungal isolates was observed after 7 d of incubation at 28 °C (Onyia and Anyanwu, 2013). The siderophore production and phosphate solubilization by fungal isolates was quantified using the following equation:

$$\% \text{ Siderophores production or phosphate solubilization} = ((H_1 - H_2) / H_2) \times 100$$

$H_1$  = diameter of halo.

$H_2$  = diameter of the fungal colony.

### Hemolysis

Petri dishes containing blood agar (Becton Dickinson) were inoculated with  $1 \times 10^6$  spores of each obtained fungal isolate, and

### Producción de indoles

La producción de compuestos indólicos se cuantificó por medio de un experimento colorimétrico descrito por de los Santos-Villalobos *et al.* (2013). De cada aislado fúngico se inocularon  $1 \times 10^6$  esporas en 10 mL de caldo nutritivo, y se complementaron con  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de triptófano, e incubaron a 28 °C durante 5 d a  $12 \times \text{g}$  (con un agitador rotatorio, Lab Companion AAH23475U). Después del período de incubación, el cultivo celular se centrifugó a  $14000 \times \text{g}$  (Labnet Hermle Z446K) durante 10 min, y el sobrenadante se mezcló en una relación de volumen de 1:2 con el reactivo Salkowsky, para incubar durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La cuantificación de los indoles totales producidos por los aislados fúngicos se analizó a 540 nm en un espectrómetro Biotek ELx800, con el uso de una curva estándar de ácido indol acético (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50 y  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### Producción de sideróforos

La producción de sideróforos por los aislados fúngicos obtenidos se cuantificó con el uso del agar CAS (Chromo Azurol S). De cada aislado se inocularon  $1 \times 10^6$  esporas en cajas Petri que contenían el medio de cultivo mencionado anteriormente y se incubaron a 28 °C durante 7 d; se observó entonces la presencia de un halo amarillo-anaranjado. El agar CAS se preparó con la combinación de cuatro soluciones estériles (121 °C y 103.42 kPa durante 15 min). La solución indicadora de Fe-CAS (solución 1) se preparó con 10 mL de 1 mM de  $\text{FeCl}_3$  (disuelto en 1 mM de HCl) y 50 mL de CAS ( $1.21 \text{ mg mL}^{-1}$ ), luego se añadieron 40 mL de CTAB ( $1.82 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a la solución azul resultante.

La solución amortiguadora (solución 2) se preparó con 30.24 g de PIPES en 750 mL de solución salina (0.3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g de NaCl y 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), el pH se ajustó a 6.8 con KOH a  $500 \text{ g L}^{-1}$ , el volumen se ajustó a 800 mL y se añadieron 15 g de agar. La solución 3 se preparó con la disolución de 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg de  $\text{MgSO}_4$ , 11 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 1.17 mg de  $\text{MnSO}_4$ , 1.4 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.04 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 1.2 mg de  $\text{ZnSO}_4$  y 1 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  en 70 mL de agua. Por último, una solución de 30 mL de  $100 \text{ g L}^{-1}$  de casaminoácidos (solución 4) se esterilizó por filtración. Todas las soluciones se mezclaron con cuidado con la adición final de la solución 1 (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012).

### Solubilización de fosfatos

Esporas de cada aislado fúngico ( $1 \times 10^6$ ) se inocularon en cajas Petri que contenían el medio de cultivo Pikovskaya [0.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g NaCl, 0.1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g KCl, 0.002 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 0.002 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ] complementados con 5 g

incubated at 28 °C for 48 h. Hemolysis was observed with the presence of a clear zone around the fungal colony ( $\beta$ -hemolysis),  $\alpha$ -hemolysis was observed by the presence of a dark green halo coloration, and  $\gamma$ -hemolysis did not show any type of halo coloration or alteration of the culture medium (Villa-Rodriguez *et al.*, 2019).

### Statistical analyses

All assays were conducted by, at least, three independent replicates. Data were analyzed by one-way analyses of variance (ANOVA) test and Tukey-Kramer method ( $p \leq 0.05$ ), using the Statgraphics Plus software v5.1.

## RESULTS AND DISCUSSION

Soil collected in the study site under SF showed typical physicochemical and nutrimental characteristics reported for the Yaqui Valley, where the low concentration of the organic matter (0.45%) and major nutrients in soil (N: 6.10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , P: 11.07  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , K: 600.23  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), as well as slightly alkaline pH (8.0), helps explain the soil degradation observed in this region (Matson, 2012). On the contrary, incorporation of organic fertilizers to soil showed significant positive impacts on those soil fertility parameters, *i.e.* the study site under OF and SF+OF showed the highest content of soil organic matter (OF and SF+OF *vs.* SF, 1.5% and 1.6% *vs.* 0.45%, respectively), and analyzed major nutrients, compared with the study site under SF (Table 1).

A healthy agricultural soil is one that is capable of supporting the production of food and fiber up to a level and with sufficient quality to meet human requirements, together with continued delivery of other ecosystem services that are essential for maintenance of the quality of life for humans and the conservation of biodiversity. In this study, it was

de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 10 g de glucosa, 0.5 g de extracto de levadura, 15 g de agar y 0.025 g de azul de bromofenol. El volumen final se ajustó a 1000 mL con agua destilada y el pH a 7.0. Este medio de cultivo se esterilizó a 121 °C y 103.42 kPa durante 15 min. La presencia de un halo blanco-translúcido generado por el aislado fúngico inoculado se observó después de 7 d de incubación a 28 °C (Onyia y Anyanwu, 2013). La producción de sideróforos y la solubilización de fosfatos por cada aislado fúngico se cuantificaron con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Producción de sideróforos o solubilización de fosfatos} = ((H_1 - H_2) / H_2) \times 100$$

$H_1$  = diámetro del halo.

$H_2$  = diámetro de la colonia fúngica.

### Hemólisis

Cajas Petri que contenían agar sangre (Becton Dickinson) se inocularon con  $1 \times 10^6$  esporas de cada aislado fúngico obtenido y se incubaron a 28 °C durante 48 h. En ellas se observó hemólisis con la presencia de una zona clara alrededor de la colonia fúngica ( $\beta$ -hemólisis),  $\alpha$ -hemólisis con la presencia de una coloración verde oscuro del halo, y  $\gamma$ -hemólisis, la cual no mostró ningún tipo de coloración de halo o alteración del medio de cultivo (Villa-Rodriguez *et al.*, 2019).

### Análisis estadísticos

Todos los ensayos se hicieron con al menos tres repeticiones independientes. Los datos se analizaron con la prueba de análisis de varianza (ANOVA), el método Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ), y el uso del software Statgraphics Plus v5.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El suelo recolectado en el sitio de estudio bajo SF mostró características fisicoquímicas y nutricionales

**Table 1. Physicochemical and major nutrient characteristics of soil from the three study sites.**

**Cuadro 1. Características fisicoquímicas y de los principales nutrimentos del suelo de los tres sitios de estudio.**

| Study site under | Texture | pH               | OM %             | N                 | P $\mu\text{g g}^{-1}$ | K                    |
|------------------|---------|------------------|------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| SF               | Clay    | 8.01 $\pm$ 0.15a | 0.45 $\pm$ 0.01b | 6.10 $\pm$ 0.57b  | 11.07 $\pm$ 1.00c      | 600.23 $\pm$ 50.42c  |
| SF + OF          | Clay    | 6.92 $\pm$ 0.05c | 1.60 $\pm$ 0.05a | 12.08 $\pm$ 0.50a | 21.10 $\pm$ 2.51b      | 900.89 $\pm$ 90.21b  |
| OF               | Clay    | 7.51 $\pm$ 0.05b | 1.50 $\pm$ 0.03a | 12.12 $\pm$ 0.45a | 75.09 $\pm$ 2.00a      | 1120.98 $\pm$ 30.15a |

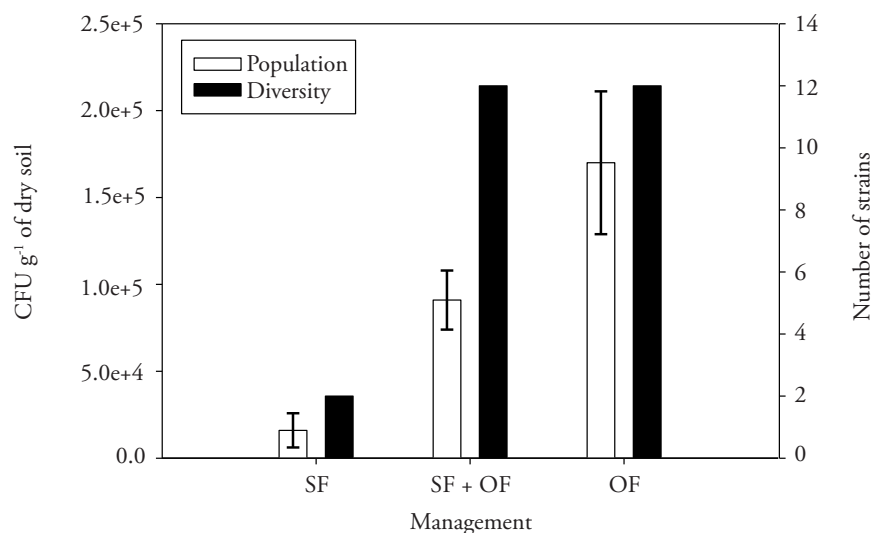
Means with different letter indicate statistical difference (Tukey-Kramer test;  $p \leq 0.05$ ). SF: Conventional synthetic fertilization, SF+OF: Synthetic fertilization + Organic fertilization, and OF: Organic fertilization. ♦ Medias con letra diferente indican diferencia estadística (prueba de Tukey-Kramer;  $p \leq 0.05$ ). SF: Fertilización sintética convencional, SF+OF: Fertilización sintética + Fertilización orgánica, y OF: Fertilización orgánica.

observed a positive impact of the incorporation of organic fertilizers into the soil for increasing, not only its organic matter and nutrients, but also its fungal communities (Figure 1), due to the fungal population and macroscopic-microscopic diversity was higher ( $p \leq 0.05$ ) in the study site under OF ( $1.7 \times 10^5$  CFU  $g^{-1}$  dry soil, 12 strains), compared with those under SF + OF ( $9.1 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$  dry soil, 12 strains), and SF ( $1.6 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$  dry soil, 2 strains).

In addition, the fungal population and diversity showed a positive correlation according to the content of soil organic matter ( $R^2=0.815$  and  $R^2=0.996$ ,  $p \leq 0.05$ ), as a consequence of the organic fertilizer application to the agronomic system (Table 1 and Figure 1). These findings could be explained by the use of organic fertilizers as a substrate for native fungi communities, as well as carriers of exogenous microorganisms, where these find a complex habitat that allows a major success in their establishment (Zhen *et al.*, 2014). Organic fertilizers such as bat guano have been reported for containing  $3.4 \times 10^3$  CFU  $g^{-1}$  dry bat guano, and eight different fungal isolates (Ogórek *et al.*, 2016). Chicken manure is also a suitable matrix for the establishment and reproduction of fungal strains of the genus *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Rhizopus*,

típicas registradas en el Valle del Yaqui, donde la concentración baja de materia orgánica (0.45%), los nutrimentos principales en el suelo (N:  $6.10 \mu g mL^{-1}$ , P:  $11.07 \mu g mL^{-1}$ , K:  $600.23 \mu g mL^{-1}$ ), así como un pH ligeramente alcalino (8.0), ayudan a explicar la degradación del suelo observada en esta región (Matson, 2012). Por el contrario, la incorporación de fertilizantes orgánicos mostró importantes impactos positivos en estos parámetros de fertilidad del suelo, *i.e.* el sitio de estudio bajo OF y SF+OF mostraron los contenidos mayores de materia orgánica en el suelo (OF y SF+OF *vs.* SF, 1.5% y 1.6% *vs.* 0.45%, respectivamente), y de los principales nutrimentos analizados, en comparación con el sitio de estudio bajo SF (Cuadro 1).

Un suelo agrícola sano es aquel que puede sostener la producción de alimentos y fibras hasta niveles y calidad suficientes para satisfacer las necesidades humanas, junto con la prestación continua de otros servicios ecosistémicos que son esenciales para el mantenimiento de la calidad de vida de los seres humanos y la conservación de la biodiversidad. En este estudio, se observó un impacto positivo por la incorporación de fertilizantes orgánicos al suelo para aumentar, no sólo su materia orgánica y nutrimentos, sino también sus comunidades fúngicas (Figura 1),



**Figure 1. Fungal populations and number of strains isolated from the study sites in the Yaqui Valley. SF: application of ammonia gas and phosphorus; SF + OF: application of urea, phosphorus, and bat guano; and OF: application of chicken manure, earthworm humus, and fish concentrate.**

**Figura 1. Poblaciones fúngicas y número de cepas aisladas de los sitios de estudio en el Valle del Yaqui. SF: aplicación de gas de amonio y fósforo; SF + OF: aplicación de urea, fósforo y guano de murciélago; y OF: aplicación de estiércol de pollo, humus de lombriz y concentrado de pescado.**

which were established in the soil after the organic fertilizer application, suggesting versatile metabolic traits of these genera for tolerating soil biotic and abiotic stresses (Escobar *et al.*, 2012).

Phylogenetic analysis based on the amplification and sequencing of the 5.8S rRNA gene, showed that 17 fungal genera were isolated from the study sites. The genus *Mortierella* and *Setophoma* were isolated from the study site under SF (Figure 2), which indicate that *M. alpina* TSQ32 and *S. terrestris* TSQ33 are adapted to intensive agricultural practices used for wheat production in the Yaqui Valley, such as the application of high amount of synthetic fertilizers. *Mortierella* has been strongly associated to dissolve inorganic phosphate from rock phosphate, releasing or immobilizing this nutrient to the soil solution or into mycelia, under the presence of different sources of synthetic nitrogen fertilizers, such as nitrate or ammonia (Habte and Walter, 2012). *Setophoma terrestris*, the causal agent of pink root rot in green onions, has been isolated from agronomic systems under high temperatures, minimal crop rotation, and low content of soil organic matter; such climate and soil conditions are similar to those observed in the Yaqui Valley.

However, Knapp and Kovács (2016) reported that *S. terrestris* utilizes a wide spectrum of carbon sources, which evidences the high metabolic adaptation of this fungal species to substrates having different organic matter content. That dual ability of *S. terrestris* was observed in this study, due to strains TSQ33 and TSM33 belonging to this species were isolated from soil under SF and SF + OF, suggesting the metabolic versatility of *S. terrestris* to use several sources of organic matter for its growth and development (Figure 2).

The study site under SF + OF showed a higher fungal diversity compared with the study site under SF, confirming that 25 years incorporating bat guano to a study site under SF increases the soil fertility, this is, physicochemical parameters and major nutrients, fungal population and diversity (Table 1, Figure 1, and Figure 2). Eleven fungal (genera or species) were identified at the study site under SF + OF, from which one species (*Setophoma terrestris*) was shared with the study site under SF (Figure 2). In addition, seven (63.6%) strains were site-specific genera or species to the study site under SF + OF, *i.e.* *Stachybotrys* sp. TSM35, *Paramyrothecium*

debido a que la población de hongos y la diversidad macroscópica-microscópica fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) en el sitio de estudio bajo OF ( $1.7 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de suelo seco, 12 cepas) en comparación con los sitios bajo SF + OF ( $9.1 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  de suelo seco, 12 cepas) y SF ( $1.6 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  de suelo seco, 2 cepas).

Además, la población y la diversidad de hongos mostraron una correlación positiva con el contenido de materia orgánica del suelo ( $R^2 = 0.815$  y  $R^2 = 0.996$ ,  $p \leq 0.05$ ), como consecuencia de la aplicación de fertilizantes orgánicos al sistema agronómico (Cuadro 1 y Figura 1). Estos hallazgos podrían explicarse por el uso de los fertilizantes orgánicos como sustrato para las comunidades nativas de hongos, así como portadores de microorganismos exógenos, donde éstos encuentran un hábitat complejo que permite un éxito mayor en su establecimiento (Zhen *et al.*, 2014). En los fertilizantes orgánicos como el guano de murciélago se han registrado contenidos de  $3.4 \times 10^3$  UFC  $g^{-1}$  de guano de murciélago seco y ocho aislados diferentes de hongos (Ogórek *et al.*, 2016). El estiércol de pollo es también una matriz adecuada para el establecimiento y la reproducción de cepas de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Rhizopus*, que se establecen en el suelo después de la aplicación de fertilizantes orgánicos, lo cual sugiere rasgos metabólicos versátiles de estos géneros que les confieren una tolerancia mayor al estrés por factores bióticos y abióticos del suelo (Escobar *et al.*, 2012).

El análisis filogenético basado en la amplificación y secuenciación del gen 5.8S ARNr mostró que se aislaron 17 géneros de hongos en los sitios de estudio. Los géneros *Mortierella* y *Setophoma* se aislaron del sitio de estudio bajo SF (Figura 2), lo que indica que *M. alpina* TSQ32 y *S. terrestris* TSQ33 están adaptados a las prácticas agrícolas intensivas utilizadas para la producción de trigo en el Valle del Yaqui, tal como la aplicación de una gran cantidad de fertilizantes sintéticos. *Mortierella* muestra una asociación fuerte con la solubilización del fosfato inorgánico a partir de la roca fosfórica, sea por liberar este nutrimento en la solución del suelo o por inmovilizarlo en el micelio, bajo la presencia de diferentes fuentes de fertilizantes nitrogenados sintéticos, como el nitrato o el amonio (Habte y Walter, 2012). *Setophoma terrestris*, el agente causante de la podredumbre rosada de la raíz en las cebollas verdes, se ha aislado de los sistemas agronómicos sujetos a temperaturas altas, rotación mínima de cultivos y contenido bajo de materia orgánica en

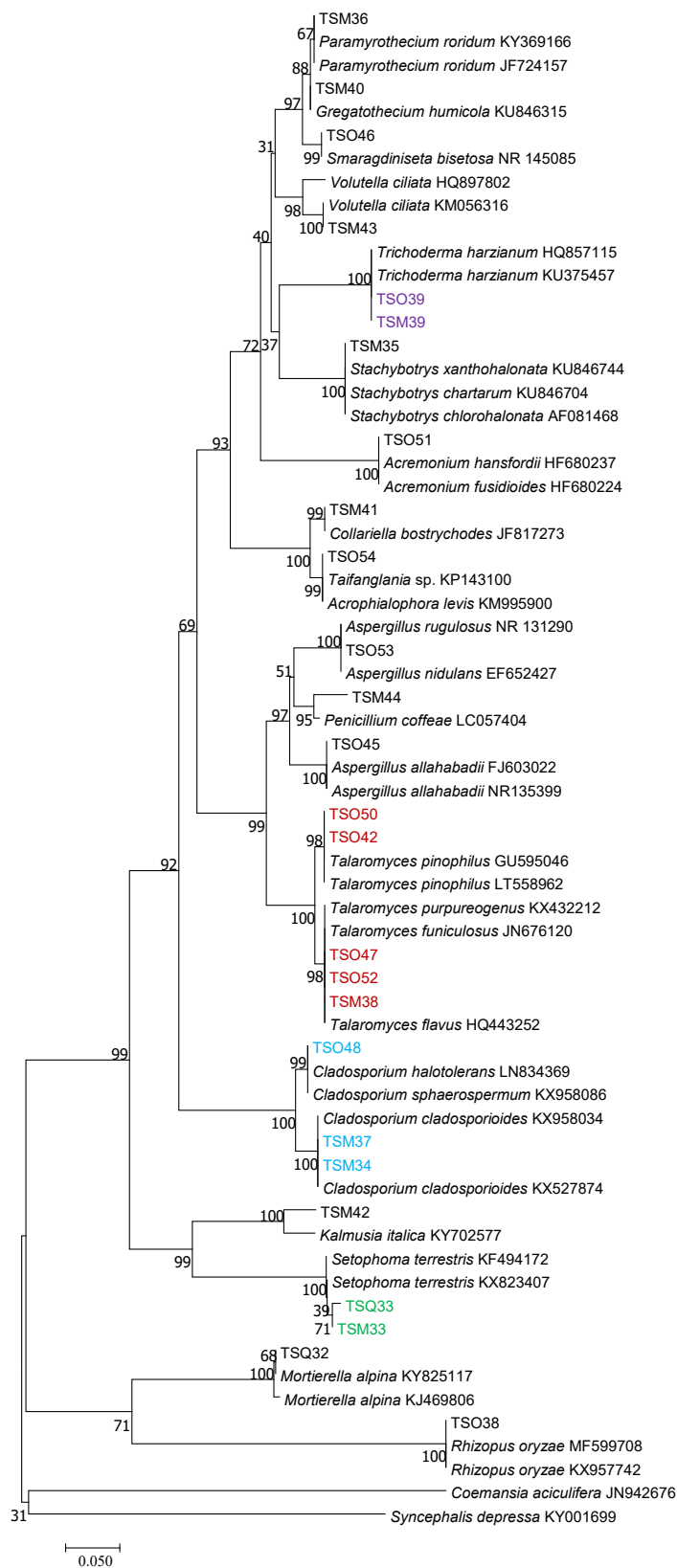


Figure 2. Phylogenetic relationships of obtained fungal strains inferred by neighbor-joining analysis of 5.8S rRNA sequences. *Coemansia aciculifera* (Accession No. JN942676) and *Syncephalis depressa* (Accession No. KY001699) were used as the outgroup. The numbers given over selected branches indicate the percentage of 1000 bootstrap resampled data sets supporting the clade to the right of the branch. Codes indicate the study site where the fungal strains were isolated: TSO = study site under OF, TSM = study site under OF + SF, and TSQ = study site under SF. Strains highlighted with the same color (green, blue, or purple) in different study sites mean that these are shared among them.

Figura 2. Relaciones filogenéticas inferidas con el análisis neighbor joining de las secuencias de 5.8S ARNr de las cepas fúngicas aisladas. *Coemansia aciculifera* (Número de acceso JN942676) y *Syncephalis depressa* (Número de acceso KY001699) se utilizaron como grupo externo. Las cifras sobre las ramas seleccionadas indican el porcentaje de conjuntos de datos remuestreados por los 1000 bootstraps que apoyan el clado a la derecha de la rama. Los códigos indican el sitio de estudio donde se aislaron las cepas de hongos; TSO = sitio de estudio bajo OF, TSM = sitio de estudio bajo OF + SF y TSQ = sitio de estudio bajo SF. Las cepas resaltadas con el mismo color (verde, azul o morado) en sitios diferentes de estudio son cepas compartidas entre ellos.

*roridum* TSM36, *Gregatothecium humicola* TSM40, *Collariella bostrychodes* TSM41, *Kalmusia italica* TSM42, *Volutella ciliata* TSM43, and *Penicillium coffeae* TSM44 (Figure 2).

Those fungal genera and species have been reported living in biological structures with high content of organic matter, since *Stachybotrys*, *Kalmusia*, *Collariella*, *Paramyrothecium*, and *Gregatothecium* have been isolated as saprophytes that grow on wet cellulose-based materials including cardboard, compost, crop straw, decorticated wood, organic litter, and humus in forest soil (Hernández-Restrepo *et al.*, 2017).

*Penicillium* has a vital role in soil decomposition process, driving natural cycling of chemical elements; in particular, the carbon cycle. This genus is one of the most abundant and widely distributed fungi in nature, including organic agronomic systems. All seven site-specific genera or species isolated from the study site under SF + OF were strongly associated to the mycobiota of bat guano, where *Penicillium* has been reported as the largest group (75%) of filamentous fungi in that biological matrix (Ogórek *et al.*, 2016).

The remaining three fungal genera (*Cladosporium*, *Talaromyces*, and *Trichoderma*) isolated from the study site under SF + OF were also found in the study site under OF (Figure 2). Those three genera were isolated worldwide as saprophytes on several substrates, especially organic materials undergoing slow decomposition or rotting wood, in different types of soils (Ogórek *et al.*, 2016, Tranchida *et al.*, 2016; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013), such as those organic substrates applied into the soil under OF (bat guano, chicken manure, fish concentrate, and earthworm humus).

In addition, six site-specific genera or species were isolated from the study site under OF, *Aspergillus allahabadii* TSO45, *Smaragdiniseta bisetosa* TSO46, *Rhizopus oryzae* TSO38, *Acremonium* sp. TSO51, *Aspergillus* sp. TSO53, *Acrophialophora* sp. TSO54 (Figure 2). *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Acremonium*, and *Smaragdiniseta* have been isolated and associated to the chicken manure as well as to healthy soils, which is favorable for improving soil quality and inhibiting soil pathogens in agronomic systems (Escobar *et al.*, 2012). Besides, those genera are the most abundant fungi in soil, improving its fertility by degradation and mineralization of straw, wood, and organic matter (Chen *et al.*, 2018).

el suelo; tales condiciones de clima y suelo son similares a las observadas en el Valle del Yaqui.

Sin embargo, Knapp y Kovács (2016) encontraron que *S. terrestris* utiliza un espectro amplio de fuentes de carbono, lo cual evidencia la elevada adaptación metabólica de esta especie de hongo a sustratos con contenidos diferentes de materia orgánica. Esta capacidad doble de *S. terrestris* se observó en este estudio, debido a las cepas TSQ33 y TSM33 pertenecientes a dicha especie fúngica, las cuales se aislaron de suelos bajo SF y SF + OF. Ello sugiere una versatilidad metabólica de esta especie para utilizar fuentes de materia orgánica diversas para su crecimiento y desarrollo (Figura 2).

El sitio de estudio bajo SF + OF mostró una diversidad de hongos mayor en comparación con el sitio bajo SF, lo cual confirma que la incorporación de guano de murciélago a un sitio antes sujeto a SF por 25 años, aumenta la fertilidad del suelo, esto es, los parámetros fisicoquímicos y principales nutrimentos, la población de hongos y su diversidad (Cuadro 1, Figura 1 y Figura 2). Once géneros o especies de hongos se identificaron en el sitio de estudio bajo SF + OF, de los cuales hubo una especie (*Setophoma terrestris*) compartida con el sitio de estudio bajo SF (Figura 2). Además, siete cepas (63.6%) fueron géneros o especies específicas del sitio de estudio bajo SF + OF, *Stachybotrys* sp. TSM35, *Paramyrothecium roridum* TSM36, *Gregatothecium humicola* TSM40, *Collariella bostrychodes* TSM41, *Kalmusia italica* TSM42, *Volutella ciliata* TSM43 y *Penicillium coffeae* TSM44 (Figura 2).

Dichos géneros y especies de hongos se ha encontrado que colonizan estructuras biológicas con contenidos altos de materia orgánica; por ejemplo, *Stachybotrys*, *Kalmusia*, *Collariella*, *Paramyrothecium* y *Gregatothecium* se han aislado como saprofitos que crecen en materiales húmedos de celulosa, como cartón, composta, rastrojo de cultivos, madera sin corteza, hojarasca orgánica y humus en el suelo forestal (Hernández-Restrepo *et al.*, 2017).

El género *Penicillium* tiene una función vital en los procesos de descomposición en el suelo, al impulsar los ciclos naturales de los elementos químicos; en particular, el ciclo del carbono. Este género es uno de los hongos más abundantes y distribuidos con amplitud en la naturaleza y los sistemas agronómicos orgánicos. Los siete géneros específicos del sitio, aislados en el campo de estudio bajo SF + OF estuvieron asociados con la micobiota del guano de murciélago,

*Acrophialophora* is a soil fungal genus that is widely distributed in temperate and tropical regions, involved in decomposition of compost and other substrates by its capacity to produce large quantities of cellulases and xylanases (Sandoval-Denis *et al.*, 2015). However, this genus includes emerging opportunistic fungi, capable of causing human infections, as it was isolated from some respiratory specimens, and subcutaneous or corneal tissue samples (Sandoval-Denis *et al.*, 2015).

The incorporation of organic fertilizers to agronomic systems (study sites under OF and SF +OF) showed positive impacts on chemical, and biological fertility of soil. However, ecological and environmental roles of the resulting fungal communities, as consequence of organic fertilizer applications, need to be explored for contributing to food safety, without potential fungal hazards by plant, animal, or human pathogens. Thus, a special group of microorganisms (Plant Growth Promoting Microorganisms - PGPM) were studied for their ability to contribute to the soil structure formation, decomposition of organic matter, soil fertility, degradation of organic pollutants, biocontrol of phytopathogens, solubilization of nutrients, and production of plant hormones (Gupta *et al.*, 2015).

The use of these groups of microorganisms in the current agriculture was increased to reduce the application of synthetic fertilizers to agricultural soils, developing a sustainable agriculture. In this study, two strains showed the highest production of indoles (*Stachybotrys* sp. TSM35, 65.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; and *Cladosporium cladosporioides* TSM34, 26.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), which were isolated from the site under SF+OF (Table 2). This phytohormone is involved in regulate plant growth and development by increasing root and plant biomass for nutrient uptake, cell proliferation, xylem development, responses to light, photosynthesis, pigment biosynthesis, and resistance to stressful conditions (Gupta *et al.*, 2015). Seventy-seven percent of the total evaluated strains showed indole productions lower than 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  which suggest that these strains might be not involved in wheat growth regulation by this mechanism. There is evidence of positive effects on root development by fungal strains producing more than 12  $\mu\text{g}$  indoles  $\text{mL}^{-1}$  (Banerjee *et al.*, 2017).

Phosphate solubilization is an important microbial growth promotion mechanism, since most

en la cual se ha documentado que *Penicillium* es el grupo más abundante (75%) de hongos filamentosos dentro de esa matriz biológica (Ogórek *et al.*, 2016).

Los tres géneros de hongos restantes (*Cladosporium*, *Talaromyces* y *Trichoderma*) aislados del sitio de estudio bajo SF + OF también se encontraron en el sitio de estudio bajo OF (Figura 2). Estos tres géneros se han aislado en todo el mundo como saprofitos de sustratos diversos, en especial materiales orgánicos que se descomponen lentamente o de madera en descomposición, en diferentes tipos de suelos (Ogórek *et al.*, 2016, Tranchida *et al.*, 2016; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013), tal como los sustratos orgánicos aplicados al suelo bajo OF (guano de murciélago, estiércol de pollo, concentrado de pescado y humus de lombriz).

Además, se aislaron seis géneros o especies específicos del sitio de estudio bajo OF, *Aspergillus allahabadii* TSO45, *Smaragdiniseta bisetosa* TSO46, *Rhizopus oryzae* TSO38, *Acremonium* sp. TSO51, *Aspergillus* sp. TSO53, *Acrophialophora* sp. TSO54 (Figura 2). Los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Acremonium* y *Smaragdiniseta* se han aislado y asociado con el estiércol de pollo. También se han encontrado en suelos sanos, lo cual es favorable para mejorar la calidad del suelo e inhibir patógenos del suelo en los sistemas agronómicos (Escobar *et al.*, 2012). Además, estos géneros son los hongos más abundantes en el suelo y mejoran su fertilidad por medio de la degradación y mineralización del rastrojo, la madera y la materia orgánica (Chen *et al.*, 2018).

*Acrophialophora* es un género de hongos edáficos de distribución amplia en las regiones templadas y tropicales, y participa en la descomposición del abono y otros sustratos por su capacidad de producir grandes cantidades de celulasas y xilanasas (Sandoval-Denis *et al.*, 2015). Sin embargo, este género incluye hongos oportunistas emergentes, capaces de causar infecciones al ser humano, pues se ha aislado de algunos especímenes respiratorios y muestras de tejido subcutáneo o corneal (Sandoval-Denis *et al.*, 2015).

La incorporación de fertilizantes orgánicos a los sistemas agronómicos (sitios de estudio bajo OF y SF +OF) mostró impactos positivos en la fertilidad química y biológica del suelo. Es necesario explorar las funciones ecológicas y ambientales de las comunidades fúngicas resultantes como consecuencia de las aplicaciones de fertilizantes orgánicos, para contribuir a la inocuidad de los alimentos, al identificar

**Table 2. Metabolic traits of the obtained fungal strains from study sites.****Cuadro 2. Los rasgos metabólicos de las cepas de hongos obtenidas en los sitios de estudio.**

| Taxa                                                        | Indole production ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Phosphate solubilization (%) | Siderophore production (%) | Hemolysis |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------|
| <b>Synthetic fertilizer (SF)</b>                            |                                             |                              |                            |           |
| <i>Mortierella alpina</i> TSQ32                             | 4.9 $\pm$ 0.4 ef                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Setophoma terrestris</i> TSQ33                           | 4.5 $\pm$ 0.1 ef                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\beta$   |
| <b>Synthetic fertilizer plus organic fertilizer (SF+OF)</b> |                                             |                              |                            |           |
| <i>Setophoma terrestris</i> TSM33                           | 0.5 $\pm$ 0.2 h                             | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> TSM34                   | 26.3 $\pm$ 0.5 b                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\alpha$  |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> TSM37                   | 2.4 $\pm$ 0.1 fg                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\alpha$  |
| <i>Talaromyces</i> sp. TSM38                                | 2.0 $\pm$ 0.1 g                             | 5.3 $\pm$ 0.2 d              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\beta$   |
| <i>Trichoderma harzianum</i> TSM39                          | 5.4 $\pm$ 0.6 de                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Stachybotrys</i> sp. TSM35                               | 65.4 $\pm$ 2.6 a                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 15.0 $\pm$ 3.0 b           | $\alpha$  |
| <i>Parasitotrichum roridum</i> TSM36                        | 4.2 $\pm$ 0.3 ef                            | 8.3 $\pm$ 0.3 b              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Gregatohypha humicola</i> TSM40                          | 2.9 $\pm$ 0.2 efg                           | 5.1 $\pm$ 0.1 d              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Collariella bostrychodes</i> TSM41                       | 1.9 $\pm$ 0.1 g                             | 8.2 $\pm$ 0.3 b              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Kalmusia italica</i> TSM42                               | 2.5 $\pm$ 0.5 fg                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 12.3 $\pm$ 0.3 c           | $\alpha$  |
| <i>Volutella ciliata</i> TSM43                              | 6.6 $\pm$ 0.3 d                             | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 33.9 $\pm$ 0.1 a           | $\alpha$  |
| <i>Penicillium coffeae</i> TSM44                            | 1.1 $\pm$ 0.1 g                             | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 10.1 $\pm$ 0.1 d           | $\alpha$  |
| <b>Organic fertilizer (OF)</b>                              |                                             |                              |                            |           |
| <i>Cladosporium</i> sp. TSO48                               | 3.0 $\pm$ 0.1 efg                           | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\alpha$  |
| <i>Talaromyces</i> sp. TSO47                                | 3.7 $\pm$ 0.2 efg                           | 2.9 $\pm$ 0.1 e              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\alpha$  |
| <i>Talaromyces pinophilus</i> TSO50                         | 2.4 $\pm$ 0.3 fg                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\beta$   |
| <i>Talaromyces</i> sp. TSO52                                | 2.7 $\pm$ 0.1 fg                            | 7.4 $\pm$ 0.2 c              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Talaromyces pinophilus</i> TSO42                         | 6.9 $\pm$ 0.2 d                             | 21.0 $\pm$ 1.0 a             | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\beta$   |
| <i>Trichoderma harzianum</i> TSO39                          | 2.4 $\pm$ 0.4 fg                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Aspergillus allahabadii</i> TSO45                        | 7.2 $\pm$ 0.1 d                             | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Smaragdinisetia bisetosa</i> TSO46                       | 8.9 $\pm$ 0.1 c                             | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 9.7 $\pm$ 0.3 d            | $\alpha$  |
| <i>Rhizopus oryzae</i> TSO38                                | 5.0 $\pm$ 0.9 e                             | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\alpha$  |
| <i>Acremonium</i> sp. TSO51                                 | 3.9 $\pm$ 0.2 efg                           | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\beta$   |
| <i>Aspergillus</i> sp. TSO53                                | 2.5 $\pm$ 0.5 fg                            | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |
| <i>Acrophialophora</i> sp. TSO54                            | 3.0 $\pm$ 0.1 efg                           | 0.0 $\pm$ 0.0 f              | 0.0 $\pm$ 0.0 e            | $\gamma$  |

Means with different letter indicate statistical difference (Tukey-Kramer test;  $p \leq 0.05$ ). Strains highlighted with the same color (green, blue, or purple) in different study sites mean that these are shared among them. ♦ Medias con letra diferente indican una diferencia estadística (prueba Tukey-Kramer;  $p \leq 0.05$ ). Las cepas resaltadas con el mismo color (verde, azul o morado) se comparten entre sitios de estudio diferentes.

of the P present in soil is insoluble as iron phosphates ( $\text{FePO}_4$ ) and aluminum phosphates ( $\text{AlPO}_4$ ) in acid soils, and calcium phosphates  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in alkaline soils. In addition, phosphorus is involved in several microbial and plant functions, such as: respiration, photosynthesis, macromolecular biosynthesis, energy transfer, and signal transduction (Gupta *et al.*, 2015).

Twenty-seven percent of evaluated fungal strains showed the phosphate solubilization activity, where *Talaromyces pinophilus* TSO42 (isolated from the site under OF) showed the highest value, 21% (Table 2).

riesgos patogénicos potenciales de los hongos a plantas, animales o humanos. Para esto, se estudió un grupo especial de microorganismos (Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal – PGPM, por sus siglas en inglés) por su capacidad de contribuir a la formación de la estructura del suelo, la descomposición de la materia orgánica, la fertilidad del suelo, la degradación de los contaminantes orgánicos, el biocontrol de los fitopatógenos, la solubilización de los nutrientes y la producción de hormonas vegetales (Gupta *et al.*, 2015).

These findings are like those reported by Banerjee *et al.* (2017), where from 28 to 50% of phosphate solubilization by fungal strains isolated from India was observed. Although fungi can solubilize mineral phosphates in soil by phosphatase activities and organic acids production, values reported here are 375% lower than those observed in bacteria (Ghosh *et al.*, 2012).

Like P, iron is a necessary element for the development of microorganisms and plants, as an enzyme cofactor (Gupta *et al.*, 2015). For that purpose, microorganisms produce siderophores, chelating compounds with low molecular weights that help to promote plant growth and phytopathogen inhibition by iron sequestration (de los Santos Villalobos *et al.*, 2012). Twenty percent of studied fungi strains showed the ability to produce siderophores, from 9.7 to 33.9%, where 33.9% was observed for the strain *Volutella ciliata* TSM43 isolated from the study site under SF+OF (Table 2). However, even when the siderophore production by those fungal strains was lower, these values are typical for fungi (Kumar *et al.*, 2015).

The metabolic diversity associated with plant growth promotion of the obtained fungal strains was not correlated to the study site or the type of organic fertilizer applied to the soil. But these traits appear to be associated to the genetic background of each specific strain. Thus, even when metabolic diversity suggests that most of obtained strains might not be involved in plant growth regulation, other metabolites or mechanisms should be studied to identify promising PGPM contributing to food safety, by formulation and use of microbial inoculants. In addition, these bio-products need to be safe for humans, animals, and plants.

The hemolysis test explores the potential impact of microbial strains on human and animal health, by hemolysins. Forty percent of the studied strains showed  $\gamma$ -hemolysis, which indicates that do not cause any alteration to erythrocytes in the culture medium, suggesting no harm for human and animals. The remaining 60% of studied strains showed potential for human health risks ( $\alpha$ - or  $\beta$ -hemolysis), totally or partially degrading erythrocytes (Villa-Rodriguez *et al.*, 2019). The hemolytic activity of the obtained strains was not completely associated to the source of their isolation or taxonomy; thus, it was a strain-specific trait. *Setophoma terrestris* TSQ33 showed

El uso de estos grupos de microorganismos en la agricultura actual se ha incrementado para reducir la aplicación de fertilizantes sintéticos a los suelos agrícolas, para desarrollar una agricultura sostenible. En este estudio, dos cepas mostraron la producción mayor de indoles (*Stachybotrys* sp. TSM35, 65.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; y *Cladosporium cladosporioides* TSM34, 26.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), las cuales se aislaron del sitio bajo SF+OF (Cuadro 2). Esta fitohormona participa en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas por medio del aumento de la biomasa de las raíces y plantas por la absorción de nutrientes, la proliferación celular, el desarrollo del xilema, las respuestas a la luz, la fotosíntesis, la biosíntesis de los pigmentos y la resistencia a las condiciones de estrés (Gupta *et al.*, 2015). El 77% del total de las cepas evaluadas mostraron producciones de indoles inferiores a 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , esto sugiere que dichas cepas podrían no estar involucradas en la regulación del crecimiento del trigo por este mecanismo. Hay evidencias de efectos positivos en el desarrollo de las raíces al usar cepas de hongos que producen más de 12  $\mu\text{g}$  indoles  $\text{mL}^{-1}$  (Banerjee *et al.*, 2017).

La solubilización de fosfatos es un mecanismo importante de promoción del crecimiento microbiano, ya que la mayor parte del P presente en el suelo es insoluble, como fosfatos de hierro ( $\text{FePO}_4$ ) y fosfatos de aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ) en suelos ácidos y fosfatos de calcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en suelos alcalinos. Además, el fósforo interviene en algunas funciones microbianas y vegetales, como respiración, fotosíntesis, biosíntesis macromolecular, transferencia de energía y transducción de señales (Gupta *et al.*, 2015).

El 27% de las cepas de hongos evaluadas mostraron actividad de solubilización de fosfatos, de ellas, *Talaromyces pinophilus* TSO42 (aislado del sitio bajo OF) exhibió el valor más alto, 21% (Cuadro 2). Estos resultados coinciden con los observados por Banerjee *et al.*, (2017), una solubilización de fosfatos del 28 al 50% en cepas fúngicas aisladas de la India. Aunque los hongos pueden solubilizar los fosfatos minerales en el suelo por actividad de la fosfatasa y producción de ácidos orgánicos, los valores que aquí se consiguen son 375% menores a los observados en bacterias (Ghosh *et al.*, 2012).

Como el P, el hierro es un elemento necesario como cofactor enzimático para el desarrollo de los microorganismos y las plantas (Gupta *et al.*, 2015). Para ello, los microorganismos producen sideróforos,

$\beta$ -hemolysis, and TSM33 showed  $\gamma$ -hemolysis (Table 2).

The evolution of fungal hemolysins for the sole purpose of lysing red blood cells *in vivo* to improve growth is highly unlikely. However, most fungi are saprophytes, growing on or in living tissues, especially in an immune suppressed individual. This metabolic trait may provide an opportunity for colonization and infection, even when the hemolytic activity was not detected ( $\gamma$ -hemolysis), due to animal hosts are a rich source of organic material (Nayak *et al.*, 2013). Thus, several specific and detailed assays need to be developed in order to guarantee that the application of organic fertilizers, or microbial inoculants, may not cause treated soils to be a reservoir for harmful or pathogenic microorganisms to human, animals, or plants; nevertheless they improve the soil fertility and food production.

## CONCLUSIONS

Shift from conventional to organic wheat farming in the Yaqui Valley (Mexico) was accompanied by positive changes on soil physicochemical and nutrimental properties, as well as cultivable soil fungal populations and diversity, at genetic and metabolic levels.

The resulting fungal species have the ability to promote wheat plant growth and inhibit the growth of phytopathogens, but also, they can become pathogens for crops, animals, or human, and their presence in the soil is associated with the origin and source of the applied organic fertilizer.

Microbiological quality control of organic fertilizers applied to soil is necessary to prevent microbial hazards in agronomic systems, caused by the introduction of potentially pathogenic strains.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for funding the research through: the scholarship (CVU 479660) granted to A.L. Ibarra Villarreal; CONACYT Cátedras Program (Project 1774) "Alternativas agrobiotecnológicas para incrementar la competitividad del cultivo de trigo en el Valle del Yaqui: desde su ecología microbiana hasta su adaptabilidad al cambio climático"; CONACYT Project 253663, "Fortalecimiento de la infraestructura del Laboratorio de Biotecnología del Recurso

compuestos quelantes de peso molecular bajo que ayudan a promover el crecimiento de las plantas y la inhibición de fitopatógenos por medio del secuestro de hierro (de los Santos Villalobos *et al.*, 2012). El 20% de las cepas de hongos estudiadas mostraron la capacidad de producir sideróforos, de 9.7 a 33.9%, donde se observó un 33.9% para la cepa *Volutella ciliata* TSM43 aislada del sitio de estudio bajo SF+OF (Cuadro 2). Sin embargo, incluso cuando la producción de sideróforos por parte de estas cepas fúngicas es baja, esos valores son los documentados de forma típica en hongos (Kumar *et al.*, 2015).

La diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal de las cepas fúngicas obtenidas no se correlacionó con el sitio del estudio, ni con el tipo de fertilizante orgánico aplicado al suelo. Pero estos rasgos parecen asociarse con los antecedentes genéticos de cada cepa en específico. Por lo tanto, aun cuando la diversidad metabólica sugiera que la mayoría de las cepas obtenidas podrían no estar involucradas en la regulación del crecimiento vegetal, otros metabolitos o mecanismos deberían estudiarse para identificar los PGPM prometedores que contribuyan a la seguridad alimentaria, con la formulación y el uso de inoculantes microbianos. De manera adicional, estos bioproductos deben ser inocuos para seres humanos, animales y plantas.

La prueba de hemólisis explora el impacto potencial de las cepas microbianas en la salud humana y animal por medio de las hemolisinas. El 40% de las cepas estudiadas mostraron  $\gamma$ -hemólisis, lo cual indica que no causan alteración a los eritrocitos en el medio de cultivo, y sugiere que no causan daño a humanos o animales. El 60% restante de las cepas estudiadas mostraron un riesgo potencial para la salud humana ( $\alpha$ - o  $\beta$ -hemólisis), por degradación parcial o total de eritrocitos (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). La actividad hemolítica de las cepas obtenidas no se asoció por completo a la fuente de su aislamiento o taxonomía; por lo tanto, este rasgo es específico por cepa. La cepa TSQ33 *Setophoma terrestris* mostró  $\gamma$ -hemólisis y la cepa TSM33 mostró  $\beta$ -hemólisis (Cuadro 2).

La evolución de las hemolisinas fúngicas con el propósito único de lisar los glóbulos rojos *in vivo* para mejorar el crecimiento es muy poco probable. Sin embargo, la mayoría de los hongos son saprófitos, que crecen en o sobre tejidos vivos, en especial en un individuo inmunosuprimido. Esta característica

Microbiano del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) para la creación de COLMENA [COLección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos], para contribuir a la seguridad alimentaria regional y nacional”; and to CONACYT Project 257246, “Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agrobiotecnológico”.

## LITERATURE CITED

- Banerjee, A., D. A. Bareh, and S. R. Joshi. 2017. Native microorganisms as potent bioinoculants for plant growth promotion in shifting agricultural (*Jhum*) systems. *J. Soil. Sci. Plant. Nutr.* 17: 127-140.
- Chen, X., X. Wang, T. A. Zhang, Y. Li, J. Hu, Y. F. Tsang, H. Zhang, and M. T. Gao. 2018. Influence of rice straw-derived dissolved organic matter on lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*. *J. Biosci. Bioen.* 2: 1-7.
- Cortés, J., M., G. Fuentes D., J. E. Ortiz E., L. M. Tamayo E., E. Cortez M., A. A. Ortiz A., P. Félix V., y I. Armenta C. 2011. Agronomía del trigo en el sur de Sonora Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Norman E. Borlaug. México. 238 p.
- De los Santos- Villalobos, S., F. I. Parra-Cota, A. Herrera S., B. Valenzuela A., y J. C. Estrada M. 2018. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9: 191-202.
- De los Santos-Villalobos, S., D. A. Guzmán-Ortiz, M. A. Gómez-Lim, J. P. Delano-Frier, S. de-Folter, P. Sánchez-García, J. J. Peña-Cabriaes. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biol. Control.* 64: 37-44.
- De los Santos-Villalobos, S., L. E. Hernández-Rodríguez, F. Villaseñor-Ortega, y J. J. Peña-Cabriaes. 2012. Production of *Trichoderma asperellum* T8a spores by a “home- made” solid-state fermentation of mango industrial wastes. *BioResources* 7: 4938-4951.
- Escobar E., N., J. Mora D., y N. J. Romero J. 2012. Identificación de poblaciones microbianas en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca (Colombia). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas.* 16: 75-88.
- Ghosh, U., P. Subhashini, E. Dilipan, S. Raja, T. Thangaradjou, and L. Kanna. 2012. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from seagrass rhizosphere soil. *J. Ocean. Univ. China* 11: 86-92.
- Gupta, G., S. Singh P., N. Kumar A., S. Kumar S., and V. Singh. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem.* 7: 96-102.
- Habte, M., and Walter N. O. 2012. Effect of nitrogen form on the effectiveness of a phosphate-solubilizing fungus to dissolve rock phosphate. *J. Biofertil. Biopestici.* 3: 1-4.
- Hernández-Restrepo, M., J. Gené, R. F. Castañeda-Ruiz, J. Mena-Portales, P. W. Crous, and J. Guarro. 2017. Phylogeny of saprobic microfungi from southern Europe. *Stud. Mycol.* 86: 53-97.
- metabólica puede brindar una oportunidad para la colonización y la infección, incluso cuando no se detecte actividad hemolítica ( $\gamma$ -hemolysis), debido a que los hospederos animales de hongos son una fuente rica en material orgánico (Nayak *et al.*, 2013). Así pues, es necesario desarrollar diversos ensayos específicos y detallados con el fin de garantizar que la aplicación de fertilizantes orgánicos, o inoculantes microbianos, no provoque que los suelos tratados sean una reserva de microorganismos nocivos o patógenos para seres humanos, animales o plantas, aun cuando mejoren la fertilidad del suelo y la producción de alimentos.

## CONCLUSIONES

El cambio del cultivo de trigo convencional a orgánico en el Valle del Yaqui (México) estuvo acompañado de cambios positivos en las propiedades físico-químicas y nutrimentales del suelo, así como en las poblaciones fúngicas cultivables del suelo, en su diversidad genética y metabólica.

Las especies fúngicas resultantes tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas e inhibir el crecimiento de fitopatógenos, pero también, pueden resultar patogénicas para cultivos, animales o seres humanos, y su presencia en el suelo se asocia con el origen y la fuente del fertilizante orgánico aplicado.

El control de la calidad microbiológica de los fertilizantes orgánicos aplicados al suelo es necesario para prevenir el riesgo microbiológico en los sistemas agronómicos, causado por la introducción de cepas con potencial patogénico.

—Fin de la versión en Español—



- Knapp, D. G., and G. M. Kovács. 2016. Interspecific metabolic diversity of root-colonizing endophytic fungi revealed by enzyme activity tests. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 92: 1-10.
- Kumar, G. S., S. Pal, and N. Chakraborty. 2015. The qualitative and quantitative assay of siderophore production by some microorganisms and effect of different media on its production. *Int. J. Chem. Sci.* 13: 1621-1629.
- Leite, M., Y. Pan, J. Bloem, H. Ten B., and E. E. Kuramae. 2017. Organic nitrogen rearranges both structure and activity of the soil-borne microbial seedbank. *Sci. Rep. UK.* 7: 1-11.

- Matson, P. A. 2012. *Seeds of Sustainability Lessons from the Birthplace of the Green Revolution*. Island Press. Washington. 250 p.
- Mulvaney, M. J., N. Verhulst, J. M. Herrera, M. Mezzalama, and B. Govaerts. 2014. Improved wheat performance with seed treatments under dry sowing on permanent raised beds. *Field. Crops. Res.* 164: 189-198.
- Nayak, A.P., B.J. Green, and D. H. Beezhold. 2013. Fungal hemolysins. *Med. Mycol.* 51: 1-16.
- Ogórek, R., M. Dylag, B. Kozak, Z. Visnovska, D. Tancinova, and A. Lejman. 2016. Fungi isolated and quantified from bat guano and air in harmanecká and driny caves (Slovakia). *J. Caves. Karst. Stud.* 78: 41- 49.
- Onyia, C. E., and C. U. Anyanwu. 2013. Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil. *J. Yeast. Fungal. Res.* 4: 52-45.
- Priyadharsini, P., and T. Muthukumar. 2015. Insight into the role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable agriculture. *In: Thangavel P, G. Sridevi (eds). Environmental Sustainability*. Springer. New Delhi, India. pp: 3-35.
- Sandoval-Denis, M., J. Gené, D. A. Sutton, N. P. Wiederhold, and J. Guarro. 2015. *Acrophialophora*, a poorly known fungus with clinical significance. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1549-1555.
- Santiago, C. D., S. Yagi, M. Ijima, T. Nashimoto, M. Sawada, S. Ikeda, K. Asano, Y. Orikasa, and T. Ohwada. 2017. Bacterial compatibility in combined inoculations enhances the growth of potato seedlings. *Microbes environ.* 32: 14-23.
- SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2018. Atlas agroalimentario 2012-2018. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018) REFERENCIA INCOMPLETA. Falta agregar la fecha de consulta; Brenda, puedes agregar la fecha del mes de recepción, si el autor la desconoce.
- Tranchida, M. C, N. D. Centeno, S. A. Stenglein, and M. N. Cabello. 2016. First record of *Talaromyces udagawae* in soil related to decomposing human remains in Argentina. *RAM.* 48: 86-90.
- Villa-Rodríguez, E, F. Parra-Cota, E. Castro-Longoria, J. Lopez-Cervantes, S. de los Santos-Villalobos. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biol Control.* 132:135-143.
- Zhen, Z., H. Liu, N. Wang, L. Guo, J. Meng, N. Ding, G. Wu, and G. Jiang. 2014. Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in china. *PLOS ONE.* 9: 1-11.



# EPIDEMIOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS EN TRES ÁREAS PRODUCTORAS DE OVINOS DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

## EPIDEMIOLOGY OF BRUCELLOSIS IN THREE SHEEP PRODUCTION AREAS OF THE STATE OF VERACRUZ, MEXICO

Daniela Lucia **Román-Ramírez**<sup>1</sup>, David Itzcoatl **Martínez-Herrera**<sup>1\*</sup>, Álvaro Enrique de Jesús **Peniche-Cardena**<sup>1</sup>, José Alfredo **Villagómez-Cortés**, Juan Felipe de Jesús **Torres-Acosta**<sup>2</sup>, Ricardo **Flores-Castro**<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Circunvalación esquina Yáñez s/n, Colonia Unidad Veracruzana, Puerto de Veracruz, 91710, Veracruz, México. (mvzduroman@live.com.mx), (dmartinez@uv.mx), (apeniche@uv.mx), (avillagomez@uv.mx), Carretera Mérida-Xmatkuil Km 15.5, Tizapán, 97100, Mérida, Yucatán, México. (jftorresacosta@gmail.com), CENID Microbiología Animal-INIFAP, Km 15.5 Carretera México-Toluca, Colonia Palo Alto, 05110, Ciudad de México (florescastro@hotmail.com).

### RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis con morbilidad alta y distribución mundial, causada por especies del género *Brucella* que afectan a otras especies productivas. Aunque se ha estudiado en forma amplia en bovinos y en caprinos, se desconoce el comportamiento epidemiológico de la enfermedad en ovinos, por lo cual el objetivo fue realizar un estudio epidemiológico (seroprevalencia, factores de riesgo y distribución espacial) de la brucelosis en las principales áreas de producción ovina del estado de Veracruz. Como hipótesis se esperaba una seroprevalencia del 50% con factores de riesgo asociados en las áreas elegidas de producción de ovinos. El estudio fue transversal polietápico y estratificado y se incluyeron 414 ovinos de 55 Unidades de Producción (UP) seleccionadas por conglomerados. El diagnóstico fue en serie con la prueba de tarjeta como tamiz e inmunodifusión radial como confirmatoria. La seroprevalencia se determinó con el programa en línea VassarStats y los Factores de Riesgo (FR) por razón de momios con el programa en línea Win Epi. La distribución espacial de las unidades de producción se georreferenció y los mapas de distribución espacial se elaboraron con el software QGIS 2.10.1. La seroprevalencia general fue 1% (IC<sub>95%</sub>: 0.3 a 2.6) y por unidad de producción fue 3.6% (IC<sub>95%</sub>: 0.6 a 13.6). No se identificaron factores de riesgo asociados con la presencia de brucelosis ovina, pero se confirmó seroprevalencia baja de la enfermedad en dos unidades de producción en los municipios de Perote y Altotonga.

### ABSTRACT

Brucellosis is a zoonosis with high morbidity and worldwide distribution, caused by species of the genus *Brucella* that affect other productive species. There is ample experience studying the disease in cattle and goats; however, its epidemiological behavior in sheep is unknown. Therefore, our objective was to carry out an epidemiological study (seroprevalence, risk factors, and spatial distribution) of brucellosis in the main sheep production areas of the state of Veracruz. As hypothesis, we expected a 50% seroprevalence with associated risk factors in the chosen sheep producing areas. The study was multistage cross-sectional and stratified, and included 414 sheep from 55 farm (UP, production units) selected by conglomerates. The diagnosis was serial with the card test as screening and radial immunodiffusion as confirmatory. We determined seroprevalence with the online program VassarStats and the Risk Factors (FR) for odds ratio with the online program Win Epi. Also, we geo-referenced the spatial distribution of the production units, and mapped them by using the QGIS 2.10.1 software. The overall seroprevalence was 1% (95% CI: 0.3 to 2.6) and per production unit was 3.6% (95% CI: 0.6 to 13.6). We identified no risk factors associated with the presence of ovine brucellosis, but confirmed the disease with low seroprevalence in two production units at the municipalities of Perote and Altotonga.

**Key words:** epidemiological study, ovine brucellosis, *Brucella* spp., seroprevalence, risk factors, spatial distribution.

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2018. Aprobado: mayo, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 661-672. 2020.

**Palabras clave:** estudio epidemiológico, brucelosis ovina, *Brucella* spp., seroprevalencia, factores de riesgo, distribución espacial.

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad crónica distribuida en el mundo y la bacteria del género *Brucella* es su etiología (Michaux-Charachon *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2005). Esta enfermedad es uno de los principales problemas de salud pública que se transmite de diversas especies animales al hombre y genera morbilidad alta. Además, es una de las zoonosis más importantes porque compromete la salud pública por la incapacidad laboral y costo alto de los tratamientos prolongados (Bano y Lone, 2015).

El contacto directo con animales infectados, sus membranas fetales y abortos, consumo de alimento contaminado con las bacterias, en particular leche y sus derivados sin pasteurizar, y manipulación de muestras para laboratorio sin protección, son las formas en las que se transmite el agente hacia el humano (Acha y Szyfres 2001). Entre las especies que afectan al humano, *Brucella melitensis* suele ser la más virulenta y genera la mayoría de los casos de la enfermedad. Los hospederos naturales de *B. melitensis* son ovinos y caprinos (Samartino, 2003). Sin embargo, *Brucella abortus* también puede infectar borregos de forma esporádica, pero rara vez produce la enfermedad clínica. Oceanía y Norteamérica, excepto México, están libres de los biovars 1, 2 o 3 de *B. melitensis*, los cuales afectan a rumiantes pequeños (Benavides, 2009).

En cultivo sobre agar, *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* forman colonias lisas, redondas con bordes definidos; en cambio, *B. ovnis* y *B. canis* muestran forma rugosa, con colonias redondas, brillantes y convexas. Este aspecto de las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie de cada especie: LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas; aunque pueden ocurrir mutaciones que afecten a la expresión del LPS (Castro *et al.*, 2005). El LPS es el principal antígeno de la pared celular y es responsable por la respuesta humoral. En las cepas rugosas de *Brucella*, el LPS es semejante al de las cepas lisas pero no posee la cadena O, o posee sólo alguno de sus residuos (Fernández-Prada *et al.*, 2001; 2003).

*Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* pueden infectar al humano, pero los agentes que con mayor frecuencia causan la brucelosis humana

## INTRODUCTION

Brucellosis is a chronic disease distributed throughout the world and the bacterium of the genus *Brucella* is its etiology (Michaux-Charachon *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2005). This disease is one of the main public health problems transmitted from various animal species to humans, and generates high morbidity. Furthermore, it is one of the most important zoonoses because it compromises public health due to and the high cost of longer treatment (Bano and Lone, 2015).

The agent is transmitted to humans through direct contact with infected animals, their fetal membranes and abortion products, consumption of food, in particular milk and its unpasteurized derivatives, contaminated with bacteria and from unprotected laboratory manipulation of samples (Acha and Szyfres 2001). Among the species that affect humans, *Brucella melitensis* is usually the most virulent and generates most cases of the disease. The natural hosts for *B. melitensis* are sheep and goats (Samartino, 2003). However, *Brucella abortus* also can infect sheep sporadically, but rarely causes clinical disease. Oceania and North America, except Mexico, are free of biovar 1, 2 or 3 of *B. melitensis* that affect small ruminants (Benavides, 2009).

In agar culture, *B. abortus*, *B. suis* and *B. melitensis* form smooth, round colonies with even edges; instead, *B. ovnis* and *B. canis* are rough in shape with round, shiny, and convex colonies. This aspect of the colonies is due to the expression of lipopolysaccharide (LPS) on the surface of each species: LPS-S in the smooth one and LPS-R in the rough; although mutations affecting LPS expression can occur (Castro *et al.*, 2005). The LPS is the main cell wall antigen and is responsible for the humoral response. In the rough *Brucella* strains, LPS is similar to that of the smooth strains but lacks the O chain, or has only some of its residues (Fernández-Prada *et al.*, 2001; 2003).

*Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* and *B. canis* can infect humans, but the agents that most frequently cause brucellosis in humans are *B. melitensis* (98%) and *B. abortus* (2%) (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015). In animals, smooth strains are generally the most virulent and infect females, while rough species prefer males (Padrón-Tello *et al.*, 2011). *Brucella ovnis* is more virulent in sheep than in any other species, and it particularly affects males (Corbel, 2006).

son *B. melitensis* (98%) y *B. abortus* (2%) (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015). En animales, por lo general, las cepas lisas son las más virulentas e infectan a las hembras, mientras que las especies rugosas infectan a los machos (Padrón-Tello *et al.*, 2011). *Brucella ovis* es más virulenta para las ovejas que para cualquier otra especie, y afecta en particular a los machos (Corbel, 2006).

En cuanto al impacto productivo de los pequeños rumiantes, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción ovina ocupa el segundo lugar en el mundo, y en México 71% de esta se realiza en el estado de México, seguido por los estados de Hidalgo y Veracruz (FAO, 2016). Para prevenir la enfermedad, la vacuna viva *B. melitensis* cepa Rev-1 se considera la mejor protección disponible contra la brucelosis en pequeños rumiantes (Blasco, 1997), aunque presenta algunos efectos adversos como: interferencia con el diagnóstico serológico con la pruebas de rosa bengala y fijación del complemento. Además, se excreta a través de la leche cuando se aplica en animales adultos y resulta infectante para las personas (Garín-Bastuji *et al.*, 2006; Pérez-Sancho *et al.*, 2014).

La brucelosis tiene graves implicaciones económicas en las unidades productivas, ya que ocasiona abortos en los animales y fallas reproductivas que impactan sobre las variables productivas (Bofill *et al.*, 1996). Además, esta enfermedad genera pérdidas importantes en la producción de carne y leche, y se vuelve una barrera para el comercio y la exportación de los animales, así como de sus productos (Acha y Szyfres, 2001; Tsegay *et al.*, 2015). Por lo tanto, para minimizar el riesgo de la enfermedad a través de su control, erradicación o ambos, en México, la Secretaría de Agricultura y Ganadería estableció la Campaña Nacional contra la Brucelosis en Animales (SAGAR, 1996).

Entre sus resultados, durante 2004 y 2005, se realizó una campaña de vacunación intensiva en pequeños rumiantes en la zona centro del estado de Veracruz. La cobertura alcanzó más del 90% de los rebaños, y disminuyó la incidencia de la brucelosis (Martínez-Herrera *et al.*, 2010; Román-Ramírez *et al.*, 2017). Veracruz cuenta con una campaña zoonosanitaria contra la brucelosis, con avances significativos en el control de esta infección en bovinos y caprinos. Sin embargo, en ovinos, cuya producción es

As for the productive impact of small ruminants, according to data from the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), sheep production ranks second in the world; in Mexico, 71% of it is carried out in the state of Mexico, followed by the states of Hidalgo and Veracruz (FAO, 2016). To prevent the disease, the alive vaccine *B. melitensis* Rev-1 strain is considered the best available protection against brucellosis in small ruminants (Blasco, 1997), although it has some adverse effects such as interference with serological diagnosis by the Bengal rose and complement fixation tests. Besides, vaccine is eliminated through milk when applied to adult animals and is infective for humans (Garín-Bastuji *et al.*, 2006; Pérez-Sancho *et al.*, 2014).

Brucellosis has serious economic implications in the farms since it causes abortions in animals and reproductive failures that affect the productive variables (Bofill *et al.*, 1996). In addition, this disease generates significant losses in the production of meat and milk, and becomes a barrier to trade and export of animals and derivatives (Acha and Szyfres, 2001; Tsegay *et al.*, 2015). Therefore, to minimize the risk of the disease through measures of control, eradication or both, Mexico established the National Campaign against Brucellosis in Animals, run by SAGAR (1996).

As a result, between 2004 and 2005, there was an intensive vaccination campaign carried out among small ruminants in the central area of the state of Veracruz. More than 90% of the herds were covered, and the incidence of brucellosis decreased (Martínez-Herrera *et al.*, 2010; Román-Ramírez *et al.*, 2017). In the state of Veracruz there is a sanitary campaign against brucellosis in animals, with significant advances in the control of this infection in cattle and goats. However, on sheep, whose production is sparse in this state, there is no reliable epidemiological information.

Thus, as the state of Veracruz ranks third in the national sheep inventory, it is important to learn about the epidemiology of brucellosis. The objective of this study was to identify the seroprevalence, risk factors, and spatial distribution of brucellosis in sheep. The hypothesis assumes a seroprevalence value of 50% and some risk factors associated with the breedstock in three sheep-producing areas in the state of Veracruz.

más dispersa en la entidad veracruzana, se carece de información epidemiológica confiable.

Por lo tanto, debido a que el estado de Veracruz ocupa el tercer lugar en el inventario ovino nacional, es importante conocer la epidemiología de la brucelosis. El objetivo de este estudio fue conocer la seroprevalencia, los factores de riesgo y la distribución espacial de la brucelosis en ovejas. La hipótesis supone un valor de seroprevalencia del 50% con factores de riesgo asociados al ganado en tres áreas productoras de ovinos en el estado de Veracruz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del estudio

El estudio transversal polietápico y estratificado, se realizó de noviembre 2014 a mayo 2015 en tres áreas del estado de Veracruz. En los municipios: 1) Coatzintla, Gutiérrez Zamora, Papantla y Tihuatlán en la región Totonaca; 2) Altotonga, Ayahualulco, Emiliano Zapata, Jalacingo y Perote en la región de la capital del estado; y 3) Ángel R. Cabada, Santiago Tuxtla, San Andrés Tuxtla y Catemaco en la región de Los Tuxtlas, (INAFED, 2015).

Perote es el municipio con mayor número de ovejas y cabras en el estado, pero los municipios aledaños (Altotonga, Ayahualulco, Emiliano Zapata y Jalacingo) también poseen un inventario importante (SIAP, 2016). Los municipios seleccionados en la región Totonaca y en la región de Los Tuxtlas también tienen una cantidad importante de ovejas. En conjunto, las tres zonas escogidas agrupan alrededor de 90% del inventario ovino estatal.

La región Totonaca se ubica en el norte del estado, a lo largo de la planicie costera del estado de Veracruz y hacia la sierra norte de Puebla, donde predomina un paisaje montañoso. El relieve es plano, pero hay lomeríos, montañas y cañadas, y el clima es cálido húmedo. El uso de suelo se orienta a actividades del sector primario, con cerca del 90% de su territorio destinado a actividades agropecuarias, como cultivos y pastizales.

La región de la capital del estado se ubica en el centro del estado y su topografía es bastante accidentada, con varias elevaciones importantes. Predomina el clima templado y se destaca por su orientación de uso de suelo con cerca del 70% dedicado a actividades del sector primario. Los Tuxtlas es una región cercana a la costa, en la porción centro-sur del estado de Veracruz, que es una de las regiones más lluviosas en el país. En términos topográficos, la región de Los Tuxtlas es accidentada, con varias elevaciones y un relieve escarpado con alturas que van de 200 hasta más de 1700 m. Debido a las diferentes altitudes de la comarca, el clima varía de tropical a subtropical húmedo (INAFED, 2015; SIAP, 2016).

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

The multistage cross-sectional, and stratified study was established from November 2014 to May 2015, in three areas of the state of Veracruz. At the municipalities: 1) Coatzintla, Gutiérrez Zamora, Papantla and Tihuatlán, in the Totonaca region; 2) Altotonga, Ayahualulco, Emiliano Zapata, Jalacingo and Perote, in the state Capital region; and 3) Ángel R. Cabada, Santiago Tuxtla, San Andrés Tuxtla and Catemaco in Los Tuxtlas region (INAFED, 2015).

Perote is the municipality with the largest number of sheep and goats in the state, but the neighboring municipalities (Altotonga, Ayahualulco, Emiliano Zapata and Jalacingo) also have an important inventory (SIAP, 2016). Selected municipalities in the Totonaca and Los Tuxtlas regions also have a significant number of sheep. Together, the three chosen areas comprise around 90% of the state sheep inventory.

The Totonaca region is located in the north of the state of Veracruz, along the coastal plain and towards the northern highlands of Puebla, where mountains border the landscape. Land relief is flat, but there are hills, mountains, and ravines, and the climate is humid warm. Land use is oriented to primary activities, about 90% of the land is agricultural, for crops and grasslands.

The state Capital region is located at the center of the state and its topography is quite rugged, with several important elevations. Temperate climate predominates and land use stands out for nearly 70% land dedicated to primary activities. Los Tuxtlas is a region near the coast, in the southern-central portion of the state of Veracruz, and one of the rainiest areas in the country. In topographic terms, the Los Tuxtlas region is rugged, with several elevations and a steep relief with heights ranging from 200 to over 1700 m. Due to the different altitudes of the region, the climate varies from tropical to humid subtropical (INAFED, 2015; SIAP, 2016).

We calculated the sample size with the online program Win Epi v. 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001; Thrusfield, 2005), with the «estimate percentages» procedure, and adjusted it to an estimated prevalence of 50% (95% confidence and 5% error). We did this on the assumption that there is a lack of information to establish the real prevalence of ovine brucellosis in the state; thus, we determined a minimum sample size of 381 sheep, and 414 samples were actually collected.

The number of farms (UP) for sampling was estimated using clusters according to the table of values proposed by Cannon and Roe (1982) for a prevalence of 50%, and obtained five UP per municipality and six sheep in each of them. Due to the possibility

El tamaño de muestra se calculó con el programa en línea Win Epi v.2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001; Thrusfield, 2005), con el procedimiento 'estimar porcentajes' y se ajustó a una prevalencia estimada del 50% (95% de confianza y 5% de error). El supuesto parte de que se carece de información para establecer la prevalencia real de la brucelosis ovina en la entidad; así que se determinó un tamaño mínimo de muestra de 381 ovinos, y se recolectaron 414 muestras.

El número de unidades de producción (UP) para muestreo se estimó por conglomerados de acuerdo con la tabla de valores propuesta por Cannon y Roe (1982) para una prevalencia de 50%, y se obtuvieron cinco UP por municipio y seis borregos en cada una de ellas. Debido a la posibilidad de detectar anticuerpos maternos, no se consideraron las hembras menores a tres meses de edad. Por ello, solo se muestrearon de forma aleatoria todas las hembras mayores a tres meses, sin importar estado fisiológico y todos los machos que eran o serían destinados a sementales.

De estos ovinos se obtuvieron muestras de sangre sin anticoagulante, que se procesaron en serie con la Prueba de Tarjeta al 3% (PT) como tamiz, e Inmunodifusión Radial (IDR) como confirmatoria (OIE, 2008). La prueba de tarjeta emplea como antígeno *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración de 3% y corresponde a una cepa lisa de referencia internacional (SAGAR, 1996). Para la prueba confirmatoria con IDR se usó un antígeno que se obtiene de una cepa rugosa de *B. melitensis* B115, así como Ag de pared poli-B. Para identificar los factores de riesgo (FR), en cada UP se aplicaron dos encuestas, una general por UP y otra individual por ovino muestreado.

El cuestionario general consideró las variables sistema de producción (intensivo, semintensivo o extensivo), movilización de ovinos (sí/no), préstamo de sementales (sí/no), convivencia con otras especies animales (sí/no), manejo reproductivo (monta natural, monta controlada, inseminación artificial), manejo de la cría al nacer (toma o no de calostro; separación de la madre en paridero) y las medidas de higiene y bioseguridad (vacunación, desparasitación, desinfección, aislamiento y cuarentena).

El cuestionario individual consideró las variables: procedencia del ovino (de otro estado, de otra región del estado, del vecino, nacido en la UP), edad, estado e historial productivo, antecedentes clínicos compatibles con brucelosis ovina, ingesta de calostro y condición corporal. Además, se realizó un examen físico general de cada ovino para conocer las constantes fisiológicas e identificar cuadros patológicos pre-existentes.

### Análisis estadísticos

La seroprevalencia se calculó con el programa en línea VassarStats (Lowry, 1998-2019) para cálculo de proporciones, y para

of detecting maternal antibodies, we excluded females younger than three months old. Therefore, samples included only females older than three months, regardless of their physiological status, and any male that was or would be set as ram.

From these sheep we obtained blood samples without anticoagulant, which were serially processed with the 3% Card Test (PT) as a screening test and Radial Immunodiffusion (RID) as confirmatory (OIE, 2008). The card test uses the *B. abortus* strain 1119-3 as an antigen at 3% concentration and corresponds to a smooth international reference strain (SAGAR, 1996). For the confirmatory RID (radial immunodiffusion) test, we used an antigen obtained from a rough strain of *B. melitensis* B115, as well as the poly B wall Ag. To identify the risk factors (FR), we applied two surveys in each farm (UP), one general for UP and another individual per sampled sheep.

The general questionnaire considered the variables production system (intensive, semi-intensive or extensive); mobilization of sheep (yes/no); borrowing of rams (yes/no); coexistence with other animal species (yes/no); reproductive management (natural mating, controlled mating, artificial insemination); management of the calf at birth (colostrum intake or not; separation from the mother in farrowing) and hygiene and biosecurity measures (vaccination, deworming, disinfection, isolation, and quarantine).

The individual questionnaire considered the variables: sheep origin (from another state, another area of the state, neighboring, or born in the UP), age, state and productive background, clinical history compatible with ovine brucellosis, colostrum intake and body condition. In addition, we performed a general physical examination of each sheep to acknowledge physiological traits and identify pre-existent pathological conditions.

### Statistical analyses

Seroprevalence was calculated with the online program VassarStats (Lowry, 1998-2019) to estimate proportions, and to determine FR we employed the Odds Ratio test with the online program Win Epi v. 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001).

### Georeferencing

UP were georeferenced with a Garmin® GPS 60 device, at an error margin of  $\pm 3$  m, coordinates were recorded in UTM (Universal Transverse Mercator) at the foot of each UP. With this information, we mapped spatial distribution with the QGIS 2.10.1 program. (QGIS Development Team, 2017).

determinar los FR se utilizó la prueba de Razón de Momios con el programa en línea Win Epi v. 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001).

### Georreferenciación

Las UP se georreferenciaron con un dispositivo GPS 60, marca Garmin®, con un margen de error de  $\pm 3$  m, las coordenadas se registraron como UTM (Universal Transverse Mercator) al pie de cada UP. Con esta información se construyeron los mapas de distribución espacial con el programa QGIS 2.10.1. (QGIS Development Team, 2017).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Seroprevalencia por municipio

La seroprevalencia general para las tres regiones fue 1% ( $IC_{95\%}$ : 0.3 a 2.6), aunque las regiones Totonaca y de Los Tuxtlas resultaron negativas y los únicos municipios con borregos seropositivos fueron Perote y Altotonga, en la región de la capital del estado (Figura 1).

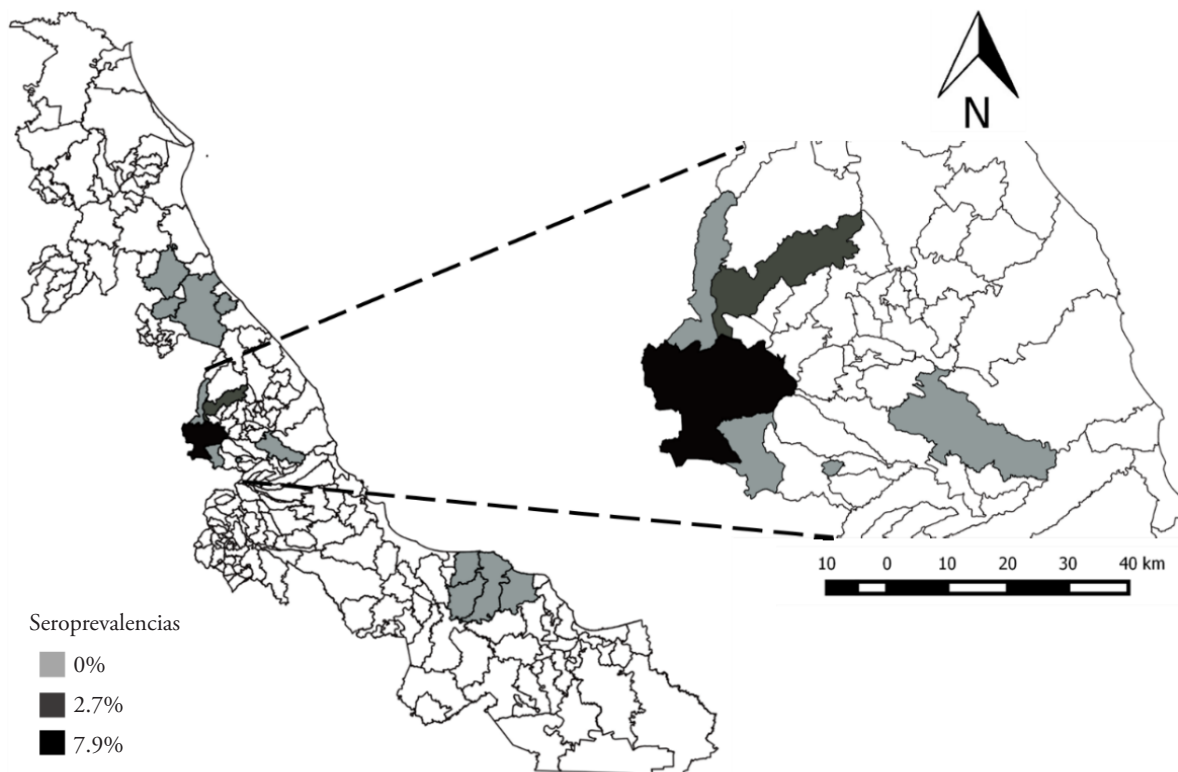
## RESULTS AND DISCUSSION

### Seroprevalence by municipality

The general seroprevalence for the three regions was 1% ( $IC_{95\%}$ : 0.3 to 2.6), although the Totonaca and Los Tuxtlas regions were negative and the only municipalities with seropositive sheep were Perote and Altotonga, in the state Capital region (Figure 1).

Brucellosis cases were located in the central zone of the state of Veracruz, with seroprevalence values recorded in the municipalities of Perote (7.9%) and Altotonga (2.7%). These findings coincide with a study carried out with goats in which prevalence was 4.05% at the municipality of Perote, and 0.52% of general prevalence for goats in the central zone of the state of Veracruz (Román-Ramírez *et al.*, 2017). This figure shows that brucellosis exists in sheep in the central zone of Veracruz, but differs from studies conducted in other parts of the world.

In Tajikistan, seroprevalence value on sheep grazing in common areas was 11% (Rajala *et*



**Figura 1. Seroprevalencia por municipio de la brucelosis ovina en el estado de Veracruz, México.**  
**Figure 1. Seroprevalence by municipality of ovine brucellosis in the state of Veracruz, Mexico.**

Los casos de brucelosis se localizaron en la zona centro del estado de Veracruz, con valores de seroprevalencia en los municipios de Perote (7.9%) y Altotonga (2.7%). Estos hallazgos coinciden con un estudio realizado con cabras en el cual la prevalencia fue 4.05% para el municipio de Perote y la prevalencia general de 0.52% en cabras de la zona centro del estado de Veracruz (Román-Ramírez *et al.*, 2017). Esta cifra demuestra que la brucelosis se encuentra en ovinos en la zona centro de Veracruz, pero difiere de lo que concluyen estudios en otras partes del mundo.

En Tajikistan se identificó una seroprevalencia de 11% en ovinos que pastorean en áreas comunes (Rajala *et al.*, 2016). En el norte de Jordania, la seroprevalencia de brucelosis ovina fue 14.3% por prueba de tarjeta, 7.2% por ELISA y 2.2% al usar ambas pruebas en serie (Al-Talafhah *et al.*, 2003). En Pernambuco y Bahía, Brasil, la tasa de seropositividad en borregos fue 6.5% para *B. ovis*, pero ninguna de las ovejas y cabras probadas resultó positiva a *B. abortus* (Peixoto *et al.*, 2016).

En el noreste de Portugal, Coelho *et al.* (2013) hallaron una seroprevalencia individual a brucelosis ovina y caprina de 0.44% en 278 097 animales muestreados. En un estudio en rastros en Etiopía, la brucelosis se encontró en 17 (1.99%) y 15 (1.76%) de los 853 pequeños rumiantes muestreados con las pruebas de Rosa de Bengala y fijación del complemento, respectivamente (Tsegay *et al.*, 2015). En una feria pecuaria en la región de Sertão en el estado de Pernambuco, noreste de Brasil, 5.88% de las ovejas vendidas fueron seropositivas para *B. ovis* (Alves *et al.*, 2017).

### Seroprevalencia por unidad de producción

Por UP, la seroprevalencia encontrada en este estudio fue 3.6% (IC<sub>95%</sub>: 0.6-13.6) (Figura 2), lo cual podría deberse a que la infección se encuentra confinada a la zona centro del estado. Sin embargo, nuestros resultados fueron inferiores a los observados en el norte de Jordania, donde el 56% de los rebaños ovinos fueron seropositivos a brucelosis por la prueba de aglutinación con Rosa de Bengala (RBT), también llamada Prueba de la Tarjeta, y el 45% por ELISA (Al-Talafhah *et al.*, 2003). En otro estudio en Jordania el 22.2% (95%IC: 16.5-28.8) de los rebaños ovinos fueron positivos a brucelosis (Musallam *et al.*, 2015).

*al.*, 2016). In northern Jordan, ovine brucellosis seroprevalence was determined at 14.3% by card test, 7.2% by ELISA, and 2.2% by using both serial tests (Al-Talafhah *et al.*, 2003). In Pernambuco and Bahia, Brazil, the seropositivity rate in sheep was 6.5% for *B. ovis*, but none of the sheep and goats tested was positive for *B. abortus* (Peixoto *et al.*, 2016).

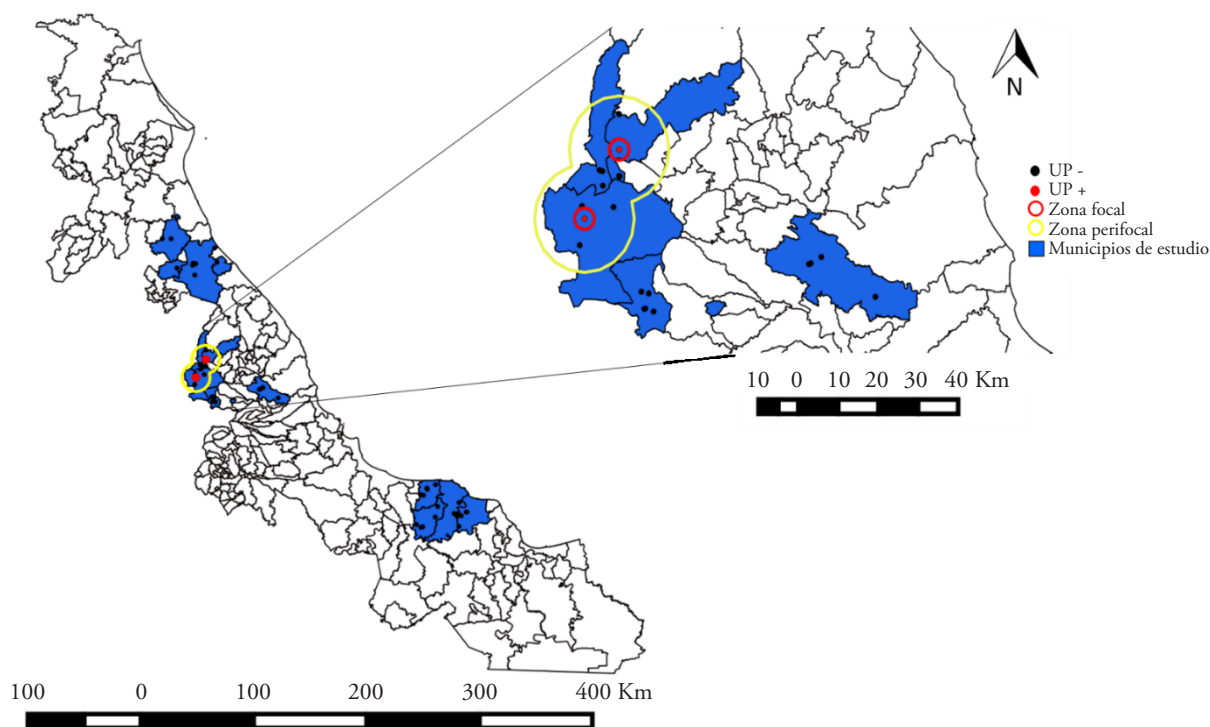
In northeast Portugal, Coelho *et al.* (2013) found an individual 0.44% seroprevalence of ovine and caprine brucellosis in 278 097 sampled animals. In a slaughterhouse study in Ethiopia, 17 (1.99%) specimens were brucellosis-infected, as well as 15 (1.76%) of the 853 small ruminants sampled by the Bengal rose and complement fixation tests, respectively (Tsegay *et al.*, 2015). At an animal fair in the Sertão region, state of Pernambuco, northeast Brazil, 5.88% of the sheep sold were seropositive for *B. ovis* (Alves *et al.*, 2017).

### Seroprevalence per unit of production

By UP, the seroprevalence found in this study was 3.6% (95%CI: 0.6-13.6) (Figure 2), which could be because the infection is confined to the central area of the state. However, our results exhibited lower figures than those obtained in northern Jordan, where 56% of the sheep herds were seropositive for brucellosis using the Bengal rose agglutination test (RBT) or also called Card Test, and 45% using ELISA (Al-Talafhah *et al.*, 2003). In another study in Jordan, 22.2% (95%CI: 16.5-28.8) of sheep herds were positive for brucellosis (Musallam *et al.*, 2015).

In southeast Iran, 63 herds of 300 sampled (21%) had at least one seropositive animal (Sharifi *et al.*, 2014), while in northeast Portugal 8.9% of the 5466 herds tested had one or more animals with positive serology to brucellosis (Coelho *et al.*, 2013). On the contrary, our results are higher, compared to the 0.9% seroprevalence of ovine brucellosis found in the Ethiopian-Somali region (Lakew *et al.*, 2019). Thus, despite lesser, there is ovine brucellosis seroprevalence in the state capital region of Veracruz.

One reason why brucellosis is located in the central area of the state could be that sheep graze in common areas along with other species such as goats, which are seropositive in at least one of the affected municipalities (Román-Ramírez *et al.*, 2017). Another possible explanation is that sheep could graze in common areas with animals from the



**Figura 2. Unidades de producción afectadas con área de influencia de brucelosis ovina en el estado de Veracruz, México.**  
**Figure 2. Production units affected within the area of influence of sheep brucellosis in the state of Veracruz, Mexico.**

En el sureste de Irán, 63 rebaños de 300 muestreados (21%) tuvieron al menos un animal seropositivo (Sharifi *et al.*, 2014), mientras que en el noreste de Portugal el 8.9% de los 5466 rebaños probados tuvieron uno o más animales con serología positiva a brucelosis (Coelho *et al.*, 2013). Por el contrario, nuestros resultados son altos en comparación con el 0.9% de seroprevalencia de brucelosis ovina en la región Etiópico-Somalí (Lakew *et al.*, 2019). Entonces, aunque baja, sí existe seroprevalencia de brucelosis ovina en la región de la capital del estado de Veracruz.

Una razón por la cual la brucelosis se localiza en la zona centro del estado, podría ser que los borregos apacientan en áreas comunes con otras especies como cabras, las cuales ya habrían mostrado seropositividad en al menos uno de los municipios afectados (Román-Ramírez *et al.*, 2017). Otra explicación posible es que los borregos podrían apacientar en áreas comunes con animales del estado de Puebla, que está en fase de control de brucelosis. Ese estado ocupa el quinto lugar en producción ovina del país (SIAP, 2016) y colinda con el área de influencia mayor de ovinos del estado de Veracruz (SAGAR, 1996).

state of Puebla, which are in the brucellosis control phase. This state ranks fifth in sheep production in the country (SIAP, 2016) and borders the largest sheep area of influence in the state of Veracruz (SAGAR, 1996). Our results coincide with those of Al-Talafhah *et al.* (2003), in northern Jordan, and Teshale *et al.* (2006) in eastern Ethiopia; they indicated that grazing in communal grassland areas increased the odds that a sheep herd might test seropositive for brucellosis. In the present research, we found differences in seroprevalence associated with some variables. By sex, seroprevalence in males was 2.8% ( $_{95\%}$  CI: 0.4 a 9.1), while in females it was 0.6% ( $_{95\%}$  CI: 0.1-2.4).

One of the explanations would be that in the sheep samples most animals were female. When considering the productive status, there were 2.4% ( $_{95\%}$  CI: 0.4 to 9.1) seropositive in the ram group and 1.5% ( $_{95\%}$  CI: 0.3 to 5.7) in the pregnant ewes group. UPs allocate most of the males for slaughter and keep only a few to use them as rams, thus preventing the spread of the disease. A higher prevalence in males may be due to farmers keep the habit of exchanging

Nuestros resultados coinciden con los de Al-Talafhah *et al.* (2003), en el norte de Jordania, y con Teshale *et al.* (2006) en el oriente de Etiopía; quienes indicaron que el pastoreo en áreas de pastizales comunales aumentó las probabilidades de que un rebaño tuviera ovejas seropositivas a brucelosis. En nuestra investigación se encontraron diferencias en la seroprevalencia asociadas con algunas variables. Por sexo, en machos la seroprevalencia fue 2.8% (IC<sub>95%</sub>: 0.4 a 9.1) mientras que en hembras fue 0.6% (IC<sub>95%</sub>: 0.4 a 9.1).

Una de las explicaciones sería que la mayoría de los borregos en las muestras fueron hembras. Al considerar el estado productivo, en el grupo de sementales hubo 2.4% (IC<sub>95%</sub>: 0.4 a 9.1) seropositivos y 1.5% (IC<sub>95%</sub>: 0.3 a 5.7) en las hembras gestantes. Las UP destinan para el abasto a la mayoría de los machos y conservan solo algunos para utilizarlos como sementales, con lo cual se evita la diseminación de la enfermedad. Una prevalencia mayor en machos se puede deber a que los productores mantienen la costumbre de intercambiar sementales sin conocer su estado zoonosanitario, lo cual contribuye a diseminar la enfermedad hacia otros rebaños (Martínez-Herrera *et al.*, 2010). El prestar o pedir prestados sementales se identificó como factor de riesgo para brucelosis ovina (Musallam *et al.*, 2015; Sharifi *et al.*, 2014).

En todo el estado de Veracruz se practica el pastoreo de ovinos y es muy frecuente en el área de influencia de las unidades de producción identificadas como seropositivas a brucelosis, algunos ovinos pueden caminar incluso varios kilómetros diarios en busca de alimento (Reviriego, 2000; Rojas *et al.* 2006). El área perifocal abarca el municipio de Tepeyahualco, que tiene un inventario mayor de caprinos en Puebla y del cual se desconoce su estado zoonosanitario. Los ovinos podrían ser reservorios y diseminadores de la enfermedad o contraer la brucelosis de las cabras, para luego infectar a otras cabras y bovinos. Esta infección se disemina en las ovejas dentro de la zona focal, y peri focal. Y a través de ellas la enfermedad puede llegar al humano (Corbel, 2006). Por ello, se ha señalado la trashumancia como un factor de riesgo para brucelosis ovina (Boukary *et al.*, 2013).

La Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales en México dirige la mayoría de sus estrategias hacia bovinos y caprinos (SGDR, 1996). Pero resta atención a los ovinos que tienen una importancia económica en Veracruz y otros estados. Además,

rams ignoring their sanitary status, which contributes to spread the disease to other herds (Martínez-Herrera *et al.*, 2010). Lending or borrowing rams was identified as a risk factor for ovine brucellosis (Musallam *et al.*, 2015; Sharifi *et al.*, 2014).

Sheep grazing is a common practice throughout the state of Veracruz and very frequent in the area of influence of the farms identified as seropositive for brucellosis; some sheep can even walk several kilometers a day in search of fresh grass (Reviriego, 2000; Rojas *et al.* 2006). The perifocal area encompasses the municipality of Tepeyahualco, which has a larger inventory of goats in Puebla, and its sanitary status is unknown. Sheep could be reservoirs and disseminators of the disease, or acquire brucellosis from goats, and then infect other goats and cattle. This infection spreads in sheep within the focal and peri focal zones, and through them, the disease can reach humans (Corbel, 2006). Therefore, transhumance is identified as a risk factor for ovine brucellosis (Boukary *et al.*, 2013).

The National Campaign against Brucellosis in Animals in Mexico directs most of its protection strategies towards cattle and goats (SGDR, 1996). However, it neglects sheep, which are economically important in Veracruz and other states. Furthermore, these ruminants are considered potential reservoirs and disseminators of the disease. Consequently, farmers carry out vaccination voluntarily, which explains the lack of official data in the number of vaccinated herds and sheep. Unfortunately, this prevents us from estimating the effect that sheep vaccination has on the seroprevalence of sheep brucellosis.

Some studies have identified different risk factors related to ovine brucellosis (Lakew *et al.*, 2019). In Jordan, Musallam *et al.* (2015) identified five significant variables associated with a higher probability of seropositivity to brucellosis: lending or borrowing rams, feeding dogs with aborted material, the presence of goats, the introduction of new animals to the herd, and a large herd size. In contrast, separation of newly introduced animals, quarantining animals undergoing abortion, and use of disinfectants to clean up pens were significantly associated with a lower probability of being seropositive.

In northern Jordan, Al-Talafhah *et al.* (2003) found that the use of disinfectants, previous vaccination for brucellosis, and tap water were protective factors.

estos rumiantes se consideran reservorios y diseminadores potenciales de la enfermedad. En consecuencia, los productores realizan la vacunación de manera voluntaria, por lo cual se carece de datos oficiales sobre número de rebaños y borregos vacunados. De manera desafortunada esto evitó estimar el efecto que la vacunación de ovejas tiene sobre la seroprevalencia de la brucelosis ovina.

Algunos estudios han identificado factores de riesgo distintos relacionados con brucelosis ovina (Lakew *et al.*, 2019). En Jordania, Musallam *et al.* (2015) identificaron cinco variables significativas asociadas con una probabilidad mayor de seropositividad a brucelosis: prestar o pedir prestados sementales, alimentar a los perros con material abortado, la presencia de cabras, la introducción de animales nuevos al rebaño y un tamaño de rebaño grande. Por el contrario, la separación de los animales recién introducidos, el mantener en cuarentena los animales que han abortado y el uso de desinfectantes para limpiar los corrales se asoció significativamente con una probabilidad menor de ser seropositivos.

En el norte de Jordania, Al-Talafhah *et al.* (2003) encontraron que el uso de desinfectantes, la vacunación previa para brucelosis y el agua del grifo fueron factores protectores. En la región de Sertão, Pernambuco, Brasil, el sistema de manejo intensivo se identificó como factor de riesgo para *B. ovis* (Alves *et al.*, 2017). En el noreste de Portugal, Coelho *et al.* (2013) identificaron diferencias significativas en las tasas de seroprevalencia entre tamaño del rebaño, la constitución del rebaño, el tipo de producción y las organizaciones de ganaderos. En el sureste de Irán, la presencia de animales recién comprados tuvo asociación significativa con la seropositividad a brucelosis en pequeños rumiantes y destacó la función del movimiento de animales entre rebaños en la epidemiología de la brucelosis en esa región (Sharifi *et al.* 2014).

En Nigeria, el riesgo de transmisión de *Brucella* spp. en rebaños aumentó por trashumancia, crías abortivas y rebaños con más de 50 animales (Boukary *et al.*, 2013). En Argelia, la presencia de pequeños rumiantes vacunados con Rev-1 en un rebaño redujo cuatro veces las probabilidades de seropositividad a la brucelosis, en comparación con otros rebaños (Kardjadj, 2017). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron factores de riesgo ni factores protectores para la presencia de brucelosis en ovinos en el estado de Veracruz, lo que podría explicarse por la prevalencia

In the Sertão region, Pernambuco, Brazil, the intensive management system was identified as a risk factor for *B. ovis* (Alves *et al.*, 2017). In northeast Portugal, Coelho *et al.* (2013) identified significant differences in seroprevalence rates between herd size, herd constitution, type of production, and farmer organizations. In southeastern Iran, the presence of newly purchased animals was significantly associated with brucellosis seropositivity in small ruminants and highlighted the effect of animal movement between herds on the epidemiology of brucellosis in that region (Sharifi *et al.* 2014). In Niger, the risk of transmission of *Brucella* spp. in herds increased due to transhumance, abortions, and herds of more than 50 animals (Boukary *et al.*, 2013). In Algeria, the presence of small ruminants vaccinated with Rev-1 in a herd reduced the probability of seropositivity to brucellosis by four times compared to other herds (Kardjadj, 2017). However, we found no risk or protective factors for the presence of brucellosis in sheep in the state of Veracruz, which could be due to the low prevalence identified and the limited presence of seropositive animals which led to only two positive UPs.

In this study, we discovered that brucellosis is endemic to sheep in the state of Veracruz. The current vaccination program focuses mostly on cattle and goats, so the coverage for sheep population is very low. Results obtained allow proposing revision of current brucellosis control programs and related vaccination schemes with measures promoting hygiene and management practices. Besides, it allows applying appropriate restrictions on the trade of animals and enhancing awareness of livestock owners on quarantine principles for newly purchased animals, in order to minimize the risk of introducing *Brucella* spp. to their herds.

## CONCLUSIONS

*Brucella* spp. is present in sheep from the Capital region of the state of Veracruz with a low general seroprevalence. We identified no risk factors for the presence of brucellosis in the three study areas. Brucellosis is limited to only two production units in the municipalities of Altotonga and Perote.

In Veracruz, ovine brucellosis is characterized by a limited geospatial distribution. In addition,

baja identificada y la presencia limitada de animales seropositivos que se limitó a solo dos unidades de producción.

Esta investigación encontró que la brucelosis es endémica en los borregos del estado de Veracruz. El programa de vacunación actual se enfoca en bovinos y cabras, por lo cual tiene una cobertura muy baja para la población de ovejas. Los resultados permiten proponer la revisión de los programas actuales de control de la brucelosis y acompañar la vacunación con medidas que promuevan prácticas de higiene y manejo. Además, respalda el aplicar restricciones apropiadas al comercio de animales y mejorar el conocimiento de los propietarios de ganado sobre los principios de cuarentena para los animales recién comprados, con el fin de minimizar el riesgo de introducción de *Brucella* spp. a sus rebaños.

## CONCLUSIONES

*Brucella* spp. está presente en ovinos de la región de la capital del estado de Veracruz con una seroprevalencia general baja. No se identificaron factores de riesgo para la presencia de brucelosis en las tres zonas en estudio. La brucelosis está delimitada a solo dos unidades de producción en los municipios de Altotonga y Perote.

En Veracruz, la brucelosis ovina se caracteriza por una distribución geoespacial limitada. Además, es importante evaluar la función individual de los ovinos dentro de las campañas zoonosanitarias contra brucelosis

## AGRADECIMIENTOS

A FUNPROVER por el apoyo económico a la investigación, la cual forma parte del proyecto de investigación "Estudio integral de los principales agentes etiológicos que afectan la producción de los pequeños rumiantes", con clave 30-2009-0869 bajo la dirección técnica del Dr. David Itzcoatl Martínez Herrera.

Este artículo forma parte del trabajo recepcional de Tesis de Maestría en Ciencias Animal de la Universidad Veracruzana del primer autor y por ello se agradece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de esta Casa de Estudios por las instalaciones facilitadas para la realización del posgrado, procesamiento de las muestras y a los investigadores que han contribuido en su formación"

## LITERATURA CITADA

Acha, P. N., y B. Szyfres. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Oficina Panamericana Sanitaria (OPS). Washington, D.C. pp: 28-55.

it is important to evaluate the individual role of sheep within the animal health campaigns against brucellosis.

—End of the English version—



- Al-Talafhah, A. H., S.Q. Lafi, and Y. Al-Tarazi. 2003. Epidemiology of ovine brucellosis in Awassi sheep in Northern Jordan. *Prev. Vet. Med.* 60: 297-306. DOI: 10.1016/S0167-5877(03)00127-2
- Álvarez-Hernández, N. E., M. Díaz-Flores, y M. Ortiz-Reynoso. 2015. Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Revista de Medicina e Investigación* 3: 107-168. DOI: 10.1016/j.mei.2015.07.002
- Alves, J. R. A., G. M. S. Lima, J. D. da Silva, D. F. da Costa, F. A. dos Santos, S. S. Higino, S. S. de Azevedo, e C.J. Alves. 2017. Epidemiological characterization and risk factors associated with leptospirosis and brucellosis in small ruminants sold at animal fair in the Sertão Region of Pernambuco State, a semiarid Region of Northeastern Brazil. *Seminário: Ciências Agrárias* 38: 1933-1946. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1933>
- Bano, Y., and S. A. Lone. 2015. Brucellosis: An economically important infection. *J. Med. Microb. Diagn.* 4: 1-8.
- Benavides, E. 2009. Principales enfermedades que afectan la producción ovina en el trópico. *Revista Spei Domus.* 5: 32-36.
- Blasco, J. M. 1997. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 31: 275-283. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(96\)01110-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01110-5)
- Bofill, R., A. Rivas, y W. Ramírez. 1996. Manual de Enfermedades Infecciosas. Instituto Politécnico Nacional (IPN), México. pp: 60-84.
- Boukary, A. R., C. Saegerman, E. Abatih, D. Fretin, R. Alambedji Bada, R. De Deken, H. A. Harouna, A. Yenikoye, and E. Thys. 2013. Seroprevalence and potential risk factors for *Brucella* spp. infection in traditional cattle, sheep and goats reared in urban, periurban and rural areas of Niger. *PLoS One* 16(8):e83175. DOI: 10.1371/journal.pone.0083175
- Cannon, R. M., and R. T. Roe. 1982. *Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians.* Bureau of Animal Health. Canberra, Australia. 35 p.
- Castro, H. A., S. R. González, y M. I. Prat. 2005. Brucelosis una revisión práctica. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 32: 203-216.
- Coelho, A. M., A. C. Coelho, and J. Rodrigues. 2013. Seroprevalence of sheep and goat brucellosis in the northeast of Portugal. *Arch. Med. Vet.* 45: 167-172. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200008>.
- Corbel, M. J. 2006. Brucellosis in Humans and Animals. World Health Organization. Geneva, Switzerland. pp: 28-32. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43597/WHO\\_CDS\\_EPR\\_2006.7\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43597/WHO_CDS_EPR_2006.7_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (Consulta: julio 2018).

- FAO (Food and Agriculture Organization). 2016. Live Animals. Statistics Division, United Nations - FAO. Rome, Italy. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> (Consulta: julio 2018).
- Fernandez-Prada, C. M., M. Nikolich, R. Vemulapalli, N. Srinanganathan, S. M. Boyle, G. G. Schurig, T. L. Hadfield, and D. L. Hoover. 2001. Deletion of *Wbo A* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 69: 4407-4416.
- Fernandez-Prada, C. M., E. B. Zelazowska, M. Nikolich, L. Hadfield, R. M. Roop 2nd, G. L. Robertson, and D. L. Hoover. 2003. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect. Immun.* 71: 2110-2119.
- Garín-Bastuji, B., J. M. Blasco, C. Marín, and D. Albert. 2006. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Rumin. Res.* 62: 63-70.
- INAFED (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal). 2015. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM30veracruz/index.html> (Consulta: julio 2018).
- Kardjadj, M. 2017. Did Rev-1 small ruminants vaccination helped improve cattle brucellosis prevalence status in Algeria? *Trop. Anim. Health Prod.* 49:1783-1785. DOI: 10.1007/s11250-017-1370-0
- Lakew, A., A. Hiko, A. Abraha, S. M. Hailu. 2019. Sero-prevalence and community awareness on the risks associated with livestock and human brucellosis in selected districts of Fafan Zone of Ethiopian-Somali National Regional State. *Vet. Anim. Sci.* 7: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100047>
- Lowry, R. 2019. VassarStats: Website for Statistical Computation 1998-2019. Vassar College. Poughkeepsie, NY, USA. <http://vassarstats.net/> (Consulta: junio 2018).
- Martínez-Herrera, D. I., J. A. Morales M., A. E. Peniche C., B. Molina S., M. A. Rodríguez C., R. Loeza L., M. L. Robledo S., J. F. Morales A., and R. Flores C. 2010. Use of RB51 for small ruminants brucellosis prevention in Veracruz, Mexico. *Int. J. Dairy Sci* 5:10-17.
- Michaux-Charachon, S., G. Bourg, E. Jumas-Bilak, P. Guigue-Talet, A. Allardet-Servent, D. O'Callaghan, and M. Ramuz. 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 179: 3244-3249.
- Musallam, I.I., M. Abo-Shehada, M. Omar, and J. Guitian. 2015. Cross-sectional study of brucellosis in Jordan: Prevalence, risk factors and spatial distribution in small ruminants and cattle. *Prev. Vet. Med.* 118: 387-396. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.12.020
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2008. Bovine brucellosis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th edition, World Organisation for Animal Health. Paris, France. pp: 624-659.
- Padrón-Tello O., D. Martínez-Herrera, A. E. Peniche-Cardena, y L. López de Buen. 2011. Historia de la brucelosis. *La Ciencia y el Hombre*, Vol. 24. <http://www.uv.mx/ciencia/hombre/revistae/vol24num2/articulos/brucelosis/> (Consulta: julio 2018).
- Peixoto, R. D. M., G. B. D. Santos, E. S. Amanso, M. D. C. Aquino, R. D. M. P. Araújo, e M. M. Costa. 2016. Anti-Lentivirus, *Brucella abortus* AND *B. ovis* antibodies in small ruminants raised in pernambuco and bahia. *Rev. Caatinga* 29: 507-511. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n229rc>
- Pérez-Sancho, M., R. Adone, T. García-Seco, M. Tarantino, A. Díez-Guerrier, R. Drumo, M. Francia, L. Domínguez, P. Pasquali, and J. Álvarez. 2014. Evaluation of the immunogenicity and safety of *Brucella melitensis* B115 vaccination in pregnant sheep. *Vaccine*. 32: 1877-1881. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.01.070
- QGIS Development Team. 2017. QGIS 2.10.1. Open Source Geospatial Foundation. 2004 – 2017. <https://qgis.org/en/site/forusers/download.html> (Consulta: junio 2018).
- Rajala E. L., C. Grahm, I. Ljung, N. Sattarov, S. Boqvist, and U. Magnusson. 2016. Prevalence and risk factors for *Brucella* seropositivity among sheep and goats in a peri-urban region of Tajikistan. *Trop. Anim. Health Prod.* 48: 553-558.
- Reviriego, F. J., M. A. Moreno, and L. Domínguez. 2000. Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Prev. Vet. Med.* 44: 167-173.
- Rojas, R. O., Q. R. Bores, M. J. Urrutia, O. M. Murguía, y L. S. Beltrán. 2006. Prácticas de manejo de ovinos de pelo en la Huasteca. INIFAP-CIRNE- Campo Experimental San Luis. Folleto técnico No. 27. San Luis Potosí, S.L.P., México. 98 p.
- Román-Ramírez D. L., D. I. Martínez-Herrera, J. A. Villagómez-Cortés, A. E. Peniche-Cardena, J. F. Morales-Alvarez, and R. Flores-Castro. 2017. Epidemiología de la brucelosis caprina en la zona centro del estado de Veracruz. *Gac. Méd. Méx.* 153: 26-30.
- SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y desarrollo Rural). 1996. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 18 de julio de 1996. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/422642/NORMA\\_Oficial\\_Mexicana\\_NOM-041-ZOO-1995.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/422642/NORMA_Oficial_Mexicana_NOM-041-ZOO-1995.pdf) (Consulta: junio 2018).
- Samartino L. E. 2003. Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Jornada de actualización sobre brucelosis bovina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Rocha, Castelar, Argentina. 7 p.
- Sharifi, H., S. Tabatabaei, H. Rashidi, S. Kazemian, F. Sabbagh, P. Khajooei, M. Karamouzian, O. Nekouei, M. Adeli-Sardoei, and L. Leontides. 2014. A cross-sectional study of the seroprevalence and flock-level factors associated with ovine and caprine brucellosis in southeastern Iran. *Iran J. Vet. Res.* 15: 370-374.
- SIAP (Sistema de Información Agrícola y Pecuaria). 2016. Población ganadera. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. <http://www.siap.gob.mx/poblacion-ganadera/> (Consulta: junio 2018).
- Teshale, S., Y. Muhie, A. Dagne, and A. Kidanemariam. 2006. Seroprevalence of small ruminant brucellosis in selected districts of Afar and Somali pastoral areas of Eastern Ethiopia: the impact of husbandry practice. *Rev. Méd. Vét.* 157: 557-563.
- Thrusfield, M. 2005. Veterinary Epidemiology. 3rd edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 600 p.
- Thrusfield, M., C. Ortega, I. de Blas, J. P. Noordhuizen, and K. Frankena. 2001. WIN EPISCOPE 2.0 improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148: 567-72.
- Tsegay, A., G. Tuli, T. Kassa, and N. Kebede. 2015. Seroprevalence and risk factors of Brucellosis in small ruminants slaughtered at Debre Ziet and Modjo export abattoirs, Ethiopia. *J. Infect. Dev. Ctries.* 9: 373-380. DOI: 10.3855/jidc.4993.

# CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE CAOBA (*Swietenia macrophylla* King) EN RESPUESTA A EXTRACTOS VEGETALES

## GROWTH OF MAHOGANY SEEDLINGS (*Swietenia macrophylla* King) IN RESPONSE TO VEGETABLE EXTRACTS

Percy Diaz-Chuizuta<sup>1</sup>, Ofelia Andrea Valdés-Rodríguez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, Programa de Investigación en Manejo Integral del Bosque y Servicios Ambientales (PROBOSQUES). Jr. Belen Torres de Tello 135, Tarapoto, San Martín, Perú. <sup>2</sup>El Colegio de Veracruz, Carrillo Puerto no. 26, Xalapa, Veracruz, México, CP 91000. (valdesandrea@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

La caoba (*Swietenia macrophylla* King) requiere nutrientes para que las plantas muestren buena calidad durante su crecimiento en vivero. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta a extractos foliares de *Ricinus communis* L., *Solanum torvum* Sw. y frutos de *Solanum mammosum* L. en plántulas de caoba. La hipótesis fue que estos extractos mejoran la calidad de las plántulas. El diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro tratamientos: T1) *R. communis* L., T2) *S. torvum* Sw., T3) *S. mammosum* L., y T4) testigo sin extracto vegetal, y con cuatro repeticiones de 45 unidades experimentales. Las variables evaluadas fueron morfológicas (tasas de crecimiento de altura y diámetro de tallo, y longitud y número de raíces) y de calidad (peso seco, índice de robustez e índice de calidad de Dickson). Los datos se analizaron mediante ANDEVA de una vía y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los tratamientos se aplicaron a las plántulas a los 15 d de emergencia y los extractos se aplicaron vía foliar cada 15 d, con dosis de 60 mL 20 L<sup>-1</sup> de cada extracto. Las unidades se midieron cada 15 d, durante 60 d. La aplicación de los extractos produjo tasas de crecimiento y pesos secos 38% superiores respecto a los testigos. El extracto de *R. communis* obtuvo las tasas más altas y el mejor índice de calidad de Dickson (0.28). Por lo tanto, el extracto de esta especie fue la mejor alternativa orgánica para mejorar el crecimiento y la calidad de las plántulas de caoba en vivero.

**Palabras claves:** *Swietenia macrophylla* King, extractos orgánicos, índice de calidad de Dickson, plántulas.

### ABSTRACT

Mahogany (*Swietenia macrophylla* King) requires nutrients for the plants to present good quality during their growth in a nursery. The objective of the present study was to evaluate the response to foliar extracts of *Ricinus communis* L., *Solanum torvum* Sw. and fruits of *Solanum mammosum* L. in mahogany seedlings. The hypothesis was that these extracts improve the quality of the seedlings. The experimental design was completely randomized, with four treatments: 1) *R. communis* L., 2) *S. torvum* Sw., 3) *S. mammosum* L., and T4) control without vegetable extracts, and four replications of 45 experimental units. The variables evaluated were morphological (rates of growth in height and stem diameter, and length and number of roots) and of quality (dry weight, robustness index and Dickson quality index). The data were analyzed through one-way ANOVA and the means were compared with the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The treatments were applied to the seedlings at 15 d of emergence and the extracts were applied to the foliar surfaces every 15 d, with a dose of 60 mL 20 L<sup>-1</sup> of each extract. The units were measured every 15 d, during 60 d. The application of the extracts produced growth rates and dry weights 38% higher with respect to the controls. The extract of *R. communis* obtained the highest rates and the best Dickson quality index (0.28). Therefore, the extract of this species was the best alternative for improving growth and quality of the mahogany seedlings in the nursery.

**Key words:** *Swietenia macrophylla* King, organic extract, Dickson quality index, seedlings.

### INTRODUCTION

Caoba (*Swietenia macrophylla* King) is a species of economic importance because of the quality of its wood, although the

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 673-681. 2020.

## INTRODUCCIÓN

La caoba (*Swietenia macrophylla* King) es una especie con importancia económica por la calidad de su madera, aunque el tiempo aproximado para su cosecha es 30 años (García *et al.*, 2011) y, por lo tanto, para aumentar el crecimiento de las plántulas se usan fertilizantes e insecticidas químicos, pero su uso repetido contamina suelos y aguas (De Puerto *et al.*, 2014). Para reducir los impactos ambientales y mejorar la rentabilidad y sostenibilidad de los sistemas agroforestales, se recomienda el uso de productos orgánicos a base de extractos de plantas, ya que estos compuestos contienen nutrientes solubles que pueden favorecer el crecimiento de las plantas y promover un desarrollo más robusto, pero sin los efectos perjudiciales de los fertilizantes químicos (Rivera-Cruz *et al.*, 2010). Los extractos de plantas pueden aplicarse como fitoprotectores o bioestimulantes o ambos para incrementar la talla y la biomasa foliar; como es el caso de los extractos de algas marinas (Araújo *et al.*, 2012) o de vegetales de distintas especies de plantas medicinales, que además protegen contra fitopatógenos (Muthukumar *et al.*, 2010). En específico, la especie leguminosa *Ulex europaeus* L., al aplicarse en extractos acuosos sobre plantas de *Capsicum annuum* L., incrementa la producción foliar, la biomasa total y el contenido de polifenoles (Tighe-Neira *et al.*, 2016). Los extractos acuosos de las hojas y peciolas de *M. oleifera* pueden aumentar la talla y la biomasa de *Eruca vesicaria* (Mona, 2013), por lo que se recomiendan para aplicar como bioestimulante en diferentes cultivos.

En relación con la higuera (*Ricinus communis* L.), los desechos de esta planta contienen altos niveles de N, que al aplicarse en dosis bajas mejora el crecimiento de las plantas sobre las cuales se aplicó (Lima *et al.*, 2011). La ricina producida por la higuera posee propiedades insecticidas que dan protección a las plantas (Flores-Macías *et al.*, 2016), y el tomatillo (*Solanum torvum* Sw.) se utiliza en el control de *Escherichia coli* (Domínguez-Odio *et al.*, 2012) y tiene efecto *in vitro* como ovicida y larvicida contra *Haemonchus contortus* en animales menores (Kamaraj y Abdul, 2011). La teta de vaca (*Solanum mammosum* L.) se utiliza para mejorar el crecimiento y desarrollo del inchi (*Plukenetia volubilis* L.) (Díaz *et al.*, 2014). Nava-Pérez *et al.* (2012) mencionan que *S. mammosum* tiene propiedades molusquicidas

aproximate time for its harvest is 30 years (García *et al.*, 2011); therefore, fertilizers and chemical insecticides are used to increase the growth of the seedlings. However, their repeated use contaminates soils and water (De Puerto *et al.*, 2014). To reduce environmental impact and improve profitability and sustainability of the agroforest systems, it is recommendable to use organic products based on plant extracts, given that these compounds contain soluble nutrients that can favor the growth of the plants and promote a more robust development, but without the harmful effects of the chemical fertilizers (Rivera-Cruz *et al.*, 2010). Plant extracts can be applied as phyto-protectors or bio-stimulants or both to increment the stem and foliar biomass, as is the case of the extracts of marine algae (Araújo *et al.*, 2012) or of different species of medicinal plants, which also protect against phytopathogens (Muthukumar *et al.*, 2010). In detail, the leguminous species *Ulex europaeus* L., when applied in aqueous extracts on plants of *Capsicum annuum* L., increases foliar production, total biomass and the content of polyphenols (Tighe-Neira *et al.*, 2016). The aqueous extracts of the leaves and petioles of *M. oleifera* can increment the stem and biomass of *Eruca esicaria* (Mona, 2013), and thus are recommended for applying as bio-stimulants in different crops.

With respect to the castor bean (*Ricinus communis* L.), the residue of this plant contains high levels of N, which when used in low doses improves the growth of the plants to which it is applied (Lima *et al.*, 2011). The ricin produced by the castor bean plant presents insecticide properties which offers protection to plants (Flores-Macías, *et al.*, 2016), and the turkey berry (*Solanum torvum* Sw.) is used in the control of *Escherichia coli* (Domínguez-Odio *et al.*, 2012) and has an effect *in vitro* as an ovicide and larvicide against *Haemonchus contortus* in small animals (Kamaraj and Abdul, 2011). Nipplefruit (*Solanum mammosum* L.) is used to improve the growth and development of the inchi plant (*Plukenetia volubilis* L.) (Díaz *et al.*, 2014). Nava-Pérez *et al.* (2012) mention that *S. mammosum* has molluscicide properties due to the contents of steroidal alkaloids present in the fruits. However, in the reviewed literature no research was found about the use of these species as biofertilizers for mahogany plants. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of the extracts of *R. communis*, *S. torvum* and *S. mammosum* on the

debido a los contenidos de alcaloides esteroideos presentes en los frutos. Pero en la literatura revisada no se encontraron investigaciones sobre el uso de estas especies como biofertilizantes para plantas de caoba. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los extractos de *R. communis*, *S. torvum* y *S. mammosum* sobre el crecimiento y la calidad de plántulas de caoba en vivero. La hipótesis fue que los extractos de estas especies tendrán efectos positivos en los atributos de crecimiento y calidad de la caoba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana IIAP-San Martín (06° 31' 37" S, 76° 17' 56" O, y 311 m de altitud), Perú. Las semillas de caoba provinieron de cinco árboles de la provincia de El Dorado, región San Martín, Perú. Los árboles se seleccionaron por su calidad superior, según el método usado por Vallejos *et al.* (2010). Las semillas pre-germinaron en arena fina y después se sembraron en bolsas almacigueras negras de 4x7 pulgadas y volumen 0.4 L, con sustrato a base de tierra agrícola de la región. Una muestra del sustrato se envió para su análisis al laboratorio de suelos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, y los resultados mostraron un pH de 4.85, conductividad eléctrica (CE) 0.37 dSm, materia orgánica (MO) 3.31%, N 1.12%, P 17.0 ppm, K 101.0 ppm, B 1.3 ppm, Cu 2.3 ppm, Fe 3.3 ppm, Mn 4.3 ppm y Zn 5.3 ppm.

Las plantas se regaron cada 2 d y los sustratos se mantuvieron en su capacidad de campo. El control de plagas se realizó con un insecticida organofosforado (O, O-diethyl O-3, 5, 6-trichloropyridin-2-il fosforotioato), que se espolvoreó en dosis de 150 g cada mes alrededor del vivero. Las plantas se colocaron en un vivero protegido con malla sombra de 80%. Durante el periodo experimental en el vivero la humedad relativa promedio fue 81.6% y la temperatura promedio 29.9 °C.

El diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro tratamientos: T1) *R. communis*, T2) *S. torvum*, T3) *S. mammosum*, y T4) testigo sin extracto vegetal; con cuatro repeticiones de 45 unidades experimentales, y la planta fue la unidad experimental. Los extractos se aplicaron vía foliar cada 15 d por 60 d y a partir de los 15 d después de la germinación. La cantidad aplicada fue 50 mL por mochila de 20 L.

La selección de las plantas para elaborar los extractos se realizó así: antes de la floración se recolectaron hojas de higuera y tomatillo, y frutos de teta de vaca, y se cuidó que las plantas estuviesen libres de enfermedades y picaduras de insectos. El material recolectado se secó 7 d al medio ambiente. Las hojas y frutos secos se cortaron en trozos pequeños y se reservó

growth and quality of mahogany seedlings in the greenhouse. The hypothesis was that the extracts of these species will have positive effects on the attributes of growth and quality of the mahogany.

## MATERIALS AND METHODS

The investigation was carried out at the Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana IIAP-San Martín (06° 31' 37" S, 76° 17' 56" W, and 311 m altitude), Peru. The mahogany seeds came from five trees of the province of El Dorado, in the San Martín region. The trees were selected for their superior quality, according to the method used by Vallejos *et al.* (2010). The seeds were pre-germinated in fine sand and later were sown in black potting bags measuring 4x7 inches with a volume of 0.4 L, with a substrate of agricultural soil of the region. A sample of the substrate was sent for analysis to the soils laboratory of the Universidad Nacional Agraria La Molina, and the results showed a pH of 4.85, electric conductivity (EC) 0.37 dSm, organic matter (OM) 3.31%, N 1.12%, P 17.0 ppm, K 101.0 ppm, B 1.3 ppm, Cu 2.3 ppm, Fe 3.3 ppm, Mn 4.3 ppm and Zn 5.3 ppm.

The plants were irrigated every 2 d and the substrates were maintained at field capacity. Pest control was done with an organophosphate insecticide (O, O-diethyl, O-3, 5, 6-trichloropyridin-2-il phosphorothioate), which was sprinkled in doses of 150 g every month around the nursery. The plants were placed in a nursery protected by a shade mesh of 80%. During the experimental period in the nursery, the average relative humidity was 81.6% and the average temperature 29.9 °C.

The experimental design was completely randomized, with four treatments: T1) *R. communis*, T2) *S. torvum*, T3) *S. mammosum*, and T4) control without plant extract; with four replications of 45 experimental units, and the plant was the experimental unit. The extracts were applied to the foliar surfaces every 15 d for 60 d and starting at 15 d after germination. The amount applied was 50 mL per backpack of 20 L.

The selection of the plants for the extracts was as follows: prior to flowering, leaves of castor bean and turkey berry were collected, as well as fruits of the nipplefruit, and it was verified that the plants were free of disease and insect bites. The collected material was dried for 7 d in the environment. The leaves and fruit were cut in small pieces and 1.0 kg was reserved for each species. This material was placed in 2 L of warm boiled water in a container of dark glass with hermetic seal for its fermentation for 15 d. Next, the solution was filtered for its application (Domínguez-Odio *et al.*, 2012). The plant extracts were refrigerated at 2.0 -4.0 °C (Domínguez-Odio *et al.*, 2012) for

1.0 kg por cada especie. Este material se colocó en 2 L de agua hervida tibia en envase de vidrio oscuro con tapa hermética para su fermentación por 15 d. Después se filtró la solución para su aplicación (Domínguez-Odio *et al.*, 2012). Los extractos vegetales se refrigeraron entre 2.0 - 4.0 °C (Domínguez-Odio *et al.*, 2012) para su conservación. De cada extracto vegetal preparado se extrajeron 500 mL y se analizaron en el Laboratorio de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria la Molina, para conocer sus nutrientes principales.

Las variables morfológicas evaluadas en la caoba fueron: incremento de diámetro (ID) en mm·d<sup>-1</sup>; aumento de altura (IA) en cm·d<sup>-1</sup>; longitud de raíz (LR) en cm y número de raíces. Las raíces se evaluaron al final del experimento.

Los efectos de los extractos sobre el crecimiento de las plantas se determinó con los incrementos diarios del ID e IA, de acuerdo con Díaz *et al.* (2013). Los aumentos se evaluaron mediante la relación  $[(t_f - t_i)/n]$ , donde  $t_f$  es la medida final de la altura o diámetro a los 60 d,  $t_i$  es la medida inicial de la altura o diámetro registrado antes de la primera aplicación de los tratamientos y “n” el tiempo que duró la evaluación (60 d). Para las mediciones de altura y diámetro se eligieron 180 plantas por tratamiento (45 plantas por repetición) con alturas de 15 a 15.8 cm y diámetros de 1.5 a 1.9 mm, para disminuir la variabilidad de los datos y observar con mejor claridad los incrementos.

Los atributos de calidad evaluados fueron el peso seco total (PST), la relación peso seco aéreo sobre peso seco radicular (PSA/PSR); el índice de robustez (IR), calculado como el cociente entre la altura y el diámetro del tallo; y el índice de calidad de Dickson (ICD), calculado como el cociente entre el peso seco total y la sumatoria del IR más el PSA/PSR, (Rueda-Sánchez *et al.*, 2014). Los resultados se compararon con los atributos de calidad sugeridos por Rueda-Sánchez *et al.* (2012) y Prieto-Ruiz *et al.* (2007).

Para determinar el PST se seleccionaron 80 plantas de cada tratamiento (20 plantas por cada repetición) y se secaron en estufa a 70 °C por 72 h y hasta peso seco constante. Los pesos secos permitieron obtener la relación PSA/PSR y el índice de calidad de Dickson, donde los valores más altos de ICD indican plantas de mejor calidad (Cuadro 1).

El análisis de los resultados se realizó con ANDEVA de una vía y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), para lo cual se usó el programa estadístico Infostat (versión libre).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis químicos efectuados a los extractos vegetales aplicados a las plántulas de caoba se muestran en el Cuadro 2. Las cantidades de nutrientes en estos extractos se consideran viables para una fertilización vía foliar (Fageria *et al.*, 2009).

their conservation. From each prepared plant extract, 500 mL were extracted and analyzed in the Soils, Plants, Water and Fertilizers Laboratory at the Universidad Nacional Agraria La Molina, to identify its principal nutrients.

The morphological variables evaluated in the mahogany were as follows: increase of diameter (ID) in mm·d<sup>-1</sup>; increase in height (IH) in cm·d<sup>-1</sup>; length of root (LR) in cm and number of roots. The roots were evaluated at the end of the experiment.

The effects of the extracts on the growth of the plants was determined with the daily increments of the ID and IH, according to Díaz *et al.* (2013). The increments were evaluated using the ratio  $[(t_f - t_i)/n]$ , where  $t_f$  is the final measurement of height or diameter at 60 d,  $t_i$  is the initial measurement of height or diameter registered prior to the first application of the treatments and “n” is the duration time of the evaluation (60 d). For the measurements of height and diameter, 180 plants per treatment were selected (45 plants per replication) with heights of 15 to 15.8 cm and diameters of 1.5 to 1.9 mm, in order to reduce the variability of the data and to observe the increments with more clarity.

The attributes of quality evaluated were total dry weight (TDW), the ratio aboveground dry weight over radicular dry weight (ADW/RDW); the robustness index (RI), which was calculated as the quotient between total dry weight and the sum of the RI plus the ADW/RDW (Rueda-Sánchez *et al.*, 2014). The results were compared with the quality attributes suggested by Rueda-Sánchez *et al.* (2012) and Prieto-Ruiz *et al.* (2007).

To determine the TDW, 80 plants were selected from each treatment (20 plants per replication), which were dried in an oven at 70 °C for 72 h and until they reached constant dry weight. The dry weights made it possible to obtain the ratio ADW/RDW and the Dickson quality index, where the highest values of DQI indicate plants of higher quality (Table 1).

The analysis of the results was made with ANOVA and means were compared with the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ), using the statistical program Infostat (free version).

## RESULTS AND DISCUSSION

The chemical analyses made to the plant extracts applied to the seedlings are shown in Table 2. The amounts of nutrients in these extracts are considered viable for foliar fertilization (Fageria *et al.*, 2009).

The plants with plant extracts had higher growth rates in height and diameter with respect to the control (Table 3), with *R. communis* 37% in height and 83% in diameter, *S. mammosum* 33% in height and diameter, and *S. torvum* 19 % in height and 28% in diameter. This improvement in growth may be

**Cuadro 1. Intervalos de calidad para atributos morfológicos de plántulas.**  
**Table 1. Quality intervals for morphological attributes of seedlings.**

| Variable                      | Tipo de planta | Calidad |             |        |
|-------------------------------|----------------|---------|-------------|--------|
|                               |                | Baja    | Media       | Alta   |
| Altura (cm)                   | Latifoliadas   | < 12.0  | 12.0 – 14.9 | ≥ 15.0 |
| Diámetro (mm)                 | Latifoliadas   | < 2.5   | 2.5 – 3.9   | ≥ 4.0  |
| Índice de robustez            | Latifoliadas   | ≥ 8.0   | 7.9 – 6.0   | < 6.0  |
| Relación PSA/PSR <sup>†</sup> | Todas          | ≥ 2.5   | 2.4 – 2.0   | < 2.0  |
| Índice de Dickson             | Todas          | < 0.2   | 0.2 – 0.4   | ≥ 0.5  |

<sup>†</sup>Relación peso seco aéreo (PSA) sobre peso seco radicular (PSR). ♦ Ratio aboveground dry weight (ADW) over radicular dry weight (RDW).

Fuente: Modificado de Prieto *et al.* (2007) y Rueda *et al.* (2012). ♦ Source: Modified from Prieto *et al.* (2007) and Rueda *et al.* (2012).

**Cuadro 2. Análisis químico de los extractos vegetales aplicados a los plantones de caoba.**  
**Table 2. Chemical analysis of the plant extracts applied to the mahogany seedlings.**

| Análisis                | Unidad             | <i>R. communis</i> (T1) | <i>S. torvum</i> (T2) | <i>S. mammosum</i> (T3) |
|-------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| pH                      |                    | 4.32                    | 5.29                  | 4.28                    |
| Conductividad eléctrica | dSm                | 5.44                    | 12.7                  | 3.16                    |
| Sólidos totales         | g L <sup>-1</sup>  | 13.16                   | 27.48                 | 7.92                    |
| MO en solución          | g L <sup>-1</sup>  | 9.52                    | 18.24                 | 5.92                    |
| N total                 | mg L <sup>-1</sup> | 662.7                   | 1316                  | 210                     |
| P total                 | mg L <sup>-1</sup> | 150.2                   | 457.7                 | 15.89                   |
| K Total                 | mg L <sup>-1</sup> | 1520                    | 1580                  | 794                     |
| Ca total                | mg L <sup>-1</sup> | 351                     | 158.2                 | 85.8                    |
| Mg total                | mg L <sup>-1</sup> | 77                      | 202                   | 40                      |
| Na total                | mg L <sup>-1</sup> | 12.2                    | 23.6                  | 14.8                    |
| Fe total                | mg L <sup>-1</sup> | 1.94                    | 6.3                   | 1.76                    |
| Cu total                | mg L <sup>-1</sup> | 0.36                    | 0.82                  | 0.18                    |
| Zn total                | mg L <sup>-1</sup> | 1.11                    | 1.72                  | 0.58                    |
| Mn total                | mg L <sup>-1</sup> | 0.8                     | 2.4                   | 0.16                    |
| B total                 | mg L <sup>-1</sup> | 4.25                    | 3.93                  | 0.95                    |

MO: materia orgánica. ♦ MO: organic matter.

Fuente: Laboratorio de la Universidad Nacional Agraria La Molina (2014). ♦ Source: Laboratory of the Universidad Nacional Agraria La Molina (2014).

Las plantas con extractos vegetales tuvieron tasas de crecimiento superiores en altura y diámetro respecto al testigo (Cuadro 3), con *R. communis* 37% en altura y 83% en diámetro, *S. mammosum* 33% en altura y diámetro, y *S. torvum* 19% en altura y 28% en diámetro. Esta mejora en crecimiento se puede atribuir la penetración de los extractos a través de la cutícula, la cual posee una red de polisacáridos que contribuye al transporte de agua y solutos; o bien por los estomas, que permiten la difusión de los líquidos a lo largo de sus paredes (Fernández *et al.*, 2015).

attributed to the penetration of the extracts through the cuticle, which has a network of polysaccharides that contribute to the transport of water and solutes; or through the stomas which permit the diffusion of the liquids along their walls (Fernández *et al.*, 2015). Foliar nutrition can mobilize nutrients to organs where it is not applied, such as roots and vascular and storage tissue, which has a significant benefit for the entire plant (Fernández *et al.*, 2015). In this sense, the contributions of N, Fe, and Mn provided by the extracts were limited in the

**Cuadro 3. Variables morfológicas y de calidad en plántulas de caoba evaluadas con tres extractos vegetales.**  
**Table 3. Morphological variables and quality in mahogany seedling evaluated with three plant extracts.**

| Variables morfológicas y de calidad | Extractos vegetales          |                            |                              |                 |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------|
|                                     | <i>R. communis</i> .<br>(T1) | <i>S. torvum</i> .<br>(T2) | <i>S. mammosum</i> .<br>(T3) | Testigo<br>(T4) |
| I. D. (mm d <sup>-1</sup> )         | 0.033a                       | 0.023b                     | 0.024b                       | 0.018c          |
| I. A. (cm d <sup>-1</sup> )         | 0.213a                       | 0.186c                     | 0.208b                       | 0.156d          |
| Número de raíces                    | 54.250a                      | 42.500b                    | 51.000a                      | 39.500b         |
| Longitud de raíz (cm)               | 15.353b                      | 16.675a                    | 13.850c                      | 14.250c         |
| Peso seco total (g)                 | 3.193a                       | 2.269c                     | 2.715b                       | 1.977d          |
| Índice de robustez                  | 7.492d                       | 7.917c                     | 8.844a                       | 8.403b          |
| Relación PSA/PSR                    | 3.950b                       | 3.504c                     | 4.938a                       | 3.496c          |
| Índice de calidad de Dickson        | 0.279a                       | 0.206b                     | 0.180c                       | 0.160d          |

I. D.: incremento en diámetro; I. A.: incremento en altura; PSA/PSR: Relación peso seco aéreo sobre peso seco radicular. Medias con letras distintas en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey;  $p < 0.05$ ). ♦ I.D.: increment in diameter; I.A. increment in height; ADW/RDW: Ratio aboveground dry weight over radicular dry weight. Means with different letters in a row are statistically different (Tukey;  $p < 0.05$ ).

La nutrición foliar puede movilizar nutrientes hasta órganos donde no se aplica, tales como las raíces y los tejidos vasculares y de almacenamiento, lo que tiene un beneficio significativo para toda la planta (Fernández *et al.*, 2015). En este sentido, los aportes de N, Fe, y Mn que proporcionaron los extractos estaban limitados en el suelo agrícola usado como sustrato y, por tanto, la fertilización foliar permitió compensar estas deficiencias y favoreció el desarrollo de tallos y follaje (Fageria *et al.*, 2009). El crecimiento de las plantas también promovió la formación de nuevas raíces, lo cual se relaciona con una mayor capacidad para obtener recursos y sobrevivir (Cuesta *et al.*, 2010). Otro elemento que favorece el desarrollo, y que se encontró en los extractos vegetales es el zinc, porque es precursor de la producción de auxinas que promueven división y elongación celular, e influye en la reactividad del ácido indolacético que actúa como fitoestimulante hormonal (Méndez-Argüello *et al.*, 2016).

La aplicación de *R. communis* produjo tasas de crecimiento en altura y diámetro superiores 18% a *S. torvum* y 6% a *S. mammosum* (Cuadro 3). Estos valores pudieron deberse al mayor contenido de Ca del extracto de *R. communis* (122% más que *S. torvum* y 309% más que *S. mammosum*) y B (8% más que *S. torvum* y 347% más que *S. mammosum*). Estos dos elementos son fundamentales para el desarrollo de las yemas apicales y de las puntas de las raíces, porque promueven nuevos brotes y raíces (Sathi *et al.*, 2017).

agrícola used as substrate and, therefore, the foliar fertilization compensated for these deficiencies and favored the development of stems and foliage (Fageria *et al.*, 2009). The growth of the plants also favored the development of new roots, which is related to a greater capacity for obtaining resources and survival (Cuesta *et al.*, 2010). Another element that favors development, and which was found in the plant extracts is zinc, because it is a precursor of the production of auxins that promote cell division and elongation, and influences the reactivity of the indoleacetic acid that acts as a hormonal phyto-stimulant (Méndez-Argüello *et al.*, 2016).

The application of *R. communis* produced growth rates in height and diameter 18% higher than *S. torvum* and 6% higher than *S. mammosum* (Table 3). These values may be due to the higher content of Ca from the extract of *R. communis* (122% more than *S. torvum* and 309% more than *S. mammosum*) and B (8% more than *S. torvum* and 347% more than *S. mammosum*). These two elements are fundamental for the development of the apical buds and the tips of the roots, because they promote new shoots and roots (Sathi *et al.*, 2017).

The lower increment in diameter and height produced by *S. torvum* may be due to the high amounts of Mg (162% more than *R. communis* and 405% more than *S. mammosum*) or to cations of potassium (K<sup>+</sup>), with which the absorption of the K decreases, thus affecting the development of the plant (Fageria, 2009).

El menor incremento en diámetro y altura que produjo *S. torvum* pudo deberse a los altos contenidos de Mg (162% más que *R. communis* y 405% más que *S. mammosum*) o de cationes de potasio (K+), ante los cuales la adsorción del K disminuye, lo que afecta el desarrollo de la planta (Fageria, 2009).

Los mejores atributos de calidad se obtuvieron con el extracto de *R. communis* (Cuadro 2), que generó 41% más biomasa que *S. torvum* y 18% más que *S. mammosum*. Con este extracto también se logró el mejor índice de robustez, el cual determina el balance entre la superficie de transpiración y la resistencia mecánica de la planta, factores que inciden sobre su capacidad de supervivencia y crecimiento, debido a que valores bajos de IR indican una planta con mayor resistencia y con menor probabilidad de daño físico por la acción del viento, sequías o heladas en el sitio de plantación. El IR recomendado para especies arbóreas es menor a 6.0, porque árboles más gruesos se asocian a una mejor calidad e indican plantas más robustas y con tallos vigorosos, mientras que Prieto-Ruiz *et al.* (2007) consideran que el 7.3 corresponde a plantas de calidad media, por estar dentro del rango de 6.0 a 7.9 (Cuadro 1).

Con el extracto de *S. torvum* se obtuvo la misma relación PSA/PSR que con el testigo, mientras que el extracto de *R. communis* tuvo un cociente superior en 13% y el de *S. mammosum* fue superior en 41% con respecto al testigo. Estos porcentajes indican que *R. communis* y *S. mammosum* promovieron el desarrollo del follaje debido al aprovechamiento vía foliar, mientras que con *S. torvum* la absorción de nutrientes fue menor, lo que es congruente con el aumento en la longitud de las raíces (9% más largas que *R. communis*) para buscar recursos en el sustrato. Los valores de IR obtenidos en nuestros experimentos indican plantas de calidad baja, porque son superiores a lo sugerido por Prieto-Ruiz *et al.* (2007) y Rueda *et al.* (2012) (Cuadro 1), mientras que Mateo-Sánchez *et al.* (2011) mencionaron que en especies de latifoliadas tropicales, como en el Cedro rojo (*Cedrela odorata* L.), perteneciente a la misma familia Meliaceae, la relación PSA/PSR puede ser mayor a 2.0 cuando las plantas se encuentran en ambientes con disponibilidad de agua natural (selva alta perennifolia). Además, la mejor calidad de planta se obtiene cuando la parte aérea es relativamente grande y la raíz mediana, lo que puede contribuir a una mayor supervivencia, porque se evita que la absorción exceda la capacidad

The best quality attributes were obtained with the extract of *R. communis* (Table 2), which generated 41% more biomass than *S. torvum* and 18% more than *S. mammosum*. This extract also produced the best robustness index, which determines the balance between the surface transpiration and the mechanical resistance of the plant, factors which influence its capacity for survival and growth, given that low values of RI indicate a plant with greater resistance and with lower probability of physical damage due to wind, drought or frost in the plantation site. The RI recommended for arboreal species is lower than 6.0, because thicker trees are associated with better quality and indicate more robust plants and with vigorous stems, whereas Prieto-Ruiz *et al.* (2007) consider that 7.3 corresponds to plants of medium quality, being in the range of 6.0 to 7.9 (Table 1).

With the extract of *S. torvum*, the same ratio ADW/RDW was obtained as with the control, while the extract of *R. communis* had a quotient 13% higher, and with *S. mammosum*, 41% higher than the control. These percentages indicate that *R. communis* and *S. mammosum* promoted the development of foliage due to foliar absorption, whereas with *S. torvum* the absorption of nutrients was lower. This is congruent with the increase in the length of the roots (9% longer than *R. communis*) for seeking resources in the substrate. The values of RI obtained in our experiments indicate plants of low quality, because they are higher than what was suggested by Prieto-Ruiz *et al.* (2007) and Rueda *et al.* (2012) (Table 1), while Mateo-Sánchez *et al.* (2011) mentioned that in tropical latifoliate species, such as red cedar (*Cedrela odorata* L.), belonging to the same family Meliaceae, the ratio ADW/RDW can be higher than 2.0 when the plants are found in environments with availability of natural water (evergreen forest). Furthermore, the best quality of the plant is obtained when the aboveground part is relatively large and the root medium size, which contributes to greater survival, because it prevents the absorption from exceeding the capacity of transpiration, given that the natural habitat of cedar and mahogany is of high humidity (Mateo-Sánchez *et al.*, 2011).

The highest Dickson quality index obtained with *R. communis* indicates that this extract was the most adequate for the mahogany plants, with good total dry weight, development and balance between the aboveground and belowground fractions.

de transpiración dado que el hábitat natural del cedro y la caoba es de alta humedad (Mateo-Sánchez *et al.*, 2011).

El mayor índice de calidad de Dickson obtenido con *R. communis* indica que este extracto fue el más adecuado para las plantas de caoba, con un buen peso seco total, desarrollo y equilibrio entre las fracciones aérea y radicular.

Aunque el extracto de *S. torvum* tuvo mayor contenido de nutrientes, los atributos morfológicos y de calidad obtenidos con éste fueron menores a los alcanzados por los otros extractos. Tales resultados pueden estar relacionados con su pH superior que pudo dificultar la absorción de los nutrientes (Fernández *et al.*, 2015), su mayor cantidad de Mg que afecta la asimilación de K y por ende de otros nutrientes, como N. Además, el mayor contenido de Na en los extractos de *S. torvum* (93% más que *R. communis* y 59% más que *S. mammosum*) pudo ser otro factor que afectó la absorción foliar de los nutrientes al aplicar las dosis utilizadas, ya que los iones de Na<sup>+</sup> compiten por la absorción de K<sup>+</sup> (Jouyban, 2012). El mejor crecimiento y calidad en las plantas que recibieron extracto de *R. communis* se pudo deber a que la proporción de nutrientes fue en cantidades adecuadas para el mejor crecimiento y calidad de plantas de caoba y por su nivel de pH que permitió la mejor absorción de nutrientes (Sathi *et al.*, 2017).

Los resultados del presente estudio demostraron que los extractos utilizados pueden proveer un fortalecimiento estructural, y estimular un desarrollo vigoroso de las plántulas de caoba, lo que permite una mayor resistencia a las condiciones extremas. Sin embargo, los contenidos de nutrientes en los extractos y su interacción con las plantas de esta especie indican una relación compleja que aún requiere más estudios.

## CONCLUSIONES

Los extractos vegetales de *R. communis*, *S. torvum* y *S. mammosum* mejoraron los atributos morfológicos y de calidad de las plántulas de caoba en vivero. El extracto de hojas de *R. communis* proporcionó el mejor balance de nutrientes para esta etapa de las plántulas porque incrementó significativamente el crecimiento aéreo y la densidad de las raíces, lo cual repercutió en un mayor desarrollo de biomasa en relación con los otros extractos.

Although the extract of *S. torvum* had a higher content of nutrients, the morphological and quality attributes with this plant were lower than those obtained with the other extracts. These results may be related to its higher pH, which could make the absorption of the nutrients more difficult (Fernández *et al.*, 2015), its higher level of Mg which affects the assimilation of K and thus of other nutrients, such as N. Besides, the higher content of Na in the extracts of *S. torvum* (93% more than *R. communis* and 59% more than *S. mammosum*) might be another factor that affected foliar absorption of the nutrients when applying the doses used, given that the ions of Na<sup>+</sup> compete for the absorption of K<sup>+</sup> (Jouyban, 2012). The best growth and quality of the plants which received extract of *R. communis* may be due to the fact that the proportion of nutrients was in adequate amounts for the best growth and plant quality of mahogany and for its level of pH, which permitted better absorption of nutrients (Sathi *et al.*, 2017).

The results of the present study demonstrated that the extracts utilized can provide structural strength and stimulate a vigorous development of the mahogany seedlings, which permits greater resistance to extreme conditions. However, the contents of nutrients in the extracts and their interaction with the plants of this species indicate a complex relationship that requires further studies.

## CONCLUSIONS

The plant extracts of *R. communis*, *S. torvum* and *S. mammosum* improved the morphological attributes and quality of the mahogany seedlings in the nursery. The extract of leaves of *R. communis* provided the best balance of nutrients for this stage of the seedlings, given that it significantly increased aboveground growth and root density, which resulted in a greater development of biomass with respect to the other extracts.

—End of the English version—

—\*—

## LITERATURA CITADA

- Araújo, I., L. Peruch L., and M. Stadnik. 2012. Efeito do extrato de algas e da argila silicatada na severidade da alternariase e na produtividade da cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.). *Trop. Plant Pathol.* 37: 363-367.
- Cuesta B., P. Villar-Salvador, J. Puértolas, D. F. Jacobs, and J. M. Rey-Benayas. 2010. Why do large, nitrogen rich seedlings better resist stressful transplanting conditions? A physiological analysis in two functionally contrasting Mediterranean forest species. *For. Ecol. Manage.* 260: 71-78.
- De Puerto Rodríguez, A., S. Suárez, y D. E. Palacio. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Rev. Cub. Hig. Epidem.* 52: 372-387.
- Díaz C., P., C. Tello S., y L. A. Arévalo L. 2014. Efecto del uso de tutores y aplicación de biofertilizantes en el crecimiento y desarrollo de *Plukenetia volubilis* L. "Sacha Inchi". *Folia Amazónica* 23: 119-130.
- Díaz C., P., D. Torres S., Z. M. Sánchez V., y L. A. Arévalo L. 2013. Comportamiento morfológico de cedro (*Cedrela odorata*) y caoba (*Swietenia macrophylla*) en respuesta al tipo de sustrato en vivero. *Folia Amazónica* 22: 25-33.
- Domínguez-Odio, A., E. Puente-Zapata, I. Y. Pérez-Andrés, y H. Salas-Pérez. 2012. *Solanum torvum*. Toxicidad sobre microorganismos y células espermáticas. *Rev. Méd. IMSS.* 50: 363-370.
- Fageria, N. K., M. P. Barbosa, A. Moreire, and C. M. Guimarães. 2009. Foliar fertilization of crop plants. *J. Plant Nutr.* 32: 1044-1064.
- Fernández, V., T., Sotiropoulos and P. Brown. 2015. Principios Científicos y Práctica de Campo. International Fertilizer Industry Association. Paris. 156 p.
- Flores-Macías A., G. Vela-Correa, M. L. Rodríguez-Gamiño, Y. Akhtar, R. Figueroa-Brito, V. Pérez-Moreno, M. A. Rico-Rodríguez, y M. A. Ramos-López. 2016. Effect of potassium nitrate on the production of ricinine by *Ricinus communis* and its insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda*. *Rev. Fitotec. Mex.* 39: 41-47.
- García C., X., S. Rodríguez B., y J. Islas G. 2011. Evaluación financiera de plantaciones forestales de caoba en Quintana Roo. *Rev. Mex. Cienc. For.* 2: 7-26.
- Jouyban, Z. 2012. The effects of salt stress on plant growth. *Tech. J. Eng. Appl. Sci.* 2: 7-10.
- Kamaraj C., and A. Abdul R. 2011. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 91: 400-404.
- Lima R., L. S., S. S., Liv, L. R., Sampaio, V., Sofiatti, J. A., Gomes, and N. E. M. Beltrão. 2011. Blends of castor meal and castor husks for optimized use as organic fertilizer. *Ind. Crop. Prod.* 33: 364-368. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.008>.
- Mateo-Sánchez, J. J., R. Bonifacio-Vázquez, S. R. Pérez-Ríos, J. Capulín-Grande, y L. Mohedano-Caballero. 2011. Producción de (*Cedrela odorata* L.) en aserrín crudo con diferentes dosis de fertilización, en Tecpan de Galeana, Guerrero. *Ra Ximhai* 7: 195-204.
- Méndez-Argüello B., I. Vera-Reyes, E. Mendoza-Mendoza, L. A. García-Cerda, B. A. Puente-Urbina, y R. H. Lira-Saldívar. 2016. Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annuum* por nanopartículas de óxido de zinc. *Nova Scientia* 8: 140-156.
- Mona M., A. 2013. The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. sativa) plants. *J. Biochem. Sci.* 1: 029-036.
- Muthukumar, A., A. Eswaran, S., Nakkeeran, and G. Sangeetha. 2010. Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. *Crop Protect.* 29: 1483-1488.
- Nava-Pérez, E., C. García-Gutiérrez, J. Camacho-Báez, y E. Vázquez-Montoya. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai* 8:17-29.
- Prieto-Ruiz, J. A., P. A. Domínguez-Calleros, E. H. Cornejo-Oviedo, y J. J. Nívar-Chaidez. 2007. Efecto del envase y del riego en viveros en el establecimiento de *Pinus cooperi* Blanco en dos condiciones de sitio. *Madera y Bosques* 13:79-97.
- Rivera-Cruz, M. C., A. Trujillo-Narcía, y D. E. Alejo P. 2010. Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de N, solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento de naranjo agrio *Citrus aurantium* L. *Asociación Inter-ciencia* 35: 113-119.
- Rueda-Sánchez A, J. D. Benavides-Solorio, J. A. Prieto-Ruiz, J. T. Sáenz-Reyez, G. Orozco-Gutiérrez, y A. Molina-Castañeda. 2012. Calidad de planta producida en los viveros forestales de Jalisco. *Rev. Mex. Cien. Forest.* 3: 69-82.
- Rueda-Sánchez, A., J. D. Benavides-Solorio, J. T. Saenz-Reyez, H. J. Muñoz-Flores, J. A. Prieto-Ruiz, y G. Orozco G. 2014. Calidad de planta producida en los viveros forestales de Nayarit. *Rev. Mex. Cien. Forest.* 5: 58-73.
- Sathi B, N., A. K. Sinha, P. S. Medda, and A. Ghosh. 2017. Impact of potassium-boron interaction on leaf nutrient content and nut setting of coconut. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6: 4025-4037.
- Tighe-Neira, R., G. Díaz-Harris, C. Leonelli-Cantergiani, M. Iglesias-González, D. Martínez-Gutiérrez, Morales-Ulloa, y P. Mejías-Lagos. 2016. Efecto de extractos de *Ulex europaeus* L. en la producción de biomasa de plántulas de ají (*Capsicum annuum* L.), en condiciones de laboratorio. *Idesia (Arica)* 34: 19-25.
- Vallejos, J., Y. Badilla, F. Picado, y O. Murillo. 2010. Metodología para la selección e incorporación de árboles plus en programas de mejoramiento genético forestal. *Agron. Costarricense* 34: 105-119.



# CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DETERMINACIÓN DE MINERALES POR $\mu$ -XRF EN FRUTO DE CALABAZA (*Cucurbita moschata* DUCH)

## CHARACTERISTICS AND DETERMINATION OF MINERALS BY $\mu$ -XRF IN SQUASH FRUIT (*Cucurbita moschata* DUCH)

Francisco Alberto **Chí-Sánchez**<sup>1</sup>, Carlos Juan **Alvarado-López**<sup>2</sup>, Jairo **Cristóbal-Alejo**<sup>1</sup>, Arturo **Reyes-Ramírez**<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/I.T. Conkal. Avenida Tecnológico s/n, C.P. 97345, Conkal, Yucatán, México. (arturo.reyes@itconkal.edu.mx). <sup>2</sup>Catedrático CONACYT-Instituto Tecnológico de Conkal, C.P. 97345, Conkal, Yucatán, México.

### RESUMEN

En la península de Yucatán, México, el sistema milpa involucra una interacción de siembra de dos o tres especies de plantas principales como el maíz (*Zea mays*), el frijol (*Phaseolus vulgaris*) y la calabaza (*Cucurbita argyrosperma* o *C. moschata*). Sin embargo, en algunas regiones solo se cultiva maíz y *C. moschata*. Esta calabaza puede mostrar formas, tamaños y colores diversos en una sola plantación, debido a que los productores siembran distintos cultivares de la misma especie. Esta especie se consume fresca, como verdura, y las semillas de la fruta seca se usan en platillos regionales y dulces. El objetivo de este estudio fue caracterizar la morfología y la composición mineral de la calabaza. La hipótesis fue que las variantes de calabaza *C. moschata* cultivadas presentan variación morfológica, la cual está presente en el contenido de los minerales en semillas y en el fruto. Para este estudio se recolectaron seis variantes de calabaza cultivadas en dos parcelas de Conkal, Yucatán, México. Las evaluaciones incluyeron las características morfológicas de la fruta y la composición mineral en semillas, pericarpio y mesocarpio, mediante análisis  $\mu$ -XRF. Las variantes de *C. moschata* presentan morfología diferente (semillas y frutos). El contenido de minerales en semillas y fruta (pericarpio y mesocarpio) presentó diferencias significativas entre las variantes. La variante CA4 presentó contenido alto de P, K, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn. Variantes se identificaron con características sobresalientes en semillas y característica de los frutos (tamaño, forma, y grosor de la pulpa). El contenido de minerales mostró diferencias entre las variantes de calabazas *C. moschata* cultivadas en las dos parcelas de Conkal.

**Palabras claves:** sistema milpa, Cucurbitaceae,  $\mu$ -XRF, macronutrientes, micronutrientes.

### ABSTRACT

In the Yucatan Peninsula, Mexico, the milpa system involves a planting interaction of two or three main plant species such as corn (*Zea mays*), beans (*Phaseolus vulgaris*) and squash (*Cucurbita argyrosperma* or *C. moschata*). However, in some regions only corn and *C. moschata* are grown. This squash may show different shapes, sizes and colors in a single plantation, since producers plant different cultivars of the same species. This species is consumed fresh, as a vegetable, and the seeds of the dried fruit are used in regional and sweet dishes. The objective of this study was to characterize the morphology and mineral composition of the squash. The hypothesis was that cultivated *C. moschata* squash variants show morphological variation, which is present in the mineral content of seeds and fruit. For this study, six squash variants were collected from two plots in Conkal, Yucatan, Mexico. The evaluations included the morphological characteristics of the fruit and the mineral composition in seeds, pericarp and mesocarp, by means of  $\mu$ -XRF analysis. *C. moschata* variants have different morphology (seeds and fruits). The mineral content in seeds and fruit (pericarp and mesocarp) showed significant differences between the variants. CA4 variant presented high content of P, K, Mg, Fe, Cu, Mn and Zn. Variants were identified with outstanding seed and fruit characteristics (size, shape, and flesh thickness). The mineral content showed differences between the *C. moschata* squash variants grown in the two plots of Conkal.

**Key words:** milpa system, Cucurbitaceae,  $\mu$ -XRF, macronutrients, micronutrients.

### INTRODUCTION

The genus *Cucurbita* belongs to the family Cucurbitaceae which includes five species of cultivable squash such as *Cucurbita*

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2019. Aprobado: diciembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 683-690. 2020.

## INTRODUCCIÓN

El género *Cucurbita* pertenece a la familia Cucurbitaceae que incluye cinco especies de calabazas cultivables como *Cucurbita moschata*, *C. pepo*, *C. argyrosperma*, *C. maxima* y *C. ficifolia* (Nwofia *et al.*, 2012). La milpa en la Península de Yucatán, México, es un sistema de producción tradicional complejo, que involucra las asociaciones de diferentes especies en las cuales se encuentran las calabazas *C. moschata* y *C. argyrosperma* y en el centro-oriente del estado de Yucatán, México, se cultivan al menos 26 poblaciones de *C. moschata* (Canul-Ku *et al.*, 2005), y se distinguen dos variantes según el ciclo de maduración; la calabaza pequeña (en el lenguaje Maya 'Xmejen kúum') y la de ciclo largo o calabaza grande ('Xnuuk Kúum') (Moo-Huchin *et al.*, 2013). *Cucurbita moschata* son globulares a oblatos, lisas o surcadas, presenta pulpa gruesa, no amarga, no fibrosa, semillas pequeñas y cortezas no lignificadas, dureza moderada, la forma del fruto suele ser achatada o redondeada y puede tener forma de campana o extremadamente larga con un extremo abultado; el color exterior de la fruta madura por lo general no es brillante, con mayor frecuencia es de color café, a veces amarillo o verde oscuro y el color de la pulpa es a menudo anaranjado intenso y la mayoría de las semillas son de color blanco a marrón claro (Elfiky *et al.*, 2012; Paris, 2015). Los estudios de análisis de minerales en *C. moschata* han mostrado variabilidad genética de compuestos bioactivos y minerales en la pulpa de los frutos maduros en diferentes accesiones del sureste de Brasil (Priori *et al.*, 2017). El consumo de la calabaza no es solo en fruta, porque se consumen las semillas por los beneficios que aportan para la salud y que se atribuyen a su contenido y composición mineral de macro y micronutrientes (Darrudi *et al.*, 2018).

El objetivo de este estudio fue caracterizar la morfología y determinar la composición mineral, mediante  $\mu$ -fluorescencia de rayos X, de seis colectas de *C. moschata* cultivadas en dos parcelas en Yucatán, México. La hipótesis fue que las seis variantes de calabaza presentan variación morfológica y que la variación está presente en el contenido de los minerales en semillas y en el fruto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Seis variantes de *C. moschata* cultivadas bajo condiciones de temporal en el ciclo de primavera-verano del 2017 y 2018, se

*moschata*, *C. pepo*, *C. argyrosperma*, *C. maxima* and *C. ficifolia* (Nwofia *et al.*, 2012). The milpa in the Yucatan Peninsula, Mexico, is a complex traditional production system, involving the associations of different species, in which *C. moschata* and *C. argyrosperma* squashes are found, and at least 26 populations of *C. moschata* are grown in the central-eastern part of the state of Yucatan, Mexico (Canul-Ku *et al.*, 2005), and two variants are distinguished according to the maturity cycle; the small squash (in the Mayan language 'Xmejen kúum') and the long cycle or large squash ('Xnuuk Kúum') (Moo-Huchin *et al.*, 2013). *Cucurbita moschata* are globular to oblate, smooth or furrowed, have thick, non-bitter, non-fibrous flesh, small seeds and non-lignified bark, moderate hardness, the shape of the fruit is usually flattened or rounded and can be bell-shaped or extremely long with a bulging end; the outer color of the ripe fruit is usually not shiny, most often brown, sometimes yellow or dark green, and the color of the flesh is often deep orange and most seeds are white to light brown (Elfiky *et al.*, 2012; Paris, 2015). Studies of mineral analysis in *C. moschata* have shown genetic variability of bioactive compounds and minerals in the pulp of ripe fruits in different accessions in southeastern Brazil (Priori *et al.*, 2017). Squash is not only consumed as a fruit, because the seeds have health benefits attributed to their content and mineral composition of macro and micronutrients (Darrudi *et al.*, 2018).

The objective of this study was to characterize the morphology and determine the mineral composition of six collections of *C. moschata* grown in two plots in Yucatan, Mexico, using X-ray fluorescence. The hypothesis was that the six squash variants present morphological variation and the variation is present in the mineral content of seeds and fruit.

## MATERIALS AND METHODS

Six *C. moschata* variants grown under rainfed conditions in the spring-summer cycle of 2017 and 2018 were collected from two plots in Conkal, Yucatan, Mexico. Five squash variants were collected in the first plot (San Antonio) (21° 05' 09.0" N and 89° 30' 50.1" W): CA1 (Saak-kuum), CA2 (Hard shell), CA3 (Chay caán), CA4 (Mejen Cholul), CA5 (Mejen); in the second plot (ITConkal) (21° 04' 38.8" N and 89° 29' 58.4" W) variant CA6 (Chay caán) was collected. Fresh weight, number of seeds per squash, shell thickness and flesh thickness were determined in the samples. Excess pulp was removed from the seeds and they

recolectaron en dos parcelas en Conkal, Yucatán, México. En la primera parcela (San Antonio) (21° 05' 09.0" N y 89° 30' 50.1" O) se obtuvieron cinco variantes de calabazas: CA1 (Saak-kuum), CA2 (Cáscara dura), CA3 (Chay caán), CA4 (Mejen Cholul), CA5 (Mejen); en la segunda parcela (ITConkal) (21° 04' 38.8" N y 89° 29' 58.4" O) se recolectó una variante, CA6 (Chay caán). En las muestras se determinó peso fresco, número de semillas por calabaza, grosor de la cáscara y grosor de la pulpa. En las semillas se eliminó el exceso de pulpa y se deshidrataron a temperatura ambiente durante dos días. En las calabazas se extrajo una muestra de la pulpa en forma de cilindro de 2.5 cm de diámetro. La pulpa y las semillas se secaron a 60 °C durante cinco días para determinar y cuantificar el contenido de minerales. La caracterización morfológica se realizó de acuerdo con los descriptores para Cucurbitaceae propuesto por Esquinas-Alcazar y Gulick (1983).

La determinación de los minerales se realizó con  $\mu$ -Fluorescencia de Rayos X ( $\mu$ -XRF) en un equipo M4 Tornado 100 (Bruker, Alemania). La detección de la radiación de fluorescencia se efectuó con un detector de dispersión de energía de silicio (XFlash). Las mediciones se realizaron al vacío a 2000 Pa. Las fracciones de masa obtenidas se corrigieron con la biomasa total. Con los datos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para estimar diferencias significativas mediante el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización morfológica

Las características de semilla y fruto fueron determinantes en las distintas variantes de calabazas y se observaron diferencias significativas. El peso del fruto fue de 763 a 1430 g y el peso de la semilla fue de 9.92 a 11.22 g por 100 semillas (Cuadro 1). Estos resultados concuerdan con Canul-Ku *et al.* (2005) en un estudio realizado en 26 poblaciones de *C. moschata* cultivadas en el centro-oriental del estado de Yucatán, y ellos encontraron frutos de 590 a 1100 g, con semillas pequeñas de peso promedio de 6.78 g en 100 semillas, en comparación con frutos y semillas de tamaño mayor observadas en *C. argyrosperma*.

### Análisis de minerales mediante $\mu$ -XRF

Los resultados de los análisis en la composición de mineral mediante  $\mu$ -XRF mostraron diferencias significativas en los minerales detectados en semillas y en el fruto de las seis variantes de calabazas. En el

were dried at room temperature for two days. A 2.5 cm diameter cylinder-shaped sample of the pulp was extracted from the squashes. The pulp and seeds were dried at 60 °C for five days to determine and quantify the content of minerals. Morphological characterization was done according to the descriptors for Cucurbitaceae proposed by Esquinas-Alcazar and Gulick (1983). The determination of the minerals was performed with  $\mu$ -XRF (X-ray fluorescence) in an M4 Tornado 100 (Bruker, Germany) unit. The detection of the fluorescence radiation was performed with an energy dispersive silicon detector (XFlash). The measurements were performed in a vacuum at 2000 Pa. The obtained mass fractions were corrected with the total biomass. With the data, an analysis of variance (ANOVA) was performed to estimate significant differences using the Statgraphics Centurion XVI program, version 16.1.11.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Morphological characterization

The characteristics of seed and fruit were decisive in the different variants of squashes and significant differences were observed. Fruit weight was 763 to 1430 g and seed weight was 9.92 to 11.22 g per 100 seeds (Table 1). These results are consistent with those of Canul-Ku *et al.* (2005) in a study of 26 *C. moschata* populations grown in the central-eastern part of the state of Yucatan, where they found fruits ranging from 590 to 1100 g, with small seeds averaging 6.78 g per 100 seeds, compared to larger fruits and seeds observed in *C. argyrosperma*.

### Analysis of minerals by $\mu$ -XRF

The results of the analysis of mineral composition by  $\mu$ -XRF showed significant differences in the minerals detected in seeds and fruit of the six squash variants. Analysis of Mg in seeds yielded concentrations of 2.96 (CA5) to 24.14 (CA1) g kg<sup>-1</sup> on a dry weight basis (Table 2). The Mg content in seeds of the CA1 variants of *C. moschata* is higher than that reported by Karanja *et al.* (2013). Mg concentrations in the pericarp were 0.20 (CA4) to 1.63 (CA1) g kg<sup>-1</sup> and for the mesocarp 0.01 (CA5) to 1.70 (CA4) g kg<sup>-1</sup> on a dry weight basis. No Mg was detected in the pericarp of CA3, CA5 and CA6 (Table 3). Jacobo-Valenzuela *et al.* (2011) studied *C. moschata* cv. "Cehualca" and found concentrations of Mg between 2.51 to 4.92 g kg<sup>-1</sup> in the shell and 1.21

**Cuadro 1. Variables morfológicas evaluadas en seis variantes de calabaza.**  
**Table 1. Morphological variables evaluated in six squash variants.**

| Variables morfológicas          | Variantes |        |        |        |        |         | DMS   |
|---------------------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|---------|-------|
|                                 | CA1       | CA2    | CA3    | CA4    | CA5    | CA6     |       |
| Peso de la fruta (g)            | 763c      | 664d   | 1263b  | 607e   | 286f   | 1430a   | 24.63 |
| Peso de 100 semillas (g)        | 10.96a    | 8.23b  | 7.88c  | 6.92d  | 8.19b  | 11.22a  | 0.24  |
| No. de semillas por fruta       | 413c      | 231e   | 624a   | 244e   | 285d   | 463b    | 10.72 |
| Peso medio por la semilla (g)   | 0.12a     | 0.08d  | 0.09c  | 0.07e  | 0.10b  | 0.11b   | 0.07  |
| Longitud de la semilla (mm)     | 965.6b    | 464.3e | 863.3c | 607.5d | 285.6f | 1429.8a | 22.81 |
| Ancho de la semilla (mm)        | 8.22bc    | 8.45bc | 8.58b  | 8.42bc | 8.42bc | 9.1a    | 0.22  |
| Índice de semillas              | 129.7b    | 89.2d  | 100.7c | 72.1e  | 33.9f  | 157.1a  | 2.8   |
| Grosor de la semilla (mm)       | 2.78a     | 2.42c  | 1.80d  | 1.85d  | 1.85d  | 2.52b   | 0.59  |
| Diámetro de la fruta (mm)       | 155.2b    | 141.8c | 173.5a | 128.3d | 97.8e  | 173.8a  | 3.94  |
| Diámetro polar de la fruta (mm) | 88.01c    | 88.45c | 91.58b | 80.4d  | 60.11e | 94.47a  | 2.25  |
| GBC <sup>†</sup> (mm)           | 14.97d    | 19.36b | 17.65c | 12.85f | 13.96e | 22.4a   | 0.45  |
| Grosor de la pulpa (mm)         | 20.81d    | 24.69a | 21.58c | 22.76b | 18.73e | 22.4b   | 0.58  |
| GC (mm)                         | 13.65cd   | 10.8e  | 17.18b | 13.78c | 14.26c | 18.35a  | 0.39  |
| Grosor de la cascara (mm)       | 1.14e     | 1.44d  | 1.51d  | 7.46a  | 4.99b  | 3.05c   | 0.10  |

Medias con letras distintas indican diferencia estadística (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>GBC: grosor de la base del pedúnculo. GC: grosor de la pulpa de la base del pedúnculo ♦ Means with different letters indicate statistical difference (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>GBC: thickness of the base of the stalk. GC: pulp thickness of the stalk base.

análisis de Mg en semillas se obtuvieron concentraciones de 2.96 (CA5) a 24.14 (CA1) g kg<sup>-1</sup> en peso seco (Cuadro 2). El contenido de Mg en semillas de las variantes CA1 de *C. moschata*, es mayor al reportado por Karanja *et al.* (2013). Las concentraciones de Mg en el pericarpio fueron 0.20 (CA4) a 1.63 (CA1) g kg<sup>-1</sup> y para el mesocarpio 0.01 (CA5) a 1.70 (CA4) g kg<sup>-1</sup> en peso seco. No se detectó Mg en el pericarpio de CA3, CA5 y CA6 (Cuadro 3). Jacobo-Valenzuela *et al.* (2011) estudiaron *C. moschata* cv. “Cehualca” y encontraron concentraciones de Mg de 2.51 a 4.92 g

to 1.61 g kg<sup>-1</sup> in the flesh of cultivated squashes, as well as a large variability between their physical and physicochemical characteristics.

Phosphorus concentrations in whole seeds were 1.75 (CA1) to 4.37 (CA4) g kg<sup>-1</sup> dry weight. Phosphorus concentrations in the pericarp were 0.05 (CA5) to 3.61 (CA3) g kg<sup>-1</sup> and 0.08 (CA2) to 2.52 (CA4) g kg<sup>-1</sup> for the mesocarp on a dry weight basis. Martínez-Valdivieso *et al.* (2015) reported concentrations of 3.9 to 8.3 g kg<sup>-1</sup> in mesocarp of 34 squash genotypes.

**Cuadro 2. Análisis de mineral en semillas enteras por medio de  $\mu$ -XRF en seis variantes de calabazas.**

**Table 2. Mineral analysis in whole seeds by means of  $\mu$ -XRF in six squash variants**

| Variantes | Macroelementos (g kg <sup>-1</sup> peso seco) |        |        |        | Microelementos (mg kg <sup>-1</sup> peso seco) |       |       |        |
|-----------|-----------------------------------------------|--------|--------|--------|------------------------------------------------|-------|-------|--------|
|           | Mg                                            | P      | K      | Ca     | Fe                                             | Mn    | Cu    | Zn     |
| CA1       | 24.14a <sup>†</sup>                           | 1.75c  | 443.4c | 73.5c  | 4.93d                                          | 4.38a | 1.75b | 6.99b  |
| CA2       | 7.38bc                                        | 1.84c  | 172.1f | 46.3e  | 5.72c                                          | 2.40c | 1.29d | 5.35c  |
| CA3       | 8.25b                                         | 2.36b  | 658.6b | 52.6d  | 5.66c                                          | 2.12b | 3.30a | 7.07b  |
| CA4       | 6.24c                                         | 4.37a  | 715.6a | 86.5b  | 6.55b                                          | 4.37a | 1.56c | 65.54a |
| CA5       | 2.96d                                         | 2.07b  | 339.0d | 41.0f  | 13.75a                                         | 2.07d | 0.59e | 3.10d  |
| CA6       | 3.42 d                                        | 2.49 b | 277.3e | 103.5a | 0.93e                                          | 0.93e | 0.00f | 0.00e  |
| DHS       | 17.58                                         | 3.12   | 372.83 | 49.44  | 17.86                                          | 1.54  | 3.50  | 23.17  |

<sup>†</sup>Medias con letras diferentes indican diferencia estadística (Tukey;  $p \leq 0.05$ ) ♦ Means with different letters indicate statistical difference (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).

kg<sup>-1</sup> en la cascara y en la pulpa de 1.21 a 1.61 g kg<sup>-1</sup> en calabazas cultivadas, y una gran variabilidad entre sus características físicas y fisicoquímicas.

Las concentraciones de P en semillas enteras fueron 1.75 (CA1) a 4.37 (CA4) g kg<sup>-1</sup> en peso seco. Las concentraciones de P en el pericarpio fueron 0.05 (CA5) a 3.61 (CA3) g kg<sup>-1</sup> en peso seco y para el mesocarpio 0.08 (CA2) a 2.52 (CA4) g kg<sup>-1</sup> en peso seco. Martínez-Valdivieso *et al.* (2015) reportaron concentraciones de 3.9 a 8.3 g kg<sup>-1</sup> en mesocarpio de 34 genotipos de calabaza.

El potasio fue el mineral más abundante en semillas y pulpa, de acuerdo con lo reportado para semillas de *Cucurbita* spp. (Karanja *et al.*, 2013) y la pulpa de *C. moschata* (Priori *et al.*, 2017). La concentración de K en semillas varió de 172.13 (CA2) a 715.68 (CA4) g kg<sup>-1</sup> en peso seco, y estos resultados son mayores a los reportados por Bouazzaoui y Mulengi (2018) en *C. moschata* de 3.94 g kg<sup>-1</sup>. Concentraciones de K fueron 5.9 (CA5) a 72.93 (CA6) g kg<sup>-1</sup> en peso seco en el pericarpio y el mesocarpio con valores de 11.7 (CA2) a 122.81 (CA4) g kg<sup>-1</sup> en peso seco.

Los resultados de nuestro estudio demostraron que el contenido de K es mayor a lo encontrado por Priori *et al.* (2017) de 33.9 y 94.6 mg kg<sup>-1</sup> en peso seco de pulpa de *C. moschata*. En otro estudio para *C. moschata* cv. "Cehualca" los valores del contenido de K fueron similares: 22.55 g kg<sup>-1</sup> en cáscara y

Potassium was the most abundant mineral in seeds and pulp, as reported for *Cucurbita* spp. seeds (Karanja *et al.*, 2013) and the pulp of *C. moschata* (Priori *et al.*, 2017). The concentration of K in seeds varied from 172.13 (CA2) to 715.68 (CA4) g kg<sup>-1</sup> dry weight, and these results are higher than those reported by Bouazzaoui and Mulengi (2018) in *C. moschata* of 3.94 g kg<sup>-1</sup>. Potassium concentrations were 5.9 (CA5) to 72.93 (CA6) g kg<sup>-1</sup> dry weight in the pericarp and values from 11.7 (CA2) to 122.81 (CA4) g kg<sup>-1</sup> dry weight in mesocarp.

The results of our study showed that the K content is higher than that found by Priori *et al.* (2017) of 33.9 and 94.6 mg kg<sup>-1</sup> dry weight of *C. moschata* pulp. In another study for *C. moschata* cv. "Cehualca" the K content values were similar: 22.55 g kg<sup>-1</sup> in shell and 42.19 g kg<sup>-1</sup> in pulp (Jacobo-Valenzuela *et al.*, 2011). The concentration of Ca in whole seeds varied from 41.0 (CA5) to 103.51 (CA6) g kg<sup>-1</sup>. In the pericarp, Ca concentrations were 0.39 (CA5) to 19.24 (CA3) g kg<sup>-1</sup> dry weight and 3.07 (CA4) to 10.96 (CA3) g kg<sup>-1</sup> in mesocarp dry weight. Regarding Ca concentrations, Jacobo-Valenzuela *et al.* (2011) found 4.35 to 6.86 g kg<sup>-1</sup> in the shell, lower values than in our study, and similar values from 3.11 to 9.85 g kg<sup>-1</sup> in the pulp of *C. moschata* cv. "Cehualca".

Iron was the only microelement detected in all the samples analyzed. The Fe concentrations in

**Cuadro 3. Análisis de mineral en el pericarpio (Pc) y mesocarpio (Mc) en frutos de calabaza mediante  $\mu$ -XRF.**

**Table 3. Analysis of mineral in pericarp (Pc) and mesocarp (Mc) in squash fruits by  $\mu$ -XRF.**

| Variantes/Zona | Macroelementos (g kg <sup>-1</sup> peso seco) |       |        |        | Microelementos (mg kg <sup>-1</sup> peso seco) |        |        |        |
|----------------|-----------------------------------------------|-------|--------|--------|------------------------------------------------|--------|--------|--------|
|                | Mg                                            | P     | K      | Ca     | Fe                                             | Mn     | Cu     | Zn     |
| CA1 Pc         | 1.63a <sup>†</sup>                            | 1.95b | 11.8f  | 7.03d  | 45.3g                                          | 0.0 e  | 0.0d   | 0.0j   |
| Mc             | 0.36b                                         | 1.31c | 36.3d  | 6.91d  | 249.4b                                         | 22.7c  | 22.7b  | 22.7f  |
| CA2 Pc         | 0.37b                                         | 0.07f | 12.1f  | 4.78e  | 30.9h                                          | 0.0 e  | 0.0d   | 0.0 j  |
| Mc             | 0.18c                                         | 0.08f | 11.7f  | 3.82e  | 41.3g                                          | 0.0e   | 10.31c | 5.2i   |
| CA3 Pc         | 0.00 e                                        | 3.61a | 59.8d  | 19.24a | 159.2d                                         | 26.5b  | 26.52a | 53.1b  |
| Mc             | 0.05d                                         | 0.58d | 93.2b  | 10.96b | 199.0c                                         | 13.27d | 26.51a | 26.6e  |
| CA4 Pc         | 0.20 c                                        | 1.52c | 41.0d  | 10.37b | 82.0 e                                         | 40.9a  | 0.0d   | 41.0c  |
| Mc             | 1.70a                                         | 2.52b | 122.8a | 3.07e  | 389.9a                                         | 40.9a  | 20.5b  | 163.9a |
| CA5 Pc         | 0.00e                                         | 0.05f | 5.9g   | 0.39 f | 27.4i                                          | 0.0e   | 0.0d   | 9.1h   |
| Mc             | 0.01d                                         | 0.22e | 25.0e  | 7.37 d | 27.4i                                          | 0.0e   | 0.0d   | 4.6i   |
| CA6 Pc         | 0.00e                                         | 1.58c | 72.93c | 8.35c  | 175.1c                                         | 0.0e   | 0.0d   | 29.2d  |
| Mc             | 0.29b                                         | 0.90d | 72.54c | 6.19d  | 73.0f                                          | 0.0e   | 0.0d   | 14.59g |
| DHS            | 0.16                                          | 0.36  | 13.45  | 1.97   | 37.58                                          | 4.52   | 3.24   | 12.06  |

<sup>†</sup>Medias con letras diferentes en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0.05$ ) ♦ Means with different letters indicate statistical difference (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).

42.19 g kg<sup>-1</sup> en pulpa (Jacobo-Valenzuela *et al.*, 2011). La concentración de Ca en semillas enteras varió de 41.0 (CA5) a 103.51 (CA6) g kg<sup>-1</sup>. En el pericarpio las concentraciones de Ca fueron 0.39 (CA5) a 19.24 (CA3) g kg<sup>-1</sup> en peso seco y 3.07 (CA4) a 10.96 (CA3) g kg<sup>-1</sup> en peso seco de mesocarpio. Respecto a las concentraciones de Ca, Jacobo-Valenzuela *et al.* (2011) encontraron 4.35 a 6.86 g kg<sup>-1</sup> en la cáscara, valores menores a los de nuestro estudio, y valores similares de 3.11 a 9.85 g kg<sup>-1</sup> en la pulpa de *C. moschata* cv. "Cehualca".

El Fe fue el único microelemento detectado en todas las muestras analizadas. Las concentraciones de Fe en semillas fueron 0.93 (CA6) a 13.75 (CA5) mg kg<sup>-1</sup> en peso seco. Los datos obtenidos en nuestro estudio son inferiores a los reportados por Karanja *et al.* (2013), quienes encontraron 137 y 356.5 mg kg<sup>-1</sup> de Fe en 13 diferentes accesiones de *Cucurbita* spp. Las concentraciones de Fe en peso seco fueron 27.42 (CA5) a 175.10 (CA6) mg kg<sup>-1</sup> en pericarpio y 27.42 (CA5) a 389.28 (CA4) mg kg<sup>-1</sup> en el mesocarpio. Los resultados obtenidos en las seis variantes evaluadas son mayores a lo reportado para pulpa de *C. moschata* de 1.8 a 5.9 mg kg<sup>-1</sup> (Priori *et al.*, 2017) y 7.76 a 29.69 mg kg<sup>-1</sup> (Jacobo-Valenzuela *et al.*, 2011).

Para Mn, Cu y Zn en semillas enteras se obtuvieron concentraciones de 0.93 (CA6) a 4.38 (CA1) mg kg<sup>-1</sup>, de 0.59 (CA5) a 3.3 (CA3) mg kg<sup>-1</sup>, y de 3.1 (CA5) a 65.54 (CA4) mg kg<sup>-1</sup> en peso seco, respectivamente, y en la variante CA6 no se detectó Cu ni Zn (Cuadro 3). Karanja *et al.* (2013) reportan la presencia de los tres minerales en todas las muestras de semillas de *Cucurbita* spp. analizadas y en concentración más altas para Mn. Para frutos, solo en la variante CA3 se detectó Mn, Cu y Zn, tanto en el pericarpio como mesocarpio. El Zn se detectó en el mesocarpio de las seis variantes y en el pericarpio en cuatro variantes de *C. moschata*; el Cu fue el elemento menor detectado entre las variantes. Las concentraciones más altas de Mn se detectaron en la variante CA4 (40.98 mg kg<sup>-1</sup> en peso seco), de Cu en la variante CA3 (26.5 mg kg<sup>-1</sup> en peso seco) y de Zn en el mesocarpio de la variante CA4 (163.9 mg kg<sup>-1</sup> en peso seco) (Cuadro 3). La ausencia de Cu se observó en el mesocarpio de una accesión de *C. pepo* por Martínez-Valdivieso *et al.* (2015). Las concentraciones reportadas para fruto de *C. moschata* (Priori *et al.*, 2017) son menores a las de nuestra investigación, pero en ambos casos hubo diferencias significativas

seeds were 0.93 (CA6) to 13.75 (CA5) mg kg<sup>-1</sup> dry weight. The data obtained in our study are lower than those reported by Karanja *et al.* (2013), who found 137 and 356.5 mg kg<sup>-1</sup> Fe in 13 different accessions of *Cucurbita* spp. Iron concentrations in dry weight were 27.42 (CA5) to 175.10 (CA6) mg kg<sup>-1</sup> in pericarp and 27.42 (CA5) to 389.28 (CA4) mg kg<sup>-1</sup> in mesocarp. The results obtained in the six variants evaluated are higher than those reported for *C. moschata* pulp of 1.8 to 5.9 mg kg<sup>-1</sup> (Priori *et al.*, 2017) and 7.76 to 29.69 mg kg<sup>-1</sup> (Jacobo-Valenzuela *et al.*, 2011).

For Mn, Cu and Zn in whole seeds, concentrations of 0.93 (CA6) to 4.38 (CA1) mg kg<sup>-1</sup>, 0.59 (CA5) to 3.3 (CA3) mg kg<sup>-1</sup>, and 3.1 (CA5) to 65.54 (CA4) mg kg<sup>-1</sup> dry weight, respectively, were obtained, and in the CA6 variant no Cu or Zn was detected (Table 3). Karanja *et al.* (2013) report the presence of all three minerals in all *Cucurbita* spp. seed samples analyzed and the higher concentration is Mn. Only Mn, Cu and Zn were detected in both pericarp and mesocarp of fruits in CA3 variant. Zinc was detected in the mesocarp of all six variants and in the pericarp in four variants of *C. moschata*; Cu was the less detected element among the variants. The highest concentrations of Mn were detected in CA4 variant (40.98 mg kg<sup>-1</sup> dry weight), Cu in CA3 variant (26.5 mg kg<sup>-1</sup> dry weight) and Zn in the mesocarp of CA4 variant (163.9 mg kg<sup>-1</sup> dry weight) (Table 3). The absence of Cu was observed in the mesocarp of a *C. pepo* accession by Martínez-Valdivieso *et al.* (2015). The concentrations reported for *C. moschata* fruit (Priori *et al.*, 2017) are lower than those of our research, but in both cases there were significant differences in the content of microelements among the variants evaluated; this indicates the morphological variability that exists among *C. moschata* variants and the potential they have as sources of micronutrients (Darrudi *et al.*, 2018).

Martínez-Valdivieso *et al.* (2015) demonstrated different patterns of P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn and Na mineral accumulation between genotypes and their origin in *C. pepo*, and provided valuable material for generating lines with significant long-term impact on human health. Soil or climatic factors (Astudillo and Blair 2008, Chávez-Mendoza and Sánchez, 2017) and between genotypes (Martínez-Valdivieso *et al.*, 2015) can affect mineral concentrations.

del contenido de microelementos entre las variantes evaluadas; esto indica la variabilidad morfológica que existe entre variantes de *C. moschata* y el potencial que tienen como fuentes de micronutrientes (Darrudi *et al.*, 2018).

Martínez-Valdivieso *et al.* (2015) demostraron patrones distintos de acumulación de minerales de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn y Na entre genotipos y su lugar de origen de *C. pepo*, y proporcionan un material valioso para generar líneas con un impacto significativo a largo plazo en la salud humana. Factores edáficos o climáticos (Astudillo y Blair 2008, Chávez-Mendoza y Sánchez, 2017) y entre genotipos (Martínez-Valdivieso *et al.*, 2015) pueden afectar las concentraciones de los minerales.

En Yucatán hay características edáficas particulares, las cuales son heterogéneas por las concentraciones de minerales y pH (Borges-Gómez *et al.*, 2014). Éstas podrían afectar o favorecer la absorción de minerales por la planta que intervienen en procesos como la fotosíntesis, síntesis de proteínas, producción de fitohormonas de crecimiento, estimulación del crecimiento de las plantas, retraso de la senescencia de las hojas y promoción del crecimiento y desarrollo de los frutos y semillas (Nieder *et al.*, 2018). El cultivo de calabaza *C. moschata* en Yucatán se presenta todo el año; por lo tanto, este producto se puede adquirir con facilidad para el consumo en la población rural, quienes puede disponer así de una fuente rica en nutrientes.

## CONCLUSIONES

El análisis mineral en semillas y pulpa de las variantes de calabaza mostraron diferencias en el contenido de macro y micronutrientes. La calabaza *Cucurbita moschata* presenta composiciones minerales distintas; las variantes CA1, CA2 y CA5 carecen de Mn, Cu y Zn.

La variante CA4 sobresalió por su contenido mineral principalmente en el pericarpio, por lo tanto, puede ser una fuente importante de micronutrientes para la dieta de la población de la Península de Yucatán. La variante CA6 por su tamaño de semillas puede usarse para establecer un programa de mejora genética.

In Yucatan, there are particular soil characteristics that are heterogeneous due to the concentrations of minerals and pH (Borges-Gómez *et al.*, 2014). These could affect or favor the absorption of minerals by the plant that intervene in processes such as photosynthesis, protein synthesis, production of growth hormones, stimulation of plant growth, delaying the senescence of leaves and promoting the growth and development of fruits and seeds (Nieder *et al.*, 2018). *Cucurbita moschata* squash cultivation in Yucatan occurs year-round; therefore, this product is readily available for consumption by the rural population, who can thus provide a rich source of nutrients.

## CONCLUSIONS

Mineral analysis in seeds and pulp of the squash variants showed differences in macro and micronutrient content. *Cucurbita moschata* pumpkin has different mineral compositions; CA1, CA2 and CA5 variants lack Mn, Cu and Zn.

The CA4 variant stood out for its mineral content mainly in the pericarp; therefore, it can be an important source of micronutrients for the diet of the population of the Yucatan Peninsula. Due to its seed size, the CA6 variant can be used to establish a genetic improvement program.

—End of the English version—



## LITERATURA CITADA

- Astudillo C., y M. W. Blair. 2008. Contenido de hierro y zinc en la semilla y su respuesta al nivel de fertilización con fósforo en 40 variedades de frijol colombianas. *Agron. Colomb.* 26: 471-476.
- Borges-Gómez L., C. Moo-Kauil, J. Ruíz-Novelo, M. Osalde-Balam, C. González-Valencia, C. Yam-Chimal, y F. Can-Puc. 2014. Suelos destinados a la producción de chile habanero en Yucatán: características físicas y químicas predominantes. *Agrociencia* 48: 347-59.
- Bouazzaoui, N., and J. K. Mulengi. 2018. Fatty acids and mineral composition of melon (*Cucumis Melo*) and pumpkin

- (*Cucurbita moschata*) seeds. J. Herbs Spices Med. Plants. 24: 315-322.
- Canul-Ku, J., P. Ramírez-Vallejo, R. Castillo-González, y J. L. Chávez-Servia. 2005. Diversidad morfológica de calabaza cultivada en el centro-oriente de Yucatán, México. Rev. Fitotec. Mex. 28: 339-349.
- Chávez-Mendoza C., and E. Sánchez. 2017. Bioactive compounds from mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. Molecules 22: 1360.
- Chávez-Mendoza C., and E. Sánchez. 2017. Bioactive compounds from mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. Molecules. 22(8): 1360. doi: 10.3390/molecules22081360.
- Darrudi, R., V. Nazeri, F. Soltani, M. Shokrpour, and M. R. Ercolano. 2018. Genetic diversity of *Cucurbita pepo* L. and *Cucurbita moschata* Duchesne accessions using fruit and seed quantitative traits. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants. 9: 70-77.
- Elfiky, S. A., I. A. Elelaimy, A. M. Hassan, H. M. Ibrahim, and R. I. Elsayad, 2012. Protective effect of pumpkin seed oil against genotoxicity induced by azathioprine. J. Basic Appl. Zool. 65: 289-98.
- Esquinas-Alcazar, J. T., and P. J. Gulick. 1983. Genetic Resources of Cucurbitaceae. Rome: IBPGR Secretarial. 101 p.
- Jacobo-Valenzuela, N., J. J. Zazueta-Morales, J. A. Gallegos-Infante, F. Aguilar-Gutierrez, I. L. Camacho-Hernández, N. E. Rocha-Guzman, and R. F. Gonzalez-Laredo. 2011. Chemical and physicochemical characterization of winter squash (*Cucurbita moschata* D.). Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 39: 34-40.
- Karanja, J. K., B. J. Mugendi, F. M. Khamis, and A. N. Muchugi. 2013. Nutritional composition of the pumpkin (*Cucurbita* spp.) seed cultivated from selected Regions in Kenya. J. Hortic. Lett. 3:17-22.
- Martínez-Valdivieso, D., P. Gómez, R. Font, and M. D. Río-Celestino. 2015. Mineral composition and potential nutritional contribution of 34 genotypes from different summer squash morphotypes. Eur. Food Res. Technol. 240: 71-81.
- Moo-Huchin, V., I. Estrada-Mota, R. Estrada-León, L. F. Cuevas-Glory, and E. Sauri-Duch. 2013. Chemical composition of crude oil from the seeds of pumpkin (*Cucurbita* spp.) and mamey sapota (*Pouteria sapota* Jacq.) grown in Yucatan Mexico. CYTA J. Food. 11: 324-27.
- Nieder, R., D. H. Benbi, and F. X. Reichl. 2018. Macro- and secondary elements and their role in human health. In: Soil Components and Human Health. Springer Netherlands. pp: 257-315.
- Nwofia, G. E., N. V. Nwogu, and N. Blessing. 2012. Nutritional variation in fruits and seeds of pumpkins (*Cucurbita* spp.) accessions from Nigeria. Pak. J. Nutr. 11: 946-56.
- Paris, H. S. 2017. Genetic resources of pumpkins and squash, *Cucurbita* spp. In: Grumet, R., N. Katzir, and J. Garcia-Mas (eds). Genetics and Genomics of Cucurbitaceae. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Springer. pp:111-129.
- Priori, D., E. Valdua, J. C. B. Villela, C. C. Mistura, M. Vizzotto, R. A. Valgas, and R. L. Barbieri. 2017. Characterization of bioactive compounds, antioxidant activity and minerals in landraces of pumpkin (*Cucurbita moschata*) cultivated in Southern Brazil. Food Sci. Technol. (Campinas). 37: 33-40.

# PESO Y CARACTERES CUANTITATIVOS DE LA CALIDAD EN FRUTOS DE PLANTAS M<sub>1</sub> DE *Physalis peruviana* L. PROVENIENTES DE SEMILLAS IRRADIADAS CON <sup>60</sup>Co

## WEIGHT AND QUANTITATIVE QUALITY CHARACTERS IN FRUITS OF M<sub>1</sub> PLANTS OF *Physalis peruviana* L. FROM SEEDS IRRADIATED WITH <sup>60</sup>Co

Oscar Martin Antúnez-Ocampo<sup>1</sup>, Serafín Cruz-Izquierdo<sup>2</sup>, Manuel Sandoval-Villa<sup>2\*</sup>, Amalio Santacruz-Varela<sup>2</sup>, Leopoldo E. Mendoza-Onofre<sup>2</sup>, Aureliano Peña-Lomelí<sup>3</sup>, Eulogio De la Cruz-Torres<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INIFAP, Campo Experimental Iguala. 40000. Km 2.5 Carretera Iguala-Tuxpan, Iguala de la Independencia, Guerrero, México. (antunez.oscar@inifap.gob.mx). <sup>2</sup>Genética. Campus Montecillos. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (msandoval@colpos.mx). <sup>3</sup>Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. <sup>4</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, 52750. Ocoyoacac, México.

### RESUMEN

*Physalis peruviana* L. es originaria de los Andes y su fruto se consume fresco por su contenido de vitaminas y propiedades medicinales. El crecimiento de las plantas de esta especie es heterogéneo, pues tiene mejoramiento genético limitado porque es una especie silvestre. Los mutágenos físicos y químicos aplicados a semillas u órganos para propagación pueden generar variedades nuevas con cambios en morfología, rendimiento, adaptabilidad y resistencia. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la irradiación de la semilla en los caracteres de la calidad del fruto de las plantas M<sub>1</sub> de *Physalis peruviana* L., y se hipotetiza que al menos una dosis de la irradiación en plantas M<sub>1</sub> de uchuva modifica favorablemente los caracteres de calidad de frutos. El estudio se realizó en invernadero con cubierta de plástico UVII-720, de agosto de 2015 a febrero de 2016. Los tratamientos fueron 14 dosis de rayos gamma <sup>60</sup>Co (0 a 275 Gy) y el diseño experimental fue completamente al azar con seis repeticiones. La radiación redujo de 3 a 32% el peso del fruto con cáliz y de 3 a 29% el peso sin cáliz. La dulzura de los frutos se redujo con dosis mayores a 100 Gy, con excepción de 200 Gy; en contraste, la firmeza aumentó de 1 a 9% con las dosis de 100 y 75 Gy. El tamaño y vida de anaquel del fruto no se afectaron. La irradiación de semillas con rayos gamma <sup>60</sup>Co altera negativamente el peso y algunas variables de la calidad del fruto de las plantas mutantes de *P. peruviana*.

### ABSTRACT

*Physalis peruviana* L. is native to the Andes and its fruit is consumed fresh for its vitamin content and medicinal properties. The growth of the plants of this species is heterogeneous, as it has limited genetic improvement because it is a wild species. Physical and chemical mutagens applied to seeds or organs for propagation can generate new varieties with changes in morphology, yield, adaptability and resistance. The objective of this research was to determine the effect of seed irradiation on the fruit quality characteristics of M<sub>1</sub> plants of *Physalis peruviana* L., and the hypothesis was that at least one dose of irradiation on M<sub>1</sub> plants of uchuva (cape gooseberry) favorably modifies the fruit quality characteristics. The study was conducted in a greenhouse with UVII-720 plastic cover, from August 2015 to February 2016. The treatments were 14 doses of gamma <sup>60</sup>Co (0 to 275 Gy) and the experimental design was completely randomized with six replicates. The radiation reduced the weight of the fruit with calyx from 3 to 32% and the weight without calyx from 3 to 29%. Fruit sweetness was reduced at doses greater than 100 Gy, with the exception of 200 Gy; in contrast, firmness increased from 1 to 9% at the 100 and 75 Gy doses. Fruit size and shelf life were not affected. Seed irradiation with <sup>60</sup>Co gamma rays negatively alters the weight and some variables of the fruit quality of *P. peruviana* mutant plants.

**Key words:** *Physalis peruviana*, uchuva, quality, mutagenicity, gamma rays, variability.

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2019. Aprobado: noviembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 691-703. 2020.

**Palabras clave:** *Physalis peruviana*, uchuva, calidad, mutagénesis, rayos gamma, variabilidad.

## INTRODUCCIÓN

*Physalis peruviana* L. es originaria de los Andes donde se conoce como uchuva, uvilla, goldenberry o capegooseberry; su fruto es una baya carnosa similar a un tomate pequeño, pero de color amarillo-naranja cuando está maduro (Fischer *et al.*, 2014). En Sudamérica, el fruto de la uchuva se consume fresco o se utiliza para elaborar mermeladas, jugos, dulces, salsas y conservas, mientras que en Estados Unidos el fruto se consume deshidratado y endulzado, por su nivel de fibra dietaria ( $11 \text{ g kg}^{-1}$ ) (Pszczola, 2008). Además, el fruto es fuente de provitamina A (3.000 UI de  $\beta$ -caroteno por 100 g), vitamina C ( $0.2 \text{ mg g}^{-1}$  de fruta) y vitaminas del complejo B, como tiamina ( $0.0001 \text{ mg g}^{-1}$ ), riboflavina ( $0.0017 \text{ mg g}^{-1}$ ) y niacina ( $0.008 \text{ mg g}^{-1}$ ), proteína cruda ( $22 \text{ g kg}^{-1}$ ), Fe ( $0.011 \text{ mg g}^{-1}$  de peso fresco), P ( $0.39 \text{ mg g}^{-1}$  de peso fresco) y Ca ( $0.14 \text{ mg g}^{-1}$  de peso fresco) (Fischer y Miranda, 2012). Estas propiedades le confieren actividad antioxidante (DPPH):  $\mu\text{mol trolox } 100 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco:  $201.66 \pm 9.78$ ; contenido de fenol, mg de ácido gálico  $100 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco:  $39.8 \pm 3.18$ ; FRAP, mg de ácido ascórbico  $100 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco:  $55.75 \pm 4.24$  (Puente *et al.*, 2011); anti-inflamatoria y anticancerígena; asimismo, contiene ácidos grasos poli-insaturados y fitoesteroles (Puente *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2014).

Las plantas de uchuva ecotipo Colombia presentan gran variación fenotípica porque 46% de las flores se autopolinizan (Lagos *et al.*, 2008) y en las demás flores ocurre polinización libre (alogamia) (Santana y Angarita, 1997); además, las condiciones ambientales y manejo del cultivo afectan su crecimiento, morfología y rendimiento (Mazorra *et al.*, 2006). Tal es el caso del porte de la planta, que alcanza alturas mayores de 1.5 m y con gran número de ramificaciones, requiriendo de tutores para no afectar el tamaño, forma, sabor y madurez de los frutos. Al respecto, en Colombia y Nueva Zelanda los productores de esta especie seleccionan las mejores plantas (plantas de porte bajo, compactas, frutos de mayor tamaño, peso y dulzura) dentro de la población y las propagan vegetativamente mediante estacas para conservar sus características (López *et al.*, 2008). Por tal motivo, se requiere realizar un programa de mejoramiento genético

## INTRODUCTION

*Physalis peruviana* L. is native to the Andes, where it is known as uchuva, uvilla, goldenberry, or cape gooseberry; its fruit is a fleshy berry similar to a small tomato, but yellow-orange in color when ripe (Fischer *et al.*, 2014). In South America, the uchuva fruit is consumed fresh or for the making of jams, juices, candies, sauces and preserves, while in the United States the fruit is consumed dehydrated and sweetened, because of its dietary fiber level ( $11 \text{ g kg}^{-1}$ ) (Pszczola, 2008). In addition, the fruit is a source of provitamin A (3,000 IU of  $\beta$ -carotene per 100 g), vitamin C ( $0.2 \text{ mg g}^{-1}$  fruit) and B-complex vitamins such as thiamin ( $0.0001 \text{ mg g}^{-1}$ ), riboflavin ( $0.0017 \text{ mg g}^{-1}$ ) and niacin ( $0.008 \text{ mg g}^{-1}$ ), crude protein ( $22 \text{ g kg}^{-1}$ ), Fe ( $0.011 \text{ mg g}^{-1}$  fresh weight), P ( $0.39 \text{ mg g}^{-1}$  fresh weight) and Ca ( $0.14 \text{ mg g}^{-1}$  fresh weight) (Fischer and Miranda, 2012). These properties confer antioxidant activity (DPPH):  $\mu\text{mol trolox } 100 \text{ g}^{-1}$  fresh weight:  $201.66 \pm 9.78$ ; phenol content, mg gallic acid  $100 \text{ g}^{-1}$  fresh weight:  $39.8 \pm 3.18$ ; FRAP, mg ascorbic acid  $100 \text{ g}^{-1}$  fresh weight:  $55.75 \pm 4.24$  (Puente *et al.*, 2011); anti-inflammatory and anti-cancer; likewise, it also contains polyunsaturated fatty acids and phytosterols (Puente *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2014).

Colombia ecotype uchuva plants present great phenotypic variation because 46% of the flowers are self-pollinating (Lagos *et al.*, 2008) and free pollination occurs in the rest of the flowers (alogamy) (Santana and Angarita, 1997); in addition, environmental conditions and crop management affect its growth, morphology and yield (Mazorra *et al.*, 2006). Such is the case of the plant's growth habit, which reaches heights greater than 1.5 m and with a great number of ramifications, requiring tutoring stakes so as not to affect size, shape, flavor and ripeness of the fruits. In this regard, producers of this species in Colombia and New Zealand select the best plants (low growth habit plants, compact, larger fruits, weight and sweetness) within the population and propagate them vegetatively by means of stakes to preserve their characteristics (López *et al.*, 2008). For this reason, a genetic improvement program is required for this species because no varieties were identified with uniform and outstanding characteristics in both vegetative growth and fruit quality, since it is considered a wild species (Fischer *et al.*, 2014).

en esta especie debido a que no se han identificado variedades con características uniformes y sobresalientes tanto en crecimiento vegetativo y calidad de fruto, pues se considera una especie silvestre (Fischer *et al.*, 2014).

El mejoramiento genético por mutagénesis permite generar nuevas combinaciones genéticas a partir de genes parentales ya existentes; es decir, se recombinan o reorganizan los genes con alta frecuencia de mutación; sin embargo, estas mutaciones pueden ser positivas o negativas en los cultivos de valor económico alto (Majeed *et al.*, 2017). El mutágeno físico más utilizado en la agricultura es la radiación ionizante porque es económica, rápida y eficaz para inducir mutaciones dentro de una población o para aumentar la diversidad genética de los cultivos y obtener variedades nuevas con mayor rendimiento, adaptabilidad y resistentes a plagas y enfermedades (Ahloowalia y Maluszynski, 2001; Oladosu *et al.*, 2016). En particular, los rayos gamma  $^{60}\text{Co}$  son los más utilizados para irradiar plantas enteras, tejido vegetal, semillas y granos de polen, pero son altamente peligrosos para el material vegetal: daños al DNA, altera o interrumpe procesos fisiológicos, bioquímicos, síntesis de proteínas equilibrio hormonal, intercambio de gases y agua, y la actividad enzimática, así como malformaciones de tejidos o muerte celular (Oladosu *et al.*, 2016). La importancia de los rayos gamma  $^{60}\text{Co}$  en el mejoramiento genético es su influencia en el crecimiento y desarrollo de las plantas, al causar inestabilidad genómica de células y tejidos, pues ocasionan rompimientos y variaciones en la composición química del ADN, lo que origina cambios citológicos, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos mediante la producción de radicales libres en las células (Kim *et al.*, 2004). Los cambios dependerán de la fuerza (dosis) y la duración del estrés inducido por la radiación (Lagoda, 2011), además de las características del material vegetal como el contenido de agua, edad, tipo de tejido y número cromosómico (Lagoda, 2011). Con dosis bajas, los cambios observados en las plantas son reversibles, mientras que las dosis altas generan efectos secundarios en el fenotipo de la planta, orgánulos celulares (mitocondria y cloroplastos) y componentes bioquímicos (Ali *et al.*, 2015); además, inactivan el mecanismo de defensa de las plantas para enfrentar el daño causado por la radiación. Estas consecuencias biológicas pueden aparecer en varias etapas del desarrollo del individuo como división celular

Genetic improvement by mutagenesis makes it possible to generate new genetic combinations from existing parental genes, that is, genes with a high mutation frequency are recombined or rearranged; however, these mutations can be positive or negative in crops of high economic value (Majeed *et al.*, 2017). The most widely used physical mutagen in agriculture is ionizing radiation because it is cheap, fast and effective in inducing mutations within a population or in increasing the genetic diversity of cultures to obtain new varieties with higher yields, adaptability and resistance to pests and diseases (Ahloowalia and Maluszynski, 2001; Oladosu *et al.*, 2016). In particular,  $^{60}\text{Co}$  gamma rays are the most widely used to irradiate whole plants, plant tissue, seeds and pollen grains, but are highly dangerous to plant material: they damage DNA, alter or interrupt physiological and biochemical processes, protein synthesis, hormonal balance, gas and water exchange, and enzymatic activity, as well as tissue malformations or cell death (Oladosu *et al.*, 2016). The importance of  $^{60}\text{Co}$  gamma rays in plant breeding is their influence on plant growth and development, by causing genomic instability of cells and tissues, as they cause breaks and variations in the chemical composition of DNA, which result in cytological, biochemical, physiological and morphological changes through the production of free radicals in cells (Kim *et al.*, 2004). The changes will depend on the strength (dose) and duration of radiation-induced stress (Lagoda, 2011), as well as the characteristics of the plant material such as water content, age, tissue type and chromosome number (Lagoda, 2011). At low doses, the changes observed in plants are reversible, while high doses generate side effects on plant phenotype, cell organelles (mitochondria and chloroplasts) and biochemical components (Ali *et al.*, 2015); furthermore, they inactivate the defense mechanism of plants to cope with radiation damage. These biological consequences can appear at various stages of individual development as abnormal cell division, cell death, mutation, lack or failure of tissues and organs and reduced plant growth (Lagoda, 2011).

Research on mutation induction has focused on reducing plant growth habit, shortening flowering time, inducing changes in flower color, and increasing protein, oil, and starch content of cereal and vegetable fruits (e.g., wheat, corn, rice, soybeans, tomatoes);

anormal, muerte celular, mutación, falta o fallas de tejidos y órganos y reducción del crecimiento de la planta (Lagoda, 2011).

Las investigaciones en inducción de mutaciones se han enfocado en reducir el porte de la planta, acortar el tiempo a floración, inducir cambios en el color de la flor y aumentar contenido de proteína, aceite y almidón de fruto de cereales y hortalizas (*i.e.*, trigo, maíz, arroz, soya, jitomate); además, para alterar la autocompatibilidad de especies (Ahloowalia y Maluszynski, 2001). Aunque la radiación induce distintos cambios morfológicos y fisiológicos positivos en los cultivos, su aplicación en la agricultura es limitada por la escasa información en la selección de las dosis óptimas de irradiación y el tipo de agente mutagénico, ya que los efectos difieren entre cultivos y entre dosis (Ali *et al.*, 2015). Además, hay poco interés por los fitomejoradores para realizar investigaciones sobre la radiosensibilidad de las especies debido al tiempo requerido para estabilizar una mutación de interés; otro aspecto importante es la especulación en la salud humana (enfermedades cancerígenas) por el uso de las fuentes de radiación en los centros nucleares.

El objetivo de este estudio fue evaluar el peso y los caracteres de calidad del fruto (tamaño, dulzura y vida de anaquel) de plantas  $M_1$  de *P. peruviana* provenientes de semillas irradiadas con rayos gamma  $^{60}\text{Co}$ . La hipótesis fue que al menos una de las dosis de irradiación aplicadas en las semillas de uchuva, origina plantas  $M_1$  con frutos sobresalientes en peso y calidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento utilizó semillas de uchuva del ecotipo Colombia con dos años de edad, las cuales se irradiaron en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), en el Estado de México, en un irradiador LGI-01 Transelektro. Los tratamientos de irradiación fueron 0, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 y 275 Gy de rayos gamma  $^{60}\text{Co}$  en 5 g de semilla (aproximadamente, 2550 semillas) para cada tratamiento. Las semillas se sembraron en agosto de 2015, en charolas de poliestireno con turba como sustrato y se regaron con agua de llave, con pH 7.6 y conductividad de 0.5 dS  $\text{m}^{-1}$ . Para más información de las semillas irradiadas, los resultados están publicados en el artículo: Variabilidad inducida en caracteres fisiológicos de *Physalis peruviana* L. mediante rayos gamma  $^{60}\text{Co}$  aplicados a la semilla. Revista Fitotecnia Mexicana 40: 211-218.

A los 60 d después de la siembra, se seleccionaron seis plántulas  $M_1$  (las más vigorosas) por cada dosis y se establecieron en un

in addition, to alter species self-compatibility (Ahloowalia and Maluszynski, 2001). Although radiation induces various positive morphological and physiological changes in cultures, its application in agriculture is limited by the narrowed information on the selection of optimal irradiation doses and the type of mutagenic agent, as the effects differ between cultures and between doses (Ali *et al.*, 2015). Besides, there is little interest by plant breeders to conduct research on the radiosensitivity of species due to the time required to stabilize a mutation of interest. Another important aspect is speculation on human health (cancer diseases) from the use of radiation sources in nuclear centers.

The objective of this study was to evaluate the weight and fruit quality characteristics (size, sweetness and shelf life) of  $M_1$  plants of *P. peruviana* from seeds irradiated with  $^{60}\text{Co}$  gamma rays. The hypothesis was that at least one of the irradiation doses applied to the uchuva seeds, results in  $M_1$  plants with outstanding fruit weight and quality.

## MATERIALS AND METHODS

The experiment used two-year-old uchuva seeds of the Colombia ecotype, which were irradiated at the Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), in the State of Mexico, on an LGI-01 Transelektro irradiator. The irradiation treatments were 0, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 and 275 Gy of  $^{60}\text{Co}$  gamma rays on 5 g of seed (approximately 2550 seeds) for each treatment. The seeds were sown in August 2015, in polystyrene trays with peat as substrate and watered with tap water, with pH 7.6 and a conductivity of 0.5 dS  $\text{m}^{-1}$ . For more information on the irradiated seeds, the results are published in the article: Induced variability in physiological characteristics of *Physalis peruviana* L. by means of  $^{60}\text{Co}$  gamma rays applied to the seed. Fitotecnia Mexicana Magazine 40: 211-218.

At 60 d after planting, six  $M_1$  seedlings (the most vigorous) were selected for each dose and established in a tunnel-type greenhouse, with UVII-720 polyethylene cover and galvanized steel structure with lateral ventilation, located at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, State of Mexico. The experimental design was completely randomized with 14 radiation treatments (0 to 275 Gy), with six replicates, and the experimental unit was an  $M_1$  plant grown in a black polyethylene bag with 9 L capacity, with tezontle (volcanic rock) as substrate. The characteristics of the tezontle were 1 to 10 mm granulometry, average bulk density 0.82 g  $\text{cm}^{-3}$ , 50% total porosity, 45% aeration porosity, 5.42% readily available water, no cation exchange capacity, and near-zero electrical

invernadero tipo túnel, con cubierta de polietileno UVII-720 y estructura de acero galvanizado, con ventilación lateral, ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. El diseño experimental fue completamente al azar con 14 tratamientos de radiación (0 a 275 Gy), con seis repeticiones, y la unidad experimental fue una planta  $M_1$  cultivada en una bolsa negra de polietileno con capacidad de 9 L, con tezontle como sustrato. Las características del tezontle fueron granulometría de 1 a 10 mm, densidad aparente promedio de  $0.82 \text{ g cm}^{-3}$ , 50% de porosidad total, 45% de porosidad de aireación, 5.42% de agua fácilmente disponible, sin capacidad de intercambio de cationes y conductividad eléctrica cercana a cero (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2011). Las plántulas se mantuvieron en posición vertical mediante tutoreo, para lo cual se usó rafia colocada a lo largo de las hileras y sujeta a postes de madera en los extremos de las mismas. La solución nutritiva fue solución universal propuesta por Steiner (1984), al 50% de su fuerza iónica original con un pH ajustado a 6.0 (Gastelum *et al.*, 2013). Las condiciones ambientales que prevalecieron desde octubre de 2015 a febrero de 2016 (mes en que concluyó el experimento) fueron: intensidad luminosa (promedio),  $652.21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; temperatura máxima  $37^\circ\text{C}$  y mínima  $4^\circ\text{C}$ .

En cinco frutos cosechados (170 d del trasplante) y obtenidos al azar por planta (5 frutos  $\times$  5 repeticiones = 30 frutos) se determinó: el peso con y sin cáliz (g), en una báscula digital, el diámetro (mm) ecuatorial y polar (de la base del pedúnculo al ápice), con un vernier digital, la concentración de sólidos solubles totales ( $^\circ\text{Brix}$ ) con un refractómetro digital en una gota de jugo, la firmeza ( $\text{kg} \times \text{fuerza}$ ) con un penetrómetro en la parte central del fruto y la vida de anaquel (días transcurridos hasta la pérdida de turgencia del epicarpio del fruto). Por cada variable se obtuvo un promedio de los cinco frutos muestreados.

El análisis de varianza y la comparación de medias de los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) se realizaron con el programa estadístico SAS (SAS, 2002) versión 9.1. Además, se registró el valor mínimo (VMín) y máximo (VMáx) de cada variable, con base en los datos de los 30 frutos evaluados de cada dosis de radiación, para identificar y seleccionar individuos idóneos que se avanzarán y evaluarán en la generación  $M_2$ . Los resultados obtenidos en esta generación ( $M_1$ ) pueden no expresarse en la siguiente generación  $M_2$  (estabilización de las mutaciones obtenidas).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Peso del fruto con y sin cáliz

La radiación gamma tuvo un efecto significativo en el peso del fruto con y sin cáliz de las plantas  $M_1$  de *P. peruviana* L. ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 1). Sin embargo, el efecto de las dosis de irradiación no siguió

conductivity (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2011). The seedlings were kept in an upright position by means of tutoring, using raffia placed along the rows and attached to wooden posts at their ends. The nutrient solution was a universal solution proposed by Steiner (1984), at 50% of its original ionic strength with a pH adjusted to 6.0 (Gastelum *et al.*, 2013). The environmental conditions that prevailed from October 2015 to February 2016 (month in which the experiment was concluded) were light intensity (average),  $652.21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; maximum temperature  $37^\circ\text{C}$  and minimum  $4^\circ\text{C}$ .

In five fruits harvested 170 d since transplant and randomly obtained per plant (5 fruits  $\times$  5 replications = 30 fruits) the following variables were determined: the weight with and without calyx (g) on a digital scale, the equatorial and polar diameter (mm) (from the base of the stalk to the apex) with a digital vernier, the total soluble solids concentration ( $^\circ\text{Brix}$ ) with a digital refractometer in a drop of juice, the firmness ( $\text{kg} \times \text{strength}$ ) and the shelf life (days until the loss of turgidity of the fruit epicarp) with a penetrometer in the central part of the fruit. For each variable an average of the five fruits sampled was obtained.

The analysis of variance and the comparison of treatment means (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) were carried out with the SAS statistical program (SAS, 2002) version 9.1. In addition, the minimum (VMín.) and maximum (VMáx.) values of each variable were recorded, based on the data of the 30 fruits evaluated for each radiation dose, in order to identify and select suitable individuals to be advanced and evaluated in the  $M_2$  generation. The results obtained in this generation ( $M_1$ ) may not be expressed in the next generation  $M_2$  (stabilization of the mutations obtained).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Weight of fruit with and without calyx

Gamma radiation had a significant effect on the weight of the fruit with and without calyx of  $M_1$  plants of *P. peruviana* L. ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 1). However, the effect of the irradiation doses did not follow a linear trend in the weight of the fruit with and without calyx, thus plants from seeds irradiated with 5, 20, 50, 150, 225, 250 and 275 Gy produced less heavy fruit than the other radiation doses (10, 75, 100, 125, 175 and 200 Gy) and the control (Figure 1).

The results of this research are a contribution to the knowledge of radiation and its effect on plants, because they cannot be compared with those obtained in other researches as they differ in the culture and mutagen used. Thus, Alvarez *et al.* (2013) observed

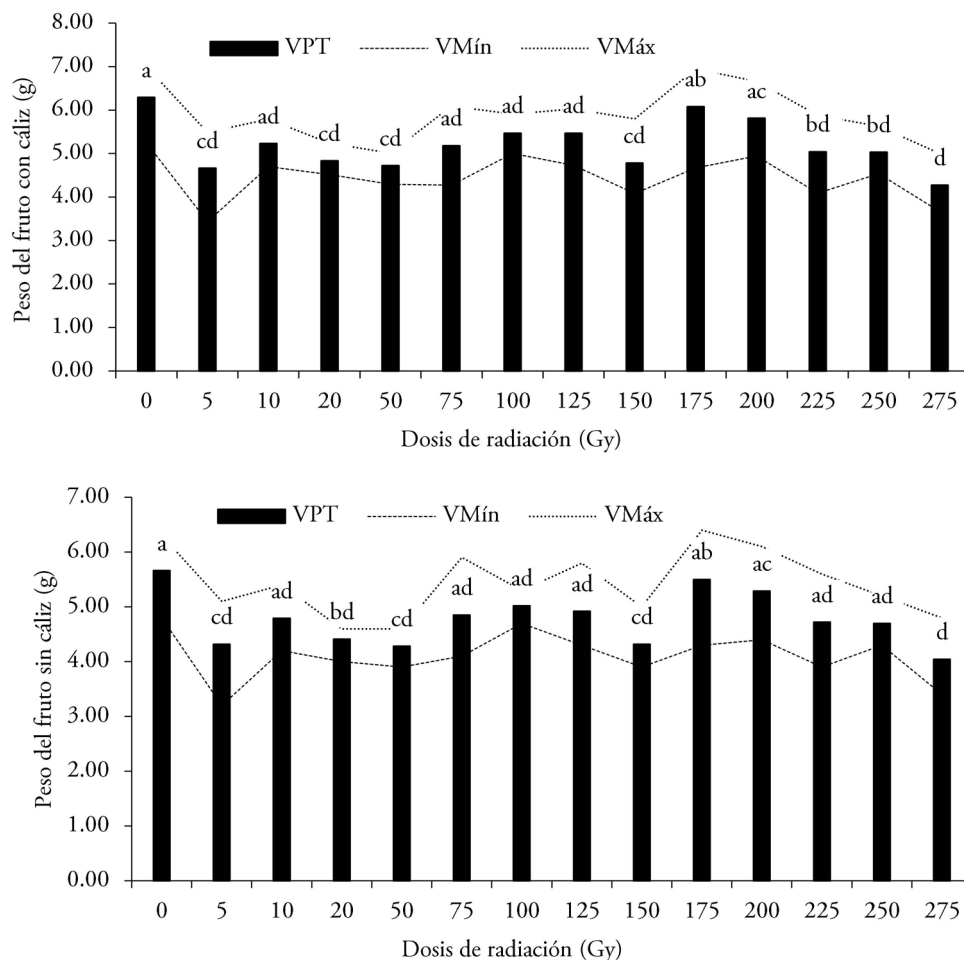


Figura 1. Peso del fruto con (pc) y sin cáliz (ps) de plantas  $M_1$  de *Physalis peruviana* L. provenientes de semillas irradiadas con 14 dosis de rayos gamma  $^{60}\text{Co}$ . VPT = valor promedio Tukey de seis repeticiones. VMín = valor mínimo de 30 de frutos por dosis y VMáx = valor máximo de 30 frutos por dosis. Valores VPT con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DMS (pc) = 1.21, C. V. pc (%) = 11.62; DMS (ps) = 1.14, C. V. ps (%) = 11.85.

Figure 1. Weight of fruit with (pc) and without calyx (ps) from  $M_1$  plants of *Physalis peruviana* L. from seeds irradiated with 14 gamma doses  $^{60}\text{Co}$ . VPT = Tukey average value of six repetitions. VMín = minimum value of 30 fruits per dose and VMáx = maximum value of 30 fruits per dose. VPT values with different letters indicate statistical difference Tukey,  $p \leq 0.05$ . DMS (pc) = 1.21, C. V. pc (%) = 11.62; DMS (ps) = 1.14, C. V. ps (%) = 11.85.

una tendencia lineal en el peso del fruto con y sin cáliz, por lo cual las plantas provenientes de semillas irradiadas con 5, 20, 50, 150, 225, 250 y 275 Gy produjeron frutos menos pesados que las otras dosis de radiación (10, 75, 100, 125, 175 y 200 Gy) y el testigo (Figura 1).

Los resultados de esta investigación son un aporte al conocimiento de la radiación y su efecto en las plantas, porque no se pueden comparar con los obtenidos en otras investigaciones pues difieren en el cultivo y mutágeno utilizado. Así, Álvarez *et al.* (2013) observaron que la radiación estimuló el peso del fruto (33.3 a 35.7 g) en las plantas  $M_1$  de pimiento

that radiation stimulated the weight of the fruit (33.3 to 35.7 g) in  $M_1$  pepper plants (*Capsicum annuum* L.) from seeds irradiated with 5 to 30 Gy X-rays. The dose of 5 Gy was higher by 16 and 107% in both characters, with respect to the control (1.53 kg and 30.8 g, respectively). Similarly, irradiation with physical mutagens (gamma and X-rays) to seeds of different vegetables generates an increase of more than 20% in yield and its components (Ramírez *et al.*, 2000).

The stimulating effect of gamma rays on culture yield components is directly related to the increase in the intensity of plant photosynthesis and

(*Capsicum annuum* L.) provenientes de semillas irradiadas con 5 a 30 Gy de rayos X. La dosis de 5 Gy fue superior en 16 y 107% en ambos caracteres, respecto al testigo (1.53 kg y 30.8 g, respectivamente). De manera similar, la irradiación con mutágenos físicos (rayos gamma y X) a semillas de distintas hortalizas genera un incremento mayor a 20% en el rendimiento y sus componentes (Ramírez *et al.*, 2000).

El efecto estimulante de los rayos gamma en los componentes del rendimiento de los cultivos tiene relación directa con el aumento de la intensidad de la fotosíntesis y transpiración de las plantas (Wilczek y Fordonski, 2007), pero las consecuencias son disminución del área foliar y el rendimiento (más del 50%) de las plantas (Jan *et al.*, 2012). Según Bondada y Oosterhuis (2003), al disminuir el área foliar también se altera el fraccionamiento de carbono y reduce la biomasa de toda la planta, debido al daño causado en las células responsables del transporte de los carbohidratos en el floema, que son más sensibles que las otras células de la planta (Thiede *et al.*, 1995). Además, se puede deber a la desorientación y daños a los tilacoides o alteración en la acumulación de almidón por efecto de las dosis altas de radiación; en contraste, las dosis bajas no causan estos cambios en los cloroplastos de las células de las plantas (Wi *et al.*, 2007).

### Diámetro ecuatorial y polar del fruto

El análisis de varianza no detectó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el diámetro ecuatorial y polar del fruto de plantas M<sub>1</sub> de *P. peruviana* L. no irradiadas e irradiadas con rayos gamma <sup>60</sup>Co (Figura 2). A pesar de que no hubo diferencias entre las dosis, los frutos tienen el tamaño comercial (12.5 a 25.0 mm) (Fischer y Miranda, 2012). Una planta proveniente de las semillas irradiadas con 50 Gy, produjo frutos con mayor diámetro polar y se podría seleccionar para evaluaciones futuras, así como su heredabilidad (Figura 2).

Los resultados obtenidos en estas características pueden deberse a que las dosis de radiación solo provocan un estrés (oxidativo) durante el crecimiento y desarrollo de las plantas M<sub>1</sub>, lo cual ocasiona reducción del crecimiento y cambios morfológicos cuantificables que posteriormente son reversibles (Lagoda, 2011).

Álvarez *et al.* (2013) observaron que las dosis de 5 a 30 Gy aumentaron de 12 a 58% el diámetro polar del fruto de *C. annuum* L.; la dosis de 20 Gy

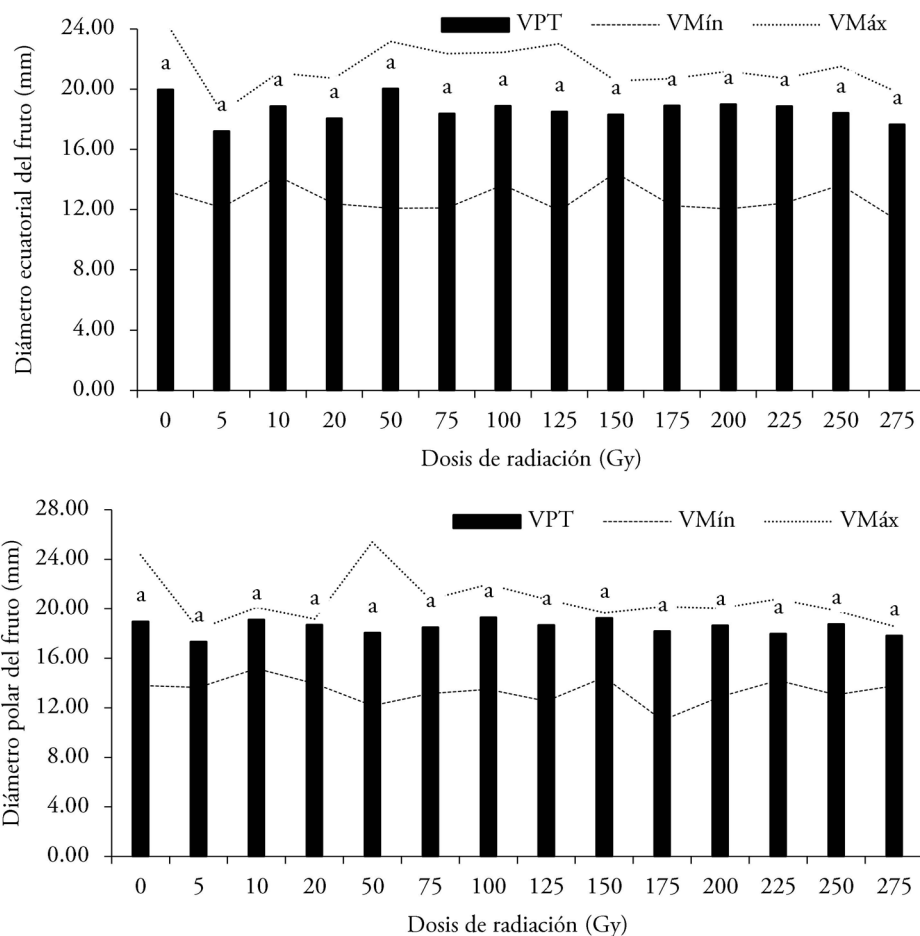
transpiración (Wilczek and Fordonski, 2007), but the consequences are a decrease in leaf area and yield (more than 50%) of the plants (Jan *et al.*, 2012). According to Bondada and Oosterhuis (2003), a decrease in leaf area also alters the fractionation of carbon and reduces the biomass of the entire plant, due to damage caused to the cells responsible for transporting carbohydrates in the phloem, which are more sensitive than the other cells of the plant (Thiede *et al.*, 1995). In addition, it may be due to disorientation and damage to the thylakoids or alteration in starch accumulation from the effect of high doses of radiation; in contrast, low doses do not cause these changes in the chloroplasts of the plant cells (Wi *et al.*, 2007).

### Equatorial and polar diameter of the fruit

In M<sub>1</sub> plants of *P. peruviana* L. the analysis of variance did not detect significant differences ( $p > 0.05$ ) in the equatorial and polar diameter of the fruit of non-irradiated and irradiated seeds with <sup>60</sup>Co gamma rays (Figure 2). Although there were no differences between the doses, the fruits have the commercial size (12.5 to 25.0 mm) (Fischer and Miranda, 2012). A plant from the seeds irradiated with 50 Gy produced fruit with a larger polar diameter and could be selected for future evaluations, as well as its heritability (Figure 2).

The results obtained in these characteristics may be due to the fact that radiation doses only cause (oxidative) stress during the growth and development of the M<sub>1</sub> plants, resulting in reduced growth and quantifiable morphological changes that are subsequently reversible (Lagoda, 2011).

Álvarez *et al.* (2013) observed that doses of 5 to 30 Gy increased the polar diameter of the *C. annuum* L. fruit from 12 to 58%; the 20 Gy dose stimulated the equatorial diameter by 47%. These positive results may be due to the fact that irradiation influences enzyme activity by increasing the conversion rate of respiratory substrates into small molecules from which new cellular constituents are formed (Chen *et al.*, 2005); furthermore, it stimulates the transport, sensitivity and composition of endogenous growth hormones. In this sense, the mentioned changes in the metabolism favor a greater energetic redistribution and it is reflected in an increment in quality of the fruits of the cultures (Bai-Lingyu *et al.*, 1996); however, each vegetable species presents different alterations due to the radiation.



**Figura 2.** Diámetro ecuatorial (de) y polar (dp) del fruto de plantas  $M_1$  de *Physalis peruviana* L. provenientes de semillas irradiadas con 14 dosis de rayos gamma  $^{60}\text{Co}$ . VPT = valor promedio Tukey de seis repeticiones. VMín = valor mínimo de 30 de frutos por dosis y VMáx = valor máximo de 30 frutos por dosis. Valores VPT con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DMS (de) = 6.74, C. V. de (%) = 15.68; DMS (dp) = 5.87, C. V. dp (%) = 18.13.

**Figure 2.** Equatorial (de) and polar (dp) diameter of the fruit of  $M_1$  plants of *Physalis peruviana* L. from seeds irradiated with 14 gamma ray doses  $^{60}\text{Co}$ . VPT = Tukey average value of six repetitions. VMín = minimum value of 30 fruits per dose and VMáx = maximum value of 30 fruits per dose. VPT values with different letters indicate statistical difference (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DMS (de) = 6.74, C.V. de (%) = 15.68; DMS (dp) = 5.87, C.V. (dp) (%) = 18.13.

estimuló en 47% el diámetro ecuatorial. Estos resultados positivos pueden deberse a que la irradiación influye en la actividad de las enzimas porque aumenta la velocidad de conversión de los sustratos respiratorios en pequeñas moléculas a partir de las cuales se forman los nuevos constituyentes celulares (Chen *et al.*, 2005); además, estimula el transporte, sensibilidad y composición de las hormonas endógenas del crecimiento. En este sentido, los cambios mencionados en el metabolismo favorecen a una mayor redistribución energética y se refleja en un incremento de la calidad de los frutos de los cultivos (Bai-Lingyu *et*

### Concentration of total soluble solids

Fruits of plants from non-irradiated seeds and irradiated with the doses of 5, 10, 75, 100 and 200 Gy were different ( $p \leq 0.05$ ), except fruits of plants from irradiated seeds with the doses of 150 and 250 Gy that had a concentration lower than 14 °Brix (Figure 3). In addition, it is important to note that outstanding  $M_1$  individuals were identified from the seed irradiated with 10 and 200 Gy (Figure 3). The fruits are in the commercialization range (13 to 15 °Brix) of the uchuva fruit (Herrera, 2000). Moreno

*et al.*, 1996); sin embargo, cada especie vegetal presenta alteraciones diferentes por la radiación.

### Concentración de sólidos solubles totales

Los frutos de las plantas provenientes de semillas no irradiadas e irradiadas con las dosis de 5, 10, 75, 100 y 200 Gy fueron diferentes ( $p \leq 0.05$ ), excepto los frutos de las plantas de semillas irradiadas con las dosis de 150 y 250 Gy que tuvieron una concentración menor a 14 °Brix (Figura 3). Además, es importante resaltar que se identificaron individuos  $M_1$  sobresalientes, de las semillas irradiadas con 10 y 200 Gy (Figura 3). Los frutos están en el rango (13 a 15 °Brix) de comercialización del fruto de uchuva (Herrera, 2000). Moreno *et al.* (2007) reportaron que la radiación afectó de manera desigual el contenido de agua, acidez, carotenos, vitamina C, proteína y grasas de los frutos; en cambio, Ramírez *et al.* (2000) indicaron estos efectos irregulares en los componentes de calidad de semillas de diversos cultivos de hortalizas y cereales.

*et al.* (2007) reported that the radiation unevenly affected the water, acidity, carotenoids, vitamin C, protein and fat content of the fruits; however, Ramírez *et al.* (2000) indicated these irregular effects on the seed quality components of various vegetable and cereal cultures.

The biological consequences of radiation are due to the amount of free radicals generated in the cells, as they cause changes in the DNA chains (Kovács and Keresztes, 2002). These radicals can damage or modify important components of plant cells and change the anatomy, morphology, biochemistry and physiology of the plants, and influence the yield and quality of the harvest, but the effect will depend on the radiation dose (Wi *et al.*, 2007). The changes originate in the cell structure and metabolism of the plant (Kovács and Keresztes, 2002) such as dilation of the thylakoid membranes, alteration in photosynthesis, modulation of the antioxidant system and accumulation of phenolic compounds in the plant organs (Wi *et al.*, 2005).

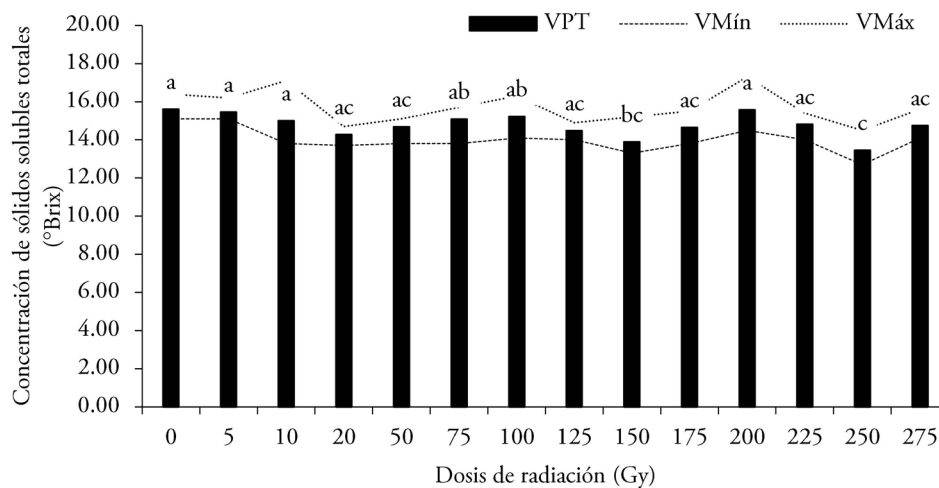


Figura 3. Concentración de sólidos solubles totales (°Brix) del fruto de plantas  $M_1$  de *Physalis peruviana* L. provenientes de semillas irradiadas con 14 dosis de rayos gamma  $^{60}\text{Co}$ . VPT = valor promedio Tukey de seis repeticiones. VMín = valor mínimo de 30 de frutos por dosis y VMáx = valor máximo de 30 frutos por dosis. Valores VPT con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DMS = 1.43, C. V. (%) = 4.83.

Figure 3. Total soluble solids concentration (°Brix) of the fruit of *Physalis peruviana* L.  $M_1$  plants from irradiated seeds with fourteen  $^{60}\text{Co}$  gamma ray doses. VPT = Tukey average value of six repetitions. VMín = minimum value of 30 fruits per dose and VMáx = maximum value of 30 fruits per dose. VPT values with different letters indicate statistical difference (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DMS = 1.43, C. V. (%) = 4.83.

Las consecuencias biológicas que provoca la radiación se deben a la cantidad de radicales libres que se generan en las células, pues ocasionan cambios en las cadenas de ADN (Kovács y Keresztes, 2002). Estos radicales pueden dañar o modificar componentes importantes de las células vegetales y cambiar la anatomía, morfología, bioquímica y fisiología de las plantas, e influyen en el rendimiento y calidad de la cosecha, pero el efecto estará en función de la dosis de radiación (Wi *et al.*, 2007). Los cambios se originan en la estructura celular y el metabolismo de la planta (Kovács y Keresztes, 2002) como la dilatación de las membranas de los tilacoides, alteración en la fotosíntesis, modulación del sistema antioxidante y acumulación de compuestos fenólicos en los órganos de la planta (Wi *et al.*, 2005).

### Firmeza y vida de anaquel del fruto

La irradiación de semillas con rayos gamma  $^{60}\text{Co}$  afectó ( $p \leq 0.05$ ) la firmeza (Figura 4), pero no la vida de anaquel de los frutos de plantas  $M_1$  de *P. peruviana* L. Las plantas provenientes de semillas irradiadas con 10, 75, 100 y 150 Gy presentaron frutos con una firmeza mayor a 1.60 kg\*fuerza; asimismo, las plantas testigo. Las otras plantas  $M_1$  presentaron frutos de menor consistencia (1.50 kg\*fuerza) (Figura 4). Además, se identificaron plantas  $M_1$  sobresalientes en esta característica con las dosis de 50, 75, 100 y 275 Gy (Figura 4).

El ablandamiento de los frutos de las plantas provenientes de semillas irradiadas con 20 y 225 Gy puede deberse a la rápida despolimerización de los polisacáridos de la pared celular y a los cambios en las sustancias pécticas, la celulosa, hemicelulosa y enzimas pécticas. Además, se suma la hidrólisis de los poligalacturónidos y celulosa en fracciones de menor peso molecular, así como la pérdida de turgencia por el rompimiento de membranas celulares que también contribuyen al ablandamiento (Prakash *et al.*, 2000; Prakash y Foley, 2004).

En diversas hortalizas (*i.e.*, tomate, chile), las semillas irradiadas originaron plantas  $M_1$  con caracteres distintos de calidad de fruto, como la textura y el aroma (Moreno *et al.*, 2007). Y los cambios ocasionados por la irradiación difieren por la intensidad de la dosis, el tipo de variedad o genotipo, nutrición y las condiciones ambientales prevalecientes durante el crecimiento de las plantas mutantes ( $M_1$ ) (Álvarez *et al.*, 2011).

### Firmness and shelf life of the fruit

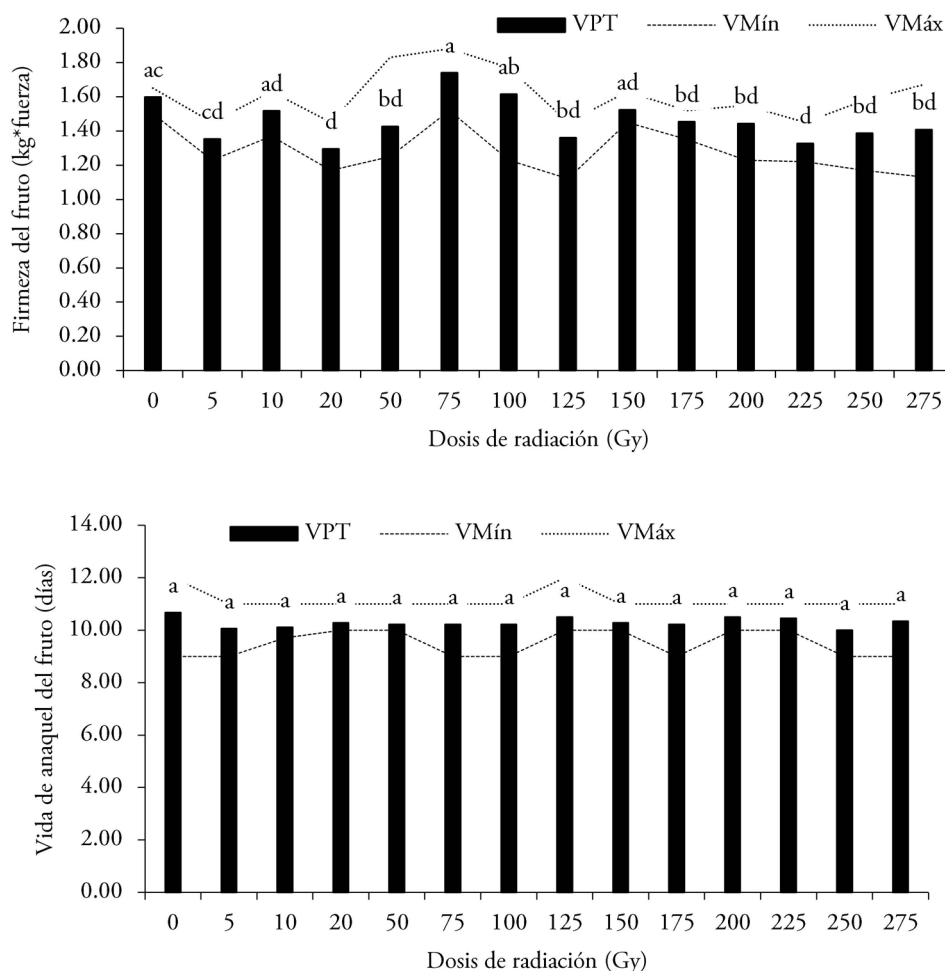
Seed irradiation with  $^{60}\text{Co}$  gamma rays affected ( $p \leq 0.05$ ) the firmness (Figure 4), but not the shelf life of fruits from  $M_1$  plants of *P. peruviana* L. Plants from seeds irradiated with 10, 75, 100 and 150 Gy showed fruits with a firmness higher than 1.60 kg\*strength and the control plants likewise. The other  $M_1$  plants presented fruits with less consistency (1.50 kg\*strength) (Figure 4). In addition,  $M_1$  plants were identified as outstanding with the doses of 50, 75, 100 and 275 Gy (Figure 4) in this characteristic.

Softening of plant fruits from 20 and 225 Gy irradiated seeds may be due to rapid depolymerization of cell wall polysaccharides and changes in pectic substances, cellulose, hemicellulose and pectic enzymes. In addition, there is the hydrolysis of polygalacturonases and cellulose into lower molecular weight fractions, as well as the loss of turgor from the breaking of cell membranes which also contributes to softening (Prakash *et al.*, 2000; Prakash and Foley, 2004).

In several vegetables (*e.g.*, tomato, chili), the irradiated seeds gave rise to  $M_1$  plants with different fruit quality characteristics, such as texture and aroma (Moreno *et al.*, 2007). And changes caused by irradiation differ by dose intensity, type of variety or genotype, nutrition, and environmental conditions prevailing during the growth of the mutant plants ( $M_1$ ) (Álvarez *et al.*, 2011).

The shelf life of *P. peruviana* fruit did not show significant differences (Figure 4) due to gamma rays, since  $M_1$  plants from irradiated and non-irradiated seeds produced fruit with post-harvest life between 10 and 11 d ( $p > 0.05$ ) long. The fruit is climacteric because as time goes by, the production of ethylene increases and its conservation is reduced (Trinchero *et al.*, 1999). As mentioned before, the effect of radiation will depend on the species; thus, Kosma *et al.* (2010) reported that the fruits of *Solanum lycopersicum* from mutant plants had a shorter shelf life than the fruits of control plants.

Ahuja *et al.* (2014) noted that there is no proper understanding of the effect of radiation on fruit quality parameters because there is little research. Furthermore, the available data are scattered and inconclusive, since at the plant level the effects are visible in morphological, biochemical, physiological, and biophysical changes, in which the magnitude of the change will depend largely on the radiation dose,



**Figura 4.** Firmeza (fz) y vida de anaquel (va) de frutos de plantas M<sub>1</sub> de *Physalis peruviana* L. provenientes de semillas irradiadas con 14 dosis de rayos gamma <sup>60</sup>Co. VPT = valor promedio Tukey de seis repeticiones. VMín = valor mínimo de 30 de frutos por dosis y VMáx = valor máximo de 30 frutos por dosis. Valores VPT con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, p ≤ 0.05). DMS (fz) = 0.26, C. V. fz (%) = 8.90; DMS (va) = 0.96, C. V. va (%) = 4.63.

**Figure 4.** Firmness (fz) and shelf life (va) of fruits from M<sub>1</sub> plants of *Physalis peruviana* L. from seeds irradiated with 14 gamma doses <sup>60</sup>Co. VPT = average value Tukey of six repetitions. VMín = minimum value of 30 fruits per dose and VMáx = maximum value of 30 fruits per dose. VPT values with different letters indicate statistical difference (Tukey, p ≤ 0.05). DMS (fz) = 0.26, C. V. fz (%) = 8.90; DMS (va) = 0.96, C. V. va (%) = 4.63.

La vida de anaquel del fruto de *P. peruviana* no presentó diferencias significativas (Figura 4) por los rayos gamma, pues las plantas M<sub>1</sub> provenientes de semillas irradiadas y no irradiadas produjeron frutos con vida poscosecha entre 10 y 11 d (p > 0.05). El fruto es climatérico pues conforme avanza el tiempo aumenta la producción de etileno y se reduce su conservación (Trinchero *et al.*, 1999). Como ya se mencionó, el efecto de la radiación dependerá de la especie; así, Kosma *et al.* (2010) reportaron que los frutos de *Solanum lycopersicum* provenientes de plantas mutantes tuvieron menor vida anaquel que los frutos de plantas testigo.

the soil, crop management, and other environmental variables such as temperature and humidity.

## CONCLUSIONS

Irradiation at low doses (10, 75 and 100 Gy) with <sup>60</sup>Co gamma rays applied to seeds of *P. peruviana* increases the firmness of the fruits of M<sub>1</sub> plants. High doses (250 and 275 Gy), decrease the sweetness and weight of fruits. Size (equatorial and polar diameter) and shelf life of fruits were not modified by seed irradiation. Greater firmness of fruits implies less

Ahuja *et al.* (2014) señalaron que no hay una comprensión apropiada del efecto de la radiación en los parámetros de la calidad de los frutos porque hay pocas investigaciones. Además, los datos disponibles son dispersos y no concluyentes, pues a nivel de planta los efectos son visibles en cambios morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y biofísicos, en los cuales la magnitud del cambio afectado dependerá en gran medida de la dosis de radiación, el suelo, el manejo del cultivo y otras variables ambientales como la temperatura y humedad.

## CONCLUSIONES

La irradiación a dosis bajas (10, 75 y 100 Gy) con rayos gamma  $^{60}\text{Co}$  a las semillas de *P. peruviana* incrementa la firmeza de los frutos de plantas  $M_1$ . A dosis altas (250 y 275 Gy) disminuye la dulzura y el peso de los frutos. El tamaño (diámetro ecuatorial y polar) y la vida de anaquel de los frutos no se modificaron por la irradiación de las semillas. Mayor firmeza de los frutos implica menor daño de los mismos durante su manipulación para empaque y transporte.

## LITERATURA CITADA

- Ahloowalia, B. S., and M. Maluszynski. 2001. Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167-173.
- Ahuja, S., M. Kumar, P. Kumar, V. K. Gupta, R. K. Singhal, A. Yadav, and B. Singh. 2014. Metabolic and biochemical changes caused by gamma irradiation in plants. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 300: 199-212.
- Ali, H., Ghori Z., S. Sheikh, and A. Gul. 2015. Effects of gamma radiation on crop production. *In: Hakeem, K. R. (ed). Crop Production and Global Environmental Issues.* Springer International Publishing, Springer, Cham. Suiza. pp: 27-78.
- Álvarez, F. A., L. Chávez S., R. Ramírez F., W. Estrada P., Y. Estrada L., y A. Maldonado R. 2013. Efecto del tratamiento de semillas con bajas dosis de rayos X en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Nucleus* 53: 14-18.
- Álvarez, A., R. Ramírez, L. Chávez, Y. Camejo, L. Licea, E. Porras, y B. García. 2011. Efectos del tratamiento de semillas con láser de baja potencia sobre el crecimiento y rendimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *ITEA* 107: 290-299.
- Bai-Lingyu, Ma-Yuzhu, Hua-Luo, and Wei-Dongpu. 1996. The effect of low dose of Co-gamma rays irradiation on some enzyme activities and isoenzyme zymogram in pak-choi seedlings. *Acta Agric. Nucleatae Sinica* 10: 21-24.
- Bondada, B. R., and D. Oosterhuis M. 2003. Morphometric analysis of chloroplast of cotton leaf and fruiting organs. *Biol. Plant.* 47: 281-284.
- Chen, Y. P., Y. J. Liu, X. L. Wang, Z. Y. Ren, and M. Yue. 2005. Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and damage in them during its manipulation for packing and transport.
- End of the English version—
- \*—
- biophoton emission of *Isatis indigotica*. *J. Integr. Plant Biol.* 47: 849-855.
- Fischer, G., P. J. Almanza-Merchán, y D. Miranda. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Rev. Bras. Frutic.* 36: 001-015.
- Fischer, G., y D. Miranda. 2012. Uchuva (*Physalis peruviana* L.). *In: Fischer, R. G. (ed). Manual para el Cultivo de Frutales en el Trópico.* Produmedios. Bogotá, Colombia. pp: 851-873.
- Gastelum-Osorio D. A., M. Sandoval-Villa, C. Trejo-Libia, y R. Castro-Brindis. 2013. Fuerza iónica de la solución nutritiva y densidad de plantación sobre la producción y calidad de frutos de *Physalis peruviana* L. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 19: 197-210.
- Gutiérrez-Castorena, M. C., J. Hernández-Escobar, C. A. Ortiz-Solorio, R. Anicua-Sánchez, y M. E. Hernández-Lara. 2011. Relación porosidad-retención de humedad en mezclas de sustratos y su efecto sobre variables respuesta en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 17: 183-196.
- Herrera A. 2000. Manejo poscosecha. *In: Flórez, V. J. R., G. Fischer, y A. D. Sora R. (eds). Producción, Poscosecha y Exportación de la Uchuva (Physalis peruviana L.).* Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp: 109-127.
- Jan, S., T. Parween, T. O. Siddiqi, and Mahmooduzzafara. 2012. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environ. Rev.* 20: 17-39.
- Kim, J. H., M. H. Baek, B. Y. Chung, S. G. Wi, and J. S. Kim. 2004. Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *J. Plant Biol.* 47: 314-321.
- Kosma, D. K., E. P. Parsons, T. Isaacson, S. Lu, J. K. C. Rose, and A. J. Matthew. 2010. Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. *Physiol. Plant.* 139: 107-117.
- Kovács, E., and A. Keresztes. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron* 33: 199-210.
- Lagoda P. J. L. 2011. Effects of radiation on living cells and plants. *In: Shu Q. Y., B. P. Forster, and H. Nakagawa (eds). Plant Mutation and Biotechnology.* Plant Breeding and Genetics Section. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. pp: 123-134.
- Lagos, B. T. C., C. F. A. Vallejo, E. H. Criollo, y F. J. E. Muñoz. 2008. Biología reproductiva de la uchuva. *Acta Agron.* 57: 81-87.
- López, A. F. L., T. N. Guío R., G. Fischer, y L. D. Diego Miranda. 2008. Propagación de uchuva (*Physalis peruviana* L.)

- mediante diferentes tipos de esquejes y sustratos. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 61: 4347-4357.
- Majeed, A., Z. Muhammad, R. Ullah, Z. Ullah, R. Ullah, Z. Chaudhry, and S. Siyar. 2017. Effect of gamma irradiation on growth and post-harvest storage of vegetables. Biol. Res. 2: 30-35.
- Mazorra, M. F., A. P. Quintana, D. Miranda, G. Fischer, y M. Chaparro V. 2006. Aspectos anatómicos de la formación y crecimiento del fruto de uchuva *Physalis peruviana* (Solana-ceae). Acta Biol. Colomb. 11: 69-81.
- Moreno M., A., M. E. Castell-Perez, P. C. Gomes, R. Da Silva, and G. Moreira. 2007. Quality of electron beam irradiation of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) at medium dose levels (1.0 - 3.2 kGy). Food Sci. Technol. 40: 1123-1132.
- Oladosu, Y., M. Y. Rafii, N. Abdullah, G. Hussin, A. Ramli, H. A. Rahim, G. Miah, and M. Usman. 2016. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a re-view. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 30: 1-16.
- Prakash A., and D. Foley. 2004. Improving safety and extending shelf life of fresh- cut fruits and vegetables using irradiation. In: Morehouse, V. K. M. (ed). Irradiation of Food Packa-ging. Komolprasert American Chemical Society. Washing-ton, DC. USA. pp: 90-106.
- Prakash, A., A. R. Guner, F. Caporaso, and D. M. Foley. 2000. Effects of low-dose gamma irradiation on the shelf life and quality characteristics of cut *Romaine lettuce* packaged under modified atmosphere. J. Food Sci. 65: 549-553.
- Pszczola, D. E. 2008. The inside on inclusions. Food Technol. 62: 50-62.
- Puente, L. A., S. A. Pinto-Muñoz, E. S. Castro, and M. Cortés. 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Res. Int. 44: 1733-1740.
- Ramírez, R., L. M. González, L. Licea, B. García, E. Porras, y A. Pérez. 2000. Incidencia de bajas dosis de rayos X sobre la productividad de cuatro variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Alimentaria 314: 56-64.
- Santana, G., y A. Angarita. 1997. Regeneración adventicia de somoclonales de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Agron. Co-lomb. 14: 59-65.
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT User's Guide. Version 9.1. Volu-mes 1 - 7. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. In: Procee-dings of the 6th International Congress on Soilless Culture. ISOSC. Wageningen, The Netherlands. pp: 633-649.
- Thiede, M. E., S. O Link, R. J. Fellows, and P. A. Beedlow. 1995. Effects of gamma radiation on stem diameter growth, carbon gain and biomass partitioning in *Helianthus annuus*. Envi-ron. Exp. Bot. 35: 33-41.
- Trinchero, G., G. O. Sozzi, A. M. Cerri, F. Vilella, and A. A. Franschina. 1999. Ripening-related changes in ethylene production respiration rate and cell-wall enzyme activity in golden berry (*Physalis peruviana* L.) a solanaceous species. Postharvest Biol. Technol. 16: 139-145.
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. H. Kim, M. H. Baek, D. H Yang, J. W. Lee, and J. S. Kim. 2005. Ultrastructural changes of cell organelles in Arabidopsis stems after gamma irradiation. J. Plant Biol. 48: 195-200.
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. S. Kim, J. H. Kim, M. H. Baek, J. W. Lee, and Y. S. Kim. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. Micron 38: 553-564.
- Wilczek, M., and G. Fordonski. 2007. Influence of presowing laser stimulation of seeds on photosynthesis and transpira-tion intensity and on yielding of red clover. Acta Agroph. 9: 517-524.



# RENDIMIENTO Y CALIDAD DE ÁCIDO CARMÍNICO DE *Dactylopius coccus* Costa EN DIFERENTES ALTURAS DE LA NOPALOTECA

## YIELD AND QUALITY OF CARMINIC ACID OF *Dactylopius coccus* Costa IN DIFFERENT HEIGHT LEVELS OF THE NOPALOTECA

José Rodolfo Zacarías-Alvarado<sup>1</sup>, Clara Lourdes Tovar-Robles<sup>1</sup>, Santiago de Jesús Méndez-Gallegos<sup>1\*</sup>, Rafael Magallanes-Quintanar<sup>2</sup>, Gildardo Aquino-Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Innovación en Manejo de Recursos Naturales. Campus San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados. 78622, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México. (jmendez@colpos.mx). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ingeniería Eléctrica. Avenida Ramón López Velarde, 801, 98064, Zacatecas, Zacatecas, México.

### RESUMEN

*Dactylopius coccus* es un insecto de importancia comercial como fuente de un colorante natural denominado ácido carmínico. Para su producción comercial en cautiverio, se ha promovido la cría en cladodios suspendidos a diferentes alturas, en un sistema denominado “nopaloteca”. Sin embargo, se desconoce si su calidad y rendimiento es uniforme en los diferentes niveles. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la altura del nivel en una “nopaloteca” y el índice de cosecha en la concentración de ácido carmínico (CAC, %) y peso fresco (PF, g) de *D. coccus*. La crianza del insecto se realizó en una “nopaloteca” de madera (3x3 m), con cuatro niveles de altura (0.5, 1.0, 1.50 y 2 m). Durante el ciclo de cultivo se registró cada día la temperatura, la humedad relativa y la intensidad luminosa. Las hembras adultas se recolectaron en dos etapas del desarrollo: pre y postoviposición. La CAC más alta (19.2%) se obtuvo en 1.0 m de altura, aunque este nivel registró el PF más bajo con 3.5 g por cladodio, que expresa una correlación negativa entre la CAC y el PF. La recolección en postoviposición generó una CAC superior (18.8%), aunque el PF se redujo. Tanto la humedad relativa (HR) como la iluminación total, pero principalmente la temperatura que incidió en cada nivel, influyeron en la calidad y el rendimiento de *D. coccus*, aunque de manera diferencial sobre ambos factores, lo cual indica la presencia de límites óptimos de desarrollo. Bajo las condiciones del estudio, el sistema de cría en “nopaloteca” produjo en promedio 4.5 g de cochinilla por cladodio y una CAC de 17.5%. Los niveles evaluados causaron diferencias en rendimiento y calidad, pero sus valores más altos

### ABSTRACT

*Dactylopius coccus* is an important insect for commerce, as the source of a natural dye called carminic acid. For its commercial production in captivity, rearing has been promoted in cladodes suspended at different heights in a system called “nopaloteca”. However, it is unknown whether insect quality and yield vary at different levels. The objective of this study was to determine the influence of height level in a “nopaloteca” and the harvest index of carminic acid concentration (CAC, %) and fresh weight (FW, g) of *D. coccus*. Insect rearing was carried out in a wooden “nopaloteca” (3x3 m) with four height levels (0.5, 1.0, 1.50 and 2 m). During the culture cycle, temperature, relative humidity, and luminous intensity were measured daily. Adult females were collected in two development stages: pre- and post-oviposition. The highest CAC (19.2%) was obtained at 1.0 m high, although at this level the lowest FW was recorded, 3.5 g per cladode, which expresses a negative correlation between CAC and FW. Post-oviposition harvest generated a higher CAC (18.8%), although FW decreased. Relative humidity and total illumination, but mainly temperature at each level, affected quality and yield of *D. coccus*, though the two factors were affected differentially, indicating the presence of optimal limits for development. Under the conditions of this study, the “nopaloteca” rearing system produced an average of 4.5 g cochineal per cladode and a CAC of 17.5%. The levels evaluated caused difference in yield and quality, but the highest values were registered in the intermediate levels (1.0 and 1.5 m). The recommended harvest index to obtain more CAC was the post-oviposition phase.

**Key words:** *Dactylopius coccus*, cochineal, harvest index, rearing, prickly-pear cactus.

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 54: 705-716. 2020.

se registraron en los niveles intermedios (1.0 y 1.5 m). El índice de cosecha recomendado para obtener mayor CAC fue la etapa de postoviposición.

**Palabras clave:** *Dactylopius coccus*, cochinilla, índice de cosecha, cría, nopal.

## INTRODUCCIÓN

La cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) es un insecto originario de regiones tropicales y subtropicales de América (Müller-Maatsch y Gras, 2016), en particular de México y Perú, y es un parásito específico de especies de *Nopalea* Salm-Dyck y *Opuntia* Mill (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). Este insecto sintetiza un glucósido antraquinónico denominado ácido carmínico (AC) como defensa (Dettner, 2014). Por su estabilidad y capacidad de coloración se emplea en cosméticos, pinturas, biomedicina, alimentos y bebidas (Müller-Maatsch y Gras, 2016). El uso de AC y sus derivados está autorizado por la mayoría de los organismos reguladores que evalúan inocuidad y riesgo de los aditivos alimentarios en el mundo. La Agencia de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de EE. UU., les reconoce como Natural Red 5, y la Unión Europea les asignó el código E120 (EFSA, 2015).

Ahora, *D. coccus* está distribuida en 15 países, ya sea introducida o naturalizada (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). Aunque su sistema de cultivo varía en cada país y región (Müller-Maatsch y Gras, 2016) la crianza se puede realizar bajo dos modalidades: a cielo abierto y en condiciones semicontroladas (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). Sólo en España, Chile, Bolivia, Etiopía y Perú la cría es a cielo abierto (Anculle *et al.*, 2017), al disponer de condiciones agroecológicas para su desarrollo óptimo. En México, las precipitaciones altas, temperaturas extremas, vientos fuertes y radiación alta, así como la presencia de enemigos naturales limitan su crianza a campo abierto (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). Derivado de lo anterior, se han desarrollado e implementado alternativas para su cría masiva, las cuales incluyen desde estructuras de materiales rústicos, hasta invernaderos con cubiertas de vidrio o plástico.

Entre los sistemas de producción probados con éxito destacan las “nopalotecas”, las cuales reducen el impacto de los factores físicos y biológicos que limitan el desarrollo al insecto. Este sistema se probó en

## INTRODUCTION

Cochineal, *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae), is an insect native to the tropical and subtropical regions of America (Müller-Maatsch and Gras, 2016), particularly Mexico and Peru. It is a specific parasite of species of *Nopalea* Salm-Dyck and *Opuntia* Mill (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). This insect synthesizes an anthraquinone glycoside called carminic acid (CA) as a defense mechanism (Dettner, 2014). Because of CA stability and dyeing capacity, it is used in cosmetics, paints, biomedicine, food, and beverages (Müller-Maatsch and Gras, 2016). Use of CA and its derivatives is authorized by most regulating organisms worldwide that evaluate the safety and risk of food additives. The US Food and Drug Administration (FDA) recognizes it as Natural Red 5, and the European Union assigned it the code E120 (EFSA, 2015).

*Dactylopius coccus* is now distributed in 15 countries, introduced, or naturalized (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). Although the system varies in each country and region (Müller-Maatsch and Gras, 2016), rearing has two modalities: in the open and in semi-controlled conditions (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). Only in Spain, Chile, Bolivia, Ethiopia, and Peru rearing is done in the open (Anculle *et al.*, 2017) because they have agroecological conditions for optimal development. In Mexico, high precipitation, extreme temperatures, strong winds and high radiation, as well as the presence of natural enemies, limit rearing in the open (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). For this reason, alternatives for mass rearing have been developed and implemented. These alternatives vary from structures made of rustic materials to greenhouses with glass or plastic covering.

Among the proven successful production systems, the “nopalotecas” are outstanding. The system reduces impact of physical and biological factors that limit the insect development. It has been tested in Argentina (Alonso *et al.*, 2013) and Peru (Hernández *et al.*, 2017), and it is now protected by the Spanish Office of Patents and Trademarks (Oficina Española de Patentes y Marcas-OEPM, 2019) with the registration number 2 351 752. Despite the viability of the system, few studies have confirmed whether the CA concentration (CAC) and yield are uniform throughout the levels of the “nopaloteca”, since

Argentina (Alonso *et al.*, 2013) y en Perú (Hernández *et al.*, 2017) y está protegido desde el 2011 por la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM, 2019) con Registro 2 351 752. A pesar de la viabilidad del sistema, hay pocos resultados de investigación para confirmar si la concentración de AC (CAC) y el rendimiento, son uniformes en todos los niveles de la “nopaloteca”; ya que la distribución espacial de la temperatura, humedad relativa y la cantidad de luz, inciden de forma heterogénea de acuerdo con la altura en que se ubiquen los niveles para colocar cladodios.

Entre los factores que influyen en la CAC y el rendimiento de *D. coccus* destacan la edad y el estado nutricional del cladodio, así como la especie o cultivar del nopal hospedante (Méndez-Gallegos *et al.*, 2010), cantidad y tipo de luz (Tello y Vargas, 2015), temperatura, humedad relativa y la densidad de población del insecto en el cladodio (Rodríguez *et al.*, 2005). Aunque el AC está presente en todas las etapas de desarrollo (Briseño-Garzón y Llanderal, 2008) existen contradicciones respecto al índice de cosecha que produzca una mayor CAC. Müller-Maatsch y Gras (2016) recomendaron cosechar cuando las hembras son ovíparas (justo antes de la oviposición), mientras que Flores-Alatorre *et al.* (2014) afirmaron que se debe realizar después del periodo de oviposición.

A nivel internacional el precio de la cochinilla fluctúa constantemente porque su valor tiene relación directa con la CAC (Flores-Alatorre *et al.*, 2014), y hay productores dedicados a la comercialización de producto fresco, como pie de cría. Por lo tanto, es importante mantener y aumentar estas variables productivas para hacer más eficiente el sistema de cría. El objetivo del estudio fue determinar la influencia de la altura del nivel en la “nopaloteca” y el índice de cosecha en pre y postoviposición, sobre la calidad, en función de la CAC (%) y el peso fresco (PF, g) de *D. coccus*, que permitan optimizar su manejo en cautiverio. La hipótesis fue que alguno de los cuatro niveles evaluados o fase de desarrollo, o ambos, produce concentración de AC y peso fresco mayores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del sitio de estudio

La investigación se realizó de mayo a diciembre de 2018 en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí (22° 37' 55.66" N, 101° 42' 42.96" O, y altitud de 2078 m)

spatial distribution of temperature, relative humidity, and light are heterogeneous depending on the height at which the cladodes are placed.

Outstanding among the factors that affect CAC and *D. coccus* yield are cladode age and nutritional status, as well as the species or cultivar of the hosting pear cactus (Méndez-Gallegos *et al.*, 2010), quantity and type of light (Tello and Vargas, 2015), temperature, relative humidity and insect population density in the cladode (Rodríguez *et al.*, 2005). Although CA is present in all the insect development stages (Briseño-Garzón and Llanderal, 2008), there are some contradictions regarding the harvest index that produces more CAC. Müller-Maatsch and Gras (2016) recommend harvesting when the females are full of eggs (just before oviposition), while Flores-Alatorre *et al.* (2014) assert that harvest should take place after oviposition.

Internationally, the price of cochineal fluctuates constantly because its value has a direct relationship with CAC (Flores-Alatorre *et al.*, 2014), and there are producers that commercialize it fresh, as rearing stock. Therefore, it is important to maintain and increase these production variables to make the rearing system more efficient. The objective of the study was to determine how height of the level in the “nopaloteca” and the harvest index in pre- and post-oviposition affect quality in function of CAC (%) and fresh weight (FW, g) of *D. coccus*, with the aim of optimizing its management in captivity. The hypothesis was that one of the four levels evaluated or the development phase, or both, produce higher CA concentration and fresh weight.

## MATERIALS AND METHODS

### Location of the study site

The study was conducted from May to December 2018 in the facilities of the Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí (22° 37' 55.66" N, 101° 42' 42.96" W, altitude 2078 m) in a glass greenhouse with a north-south orientation. The greenhouse was shaded with Spanish white (calcium hydroxide and water 2:1 v:v) to reduce light intensity on the “nopaloteca” during the day and conserve heat during the night.

### Seed insects and host

In this study, 300 g of egg-filled females were used as biological material for initial propagation; these were provided

en un invernadero de cristal con orientación norte-sur, el cual se sombreó con blanco de España (hidróxido de calcio y agua 2:1 v:v) para reducir la intensidad luminosa sobre la “nopaloteca” en el día y conservar el calor durante la noche.

### Simiente y hospedante

En este estudio se usaron 300 g de hembras ovíparas como material biológico para la propagación inicial, proporcionados por la empresa GranaZac S.P.R.R.L. (Villanueva Zacatecas, México). Como sustrato alimenticio se emplearon 120 cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cv Villanueva, de entre 10 y 12 meses de edad. Estos se cepillaron con cuidado, antes de la infestación, para remover polvo y residuos, y prevenir la incidencia de inmaduros de cochinilla silvestre (*D. opuntiae*).

### Técnica de propagación artificial

Para realizar la infestación los cladodios se distribuyeron horizontalmente en el piso y sobre éstos se colocaron dos tamices (40x40 cm); en cada tamiz se dispusieron 150 g de adultas grávidas (Figura 1A). A fin de obtener cladodios con densidad y distribución inicial homogénea de la progenie y tener cohortes de la misma edad, los cladodios con ninfas neonatas se sustituyeron cada dos días por cladodios nuevos. Después éstos se colgaron de manera invertida (acropétala), en el nivel respectivo dentro de la “nopaloteca” (Figura 1B). Los cladodios se colgaron de la base por medio de un gancho de alambre galvanizado calibre 12, para facilitar y asegurar la suspensión.

### Sistema de cría

El sistema de crianza empleado fue el de “nopaloteca”. Ésta es una estructura de madera (9 m<sup>2</sup>) dividida en cuatro niveles de altura, con una separación de 0.50 m (el nivel 1 se ubicó a

by the enterprise GranaZac S.P.R.R.L. (Villanueva Zacatecas, Mexico). The feed substrate was 120 *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cv Villanueva pear cactus cladodes 10 and 12 months old. These were brushed carefully before infestation to remove dust and residues and to prevent incidence of immature wild cochineal (*D. opuntiae*).

### Artificial propagation technique

For infestation, the cladodes were distributed horizontally on the floor and covered with two meshes (40x40 cm); on each mesh 150 g of pregnant females were spread out (Figure 1A). In order to obtain initial homogeneous density and distribution of the progeny and to have cohorts of the same age, the cladodes with neonate nymphs were substituted every two days. These new cladodes were then hung upside down (acropetal) in the respective level in the “nopaloteca” (Figure 1B). The cladodes were hung from their base using a galvanized wire hook (caliber 12) to facilitate and assure suspension.

### Rearing system

The rearing system used was the “nopaloteca”. This is a wooden structure (9 m<sup>2</sup>) divided into four height levels, with a separation of 0.50 m (level 1 was 0.50 m above the ground and level 4 was 2.0 m high). The structure was placed in the center of the greenhouse to assure the same conditions throughout.

### Experimental procedure

#### Effect of level height and harvest index on concentration of carminic acid and *D. coccus* fresh weight.

For determining whether temperature, relative humidity and quantity of light affect CAC and *D. coccus* yield, in the central

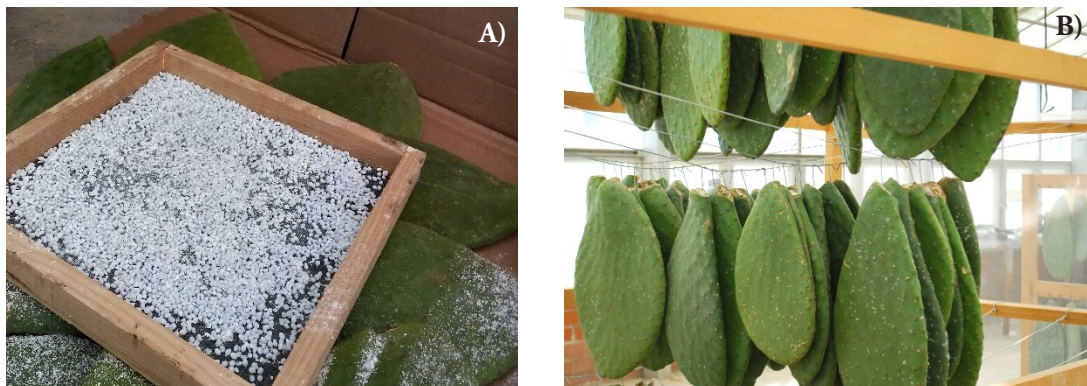


Figura 1. A) Infestación artificial de *D. coccus* B) Disposición de cladodios infestados en la estructura de la “nopaloteca”.  
Figure 1. A) Artificial infestation of *D. coccus* B) Arrangement of infested cladodes in the “nopaloteca” structure.

0.50 m del suelo y el nivel 4 a 2.0 m). La estructura se colocó en el centro del invernadero para asegurar que recibiera las mismas condiciones.

### Procedimiento experimental

#### Influencia de la altura del nivel y del índice de cosecha sobre la concentración de ácido carmínico y peso fresco de *D. coccus*

Para determinar si la temperatura, humedad relativa y cantidad de luz influyen en la CAC y rendimiento de *D. coccus*, se colocó en la parte central de cada nivel de la “nopaloteca” un sensor HOBO Pro v2 temp/RH onset USA®, con el cual se hizo un registro de temperatura (°C) máxima, promedio y mínima (TMAX, TPROM, TMIN) y de humedad relativa (%) máxima, promedio y mínima (HRMAX, HRPROM, HRMIN). Las lecturas se tomaron cada hora durante todo el ciclo biológico de *D. coccus*. La iluminación (lux) se cuantificó con un fotómetro EXTECH Instruments (Nashua, USA)® a las 09:00 h, 15:00 h y 18:00 h, un día por semana, la cantidad diaria cuantificada se acumuló durante todo el ciclo de desarrollo y se registró como iluminación total (ILTOTAL), para lo cual se tomaron lecturas de referencia en cada nivel, con el cuidado de realizarlas en el mismo punto siempre.

Para definir el índice de cosecha con la mayor CAC y rendimiento de *D. coccus*, se seleccionaron dos etapas de desarrollo: preoviposición y postoviposición. En la preoviposición se seleccionaron 15 cladodios de cada uno de los cuatro niveles (60 cladodios en total); se cosecharon a mano, con un pincel 73 d después de la infestación, cuando en promedio 5% de las hembras iniciaron la reproducción. Las hembras grávidas se recolectaron en un tamiz y se registró su peso fresco (PF, g) en una balanza analítica Explorer Pro® (NJ, USA) d=1/0.1 mg. Después, se colocaron en frascos de vidrio de 14 x 3.5 cm, los cuales se identificaron de acuerdo con el nivel de procedencia y luego se introdujeron en un congelador Maytag® a -10 °C por 3 d, para su sacrificio. Posteriormente, los insectos se sometieron a un proceso de secado natural dentro del invernadero durante 10 d (40.1, 19.6 y 28 °C, de temperatura máxima, mínima y promedio, respectivamente), removiendo los frascos dos veces por día para evitar su compactación.

En la segunda fase evaluada (postoviposición) se recolectaron las hembras contenidas en 15 cladodios restantes de cada nivel (60 cladodios en total), según el procedimiento para el secado ya señalado. El índice de cosecha fue el fin del periodo reproductivo (~130 d después de la infestación).

part of each level of the “nopaloteca” a sensor (HOBO Pro v2 temp/RH onset USA®) was placed to record maximum, average and minimum temperature (°C) (TMAX, TPROM, TMIN) and maximum, average and minimum relative humidity (%) (HRMAX, HRPROM, HRMIN). Readings were taken every hour during the entire biological cycle of *D. coccus*. Illuminance (lux) was quantified with an EXTECH Instruments® (Nashua, USA) photometer at 0.900 h, 15:00 h and 18:00 h, one day a week. The daily quantified amount was accumulated during the entire development cycle and registered as total illumination (ILTOTAL). Reference readings were taken in each level, taking care that it was always at the same point.

To define the harvest index with the highest CAC and *D. coccus* yield, two development stages were selected: pre-oviposition and post-oviposition. In pre-oviposition, 15 cladodes were selected from each of the four levels (60 cladodes total), and the cochineal was harvested manually with a paint brush 73 d after infestation when an average of 5% of the females began reproduction. These females were collected in a mesh and their fresh weight (FW, g) was recorded using an analytical balance Explorer Pro® (NJ, USA), d=1/0.1 mg. They were then placed in 14 x 3.5 cm glass jars, which were labeled by level and killed by placing them in a Maytag® freezer at -10 °C for 3 d. Later, the insects were subjected to a process of natural drying in the greenhouse for 10 d (40.1, 19.6 and 28 °C, maximum, minimum and average temperatures, respectively), shaking the jars twice a day to prevent compaction.

In the second evaluated phase (post-oviposition), the females contained in the 15 remaining cladodes of each level (60 cladodes total) were collected and subjected to the drying procedure described above. The harvest index was the end of the reproductive period (~130 d after infestation).

#### Determination of carminic acid

The females from the 15 cladodes corresponding to each level and of the two development stages were combined in a compound sample. Thus, there were a total of eight samples with 70 to 80 g of fresh cochineal. Once dried, each sample was ground in a Wiley mini Mill® (3383-L10 115 V, 60 Hz (Thomas Scientific Swedesboro, NJ 08085-0099-U.S.A.), which reduced them to particles that would sieve through a 40 mesh.

CAC was determined by the method proposed by Briseño-Garzón and Llanderal (2008). In a precipitation beaker, 100 mg of ground cochineal was mixed with 30 mL hydrochloric acid (HCl 2N). The mixture was boiled for 10 min and gauged to 1000 mL with distilled water; the entire sample was

### Determinación de ácido carmínico

Las hembras de 15 cladodios correspondientes a cada nivel y de las dos etapas de desarrollo se conjuntaron en una muestra compuesta. Así hubo ocho muestras en total con 70 a 80 g de cochinilla fresca. Una vez secas, cada muestra se pulverizó en un molino Wiley Mini Mill® (3383-L10 115 V, 60 Hz (Thomas Scientific Swedesboro, NJ 08085-0099-U.S.A.), que las redujo a partículas de tamiz malla 40.

La CAC se determinó por el método propuesto por Briseño-Garzón y Llanderal (2008). En un vaso de precipitado se colocaron 100 mg de cochinilla molida, se agregaron 30 mL de ácido clorhídrico (HCl 2N) y se mezclaron. La mezcla hirvió por 10 min, se aforó a 1000 mL con agua destilada y se filtró toda la muestra para desechar los primeros 200 mL. El resto se usó para determinar la absorbancia a 494 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S VIS Thermo Scientific®. La CAC se calculó al sustituir los valores de la absorbancia en la ecuación de una curva de calibración realizada con AC al 90% de pureza (SIGMA®). Para cada muestra compuesta de *D. coccus*, se realizó la cuantificación por triplicado y se tomaron 10 lecturas de cada una.

### Análisis estadístico

Con los datos se realizó un ANDEVA para determinar diferencia entre tratamientos (niveles y etapas de desarrollo), y en el caso de los niveles, las covariables fueron la temperatura, humedad relativa e iluminación, sobre las variables de CAC (%) y PF (g). El diseño experimental fue completamente al azar, con 15 repeticiones y la unidad experimental fue un cladodio. Para determinar diferencias estadísticas entre medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Asimismo, se realizó un análisis de correlación simple ( $r$ , coeficiente de Pearson) entre tratamientos, variables de respuesta y covariables. El proceso estadístico se realizó con el sistema R Versión 3.5.1 (R Core Team, 2018).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Influencia de la altura del nivel y la fase de desarrollo de *D. coccus* sobre la concentración de ácido carmínico (CAC)

En la concentración de ácido carmínico (CAC) en *D. coccus*, criada bajo el sistema de “nopaloteca” en condiciones semicontroladas, influyeron altura del nivel ( $gl=3$ ,  $f=48.36$ ,  $p \leq 0.01$ ), temperatura promedio ( $gl=1$ ,  $f=27.34$ ,  $p \leq 0.01$ ) y fase de desarrollo en que se cosechó ( $gl=1$ ,  $f=311.30$ ,  $p \leq 0.01$ ). La CAC mayor (19.2%) se registró en el nivel 2, a 1.0 m de altura, el cual tuvo diferencia estadística con la CAC

filtered, and the first 200 mL was discarded. The rest was used to determine absorbance at 494 nm in a GENESYS 10S VIS Thermo Scientific® spectrophotometer. CAC was calculated by substituting the absorbance values in the equation of a calibration curve constructed with 90% pure CA (SIGMA®). Each compound sample of *D. coccus* was quantified in triplicate and 10 readings were taken.

### Statistical analysis

An ANOVA was performed on the data to determine differences between treatments (levels and development stages). In the case of levels, the covariables were temperature, relative humidity and illumination over the variables CAC (%) and FW (g). The experimental design was completely randomized with 15 replications, and the experimental unit was one cladode. To determine statistical differences between means, the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) was used. Also, a simple correlation analysis ( $r$ , Pearson coefficient) was performed for treatments, response variables and covariables. The statistical process was carried out with R Version 3.5.1 (R Core Team, 2018).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Influence of level height and development phase of *D. coccus* on carminic acid concentration (CAC)

The carminic acid concentration (CAC) in *D. coccus* reared in the “nopaloteca” system in semi-controlled conditions was affected by level height ( $df=3$ ,  $f=48.36$ ,  $p \leq 0.01$ ), average temperature ( $df=1$ ,  $f=27.34$ ,  $p \leq 0.01$ ) and the development phase in which it was harvested ( $df=1$ ,  $f=311.30$ ,  $p \leq 0.01$ ). The highest CAC (19.2%) was found in level 2 at 1.0 m high and was statistically different from the CAC obtained in the other three levels. In contrast, the lowest average value (16.7%) was obtained in level 4 (Figure 2).

This trend contrasts with the results of Alonso *et al.* (2013), who recorded a higher CAC (17.5%) at 1.5 m, but it decreased at lower levels (16.9% at 1.0 m and 16.5% at 0.5 m); however, they tested three level instead of four. The behavior registered in our study could be associated with the cement floor used in the greenhouse. This type of floor causes an effect of radiation-convection of light and temperature at the lowest level, different from the effect of “Ground Cover” mesh floors.

International norms for classifying cochineal quality is diverse, and each enterprise that acquires

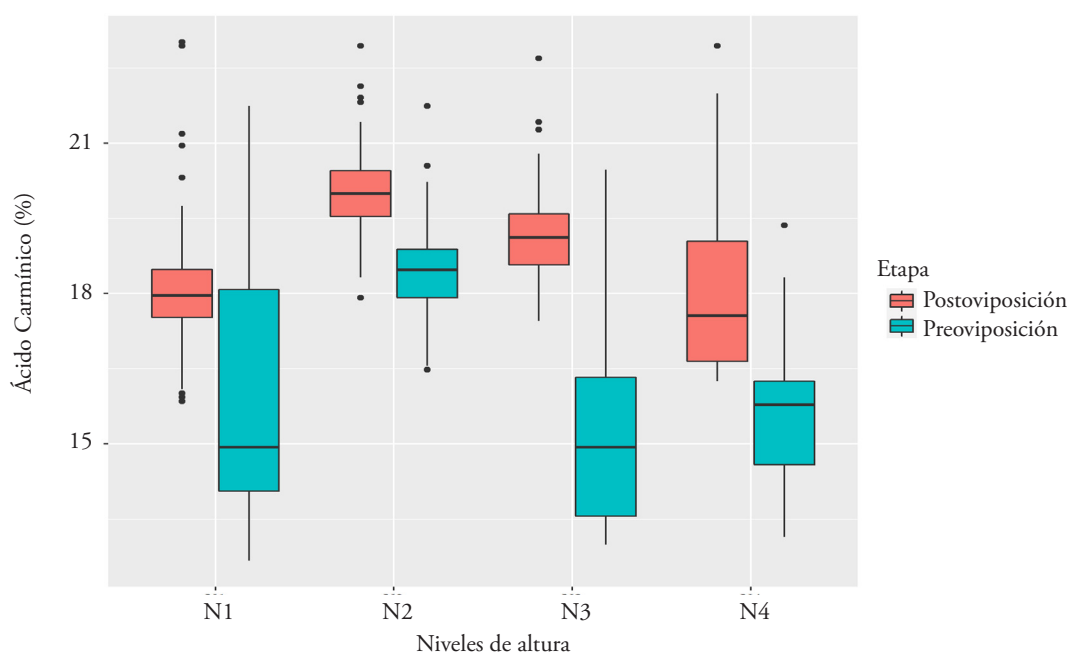
obtenida en los otros tres niveles; en contraste el valor promedio más bajo (16.7%) se obtuvo en el nivel 4 (Figura 2).

Esta tendencia contrasta con los resultados de Alonso *et al.* (2013) quienes registraron la CAC más alta en 1.5 m con 17.5%, pero disminuyó conforme la altura del nivel se redujo (16.9% a 1.0 m y 16.5% a los 0.5 m); aunque ellos probaron tres niveles, en lugar de cuatro. El comportamiento registrado en nuestra investigación podría asociarse con el piso de cemento usado en el invernadero de nuestro estudio. Este tipo de piso causa un efecto de radiación-convección de la luz y la temperatura en el nivel más bajo que difiere del obtenido en los invernaderos con piso de malla “Ground Cover”.

La normativa internacional para clasificar la calidad de la cochinilla es diversa, y ahora cada empresa adquiere el producto y establece su precio en función del contenido de AC, como criterio principal. En nuestra investigación, las CAC obtenidas en los niveles del 1 al 3 fueron superiores a las registradas por Alonso *et al.* (2013) en los mismos niveles de altura, pero son similares a las obtenidas en otros sistemas de producción. Por ejemplo, Méndez-Gallegos

the product establishes its price in function of the content of CA, as the principal criterion. In our study, the CAC obtained in levels 1 to 3 were higher than those reported by Alonso *et al.* (2013) at the same height levels but similar to those obtained in other production systems. For example, Méndez-Gallegos *et al.* (2010) reported that CAC oscillated between 15 and 19% in the laboratory. In the same conditions in Chile, Rodríguez *et al.* (2005) found average values of 16.9% to 19.1% in two rearing stations. Moreover, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) obtained 19.4% in a micro-tunnel covered with transparent plastic during the period from August to December.

Each height level evaluated in the “nopaloteca” had its particular climatic conditions, although only temperature had a higher degree of influence in CAC ( $p \leq 0.0001$ ). According to Campos Figueroa and Llanderal-Cázares (2003), this rearing system provides suitable conditions for establishment and development of the insect because it enables management of temperature oscillations (maximum 31 °C, minimum 12 °C and mean 20 °C), RH (95%) and ventilation. In this respect, Rodríguez *et*



**Figura 2. Concentración de ácido carmínico (CAC) en dos etapas de desarrollo de *D. coccus* criada en “nopaloteca” con cuatro niveles de altura.**

**Figure 2. Carminic acid concentration (CAC) in two development stages of *D. coccus* reared in a “nopaloteca” with four height levels.**

*et al.* (2010) registraron que la CAC osciló entre 15 y 19%, en condiciones de laboratorio. En las mismas condiciones en Chile, Rodríguez *et al.* (2005) encontraron valores promedio de 16.9% a 19.1% en dos estaciones de crianza. Además, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) obtuvieron 19.4% en microtúnel con plástico transparente en el periodo de agosto-diciembre.

Cada nivel de altura evaluado en la “nopaloteca” presentó condiciones climáticas particulares, aunque sólo la temperatura influyó en mayor grado sobre la CAC ( $p \leq 0.0001$ ). De acuerdo con Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares (2003) este sistema de cría proporciona condiciones adecuadas para el establecimiento y desarrollo del insecto, porque permite manejar las oscilaciones de temperatura (máxima 31 °C, mínima 12 °C y media 20 °C), HR (95%) y ventilación. Al respecto, Rodríguez *et al.* (2005) demostraron que tanto la temperatura, como el fotoperiodo son factores considerados influyentes sobre la CAC.

La CAC más alta ( $p \leq 0.05$ ) se obtuvo en la fase de postoviposición con 18.8% y en preoviposición el valor promedio fue 16% ( $p \leq 0.05$ ), ambos con diferencia estadística (Figura 2). En el índice de cosecha hubo resultados contrastantes. Rodríguez *et al.* (2005) encontraron que las hembras recolectadas en preoviposición, tuvieron una CAC promedio de 18%, pero Flores-Alatorre *et al.* (2014) observaron que hembras recolectadas en fase post reproductiva y hembras adultas estériles más pequeñas (CAC, 26.27%) producían concentraciones mayores de AC.

De manera similar, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) observaron CAC de 19.4 a 22.9% en hembras recolectadas 15 d después de iniciada la reproducción. En hembras recolectadas cuando el 50% inició la oviposición, la CAC fue 23.6% con 16 h de luz (Tello y Vargas, 2015). Lo anterior sugiere que entre más tiempo se mantengan las hembras de *D. coccus* en reproducción sobre el cladodio, la CAC aumenta hasta en 3.8%. Sin embargo, lo anterior requiere obtener cosechas cada 120 d; es decir, solo tres de las cuatro esperadas por año (Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares, 2003).

### Influencia de la altura del nivel y de la fase de desarrollo sobre el peso fresco de *D. coccus*

Los factores que influyeron en el PF (g) de *D. coccus* fueron altura del nivel ( $gl=3$ ,  $f=17.57$ ,  $p \leq 0.0001$ ), fase de desarrollo ( $gl=1$ ,  $f=47.61$ ,

*et al.* (2005) demonstrated that both temperature and photoperiod are factors considered to affect CAC.

The highest CAC ( $p \leq 0.05$ ) was obtained in the post-oviposition phase, 18.8%, compared with the pre-oviposition phase with an average value of 16% ( $p \leq 0.05$ ); the two values are statistically different (Figure 2). Rodríguez *et al.* (2005) found that females collected in pre-oviposition had an average CAC of 18%, but Flores-Alatorre *et al.* (2014) observed that females collected in the post-reproductive stages and smaller sterile adult females produced higher concentrations of CA (CAC, 26.7%).

Likewise, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) observed CAC of 19.4 to 22.9% in females collected 15 d after initiating reproduction. In females reared with 16 h of light and collected when 50% had initiated oviposition, CAC was 23.6% (Tello and Vargas, 2015). This suggests that the longer *D. coccus* females remain in reproduction on the cladode, when *D. coccus* females remain in production longer on the cladode, CAC can increase by up to 3.8%. However, this requires harvesting every 120 d, that is, only three of the four expected harvests per year (Campos-Figueroa and Llanderal-Cázares, 2003).

### Effect of height level and of development phase on *D. coccus* fresh weight

The factors that influenced *D. coccus* FW (g) were level height ( $df=3$ ,  $f=17.57$ ,  $p \leq 0.0001$ ), development phase ( $df=1$ ,  $f=47.61$ ,  $p \leq 0.0001$ ), average temperature ( $df=1$ ,  $f=192.70$ ,  $p \leq 0.0001$ ) and maximum temperature ( $df=1$ ,  $f=7.90$ ,  $p \leq 0.01$ ). Contrary to the behavior of CAC, level 2, 1 m high, had the lowest value of FW (3.5 g per cladode), while the highest value was recorded in level 3, 1.5 m high, with 4.9 g per cladode. It is worth mentioning that at this level, besides the highest value of FW, an adequate value of CAC was also obtained (Table 1).

The FW values obtained in our study were lower than those reported by Alonso *et al.* (2013), who also underlined that yield in function of FW per cladode decreases as the height of the level increases. In this respect, Campos-Figueroa and Llanderal-Cázares (2003) did not observe differences in FW among the three levels they tested, but they obtained a higher yield of fresh cochineal per cladode (7.8 g). The values obtained in our study (2.5 g) were higher than those reported by Tovar *et al.* (2005).

$p \leq 0.0001$ ), temperatura promedio ( $gl=1$ ,  $f=192.70$ ,  $p \leq 0.0001$ ) y temperatura máxima ( $gl=1$ ,  $f=7.90$ ,  $p \leq 0.01$ ). Contrario al comportamiento observado en CAC, el nivel 2 ubicado a 1 m de altura obtuvo el valor más bajo de PF (3.5 g por cladodio); mientras que el valor más alto se registró en el nivel 3, a 1.5 m, con 4.9 g por cladodio. Cabe señalar que en este nivel también se obtuvo un valor apropiado de CAC y el PF mayor (Cuadro 1).

Los valores de PF obtenidos en nuestro estudio fueron inferiores a los reportados por Alonso *et al.* (2013) quienes además destacaron que el rendimiento, en función del PF por cladodio, disminuye conforme la altura del nivel es mayor. Al respecto, Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares (2003) no observaron diferencias respecto a PF entre los tres niveles que probaron, pero obtuvieron un rendimiento más alto de cochinilla fresca por cladodio (7.8 g). Los valores obtenidos en nuestro estudio (2.5 g) fueron mayores a los de Tovar *et al.* (2005).

Rodríguez *et al.* (2005) determinaron que la cochinilla con PF mayor presentó una CAC más baja, aunque pueden deponer un número mayor de huevos, lo cual supone una relación inversa entre la CAC y la fecundidad. Esta relación además sugiere la existencia de un compromiso fisiológico entre la asignación de recursos a reproducción o a defensa. La tendencia también podría estar relacionada a que un PF mayor brinda mejor protección a las ninfas “migrantes” para su establecimiento y desarrollo, en detrimento de la CAC. De manera similar, Méndez-Gallegos *et al.* (2010) determinaron que la cohorte con los valores de crecimiento poblacional más altos produjo la CAC más baja.

Otro aspecto importante es la competencia intraespecífica, porque una reducción del número de insectos en la superficie del cladodio podría reflejarse en un aumento de la CAC, como mecanismo de defensa (Aldama-Aguilera *et al.* 2005). Asimismo, se podría interpretar que al recibir poca luz las condiciones son adecuadas para la fijación y el desarrollo de *D. coccus*, pero hay un efecto negativo en la CAC, al reducirse la tasa fotosintética del hospedante (Nobel, 1998). De acuerdo con lo anterior, las diferencias en el PF de *D. coccus* se podrían atribuir a la distribución espacial de la iluminación y humedad relativa, pero principalmente de la temperatura en los niveles de la “nopaloteca”.

**Cuadro 1. Valores promedio de peso fresco (g) de *D. coccus* criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”.**  
**Table 1. Average values of fresh weight (g) of *D. coccus* reared in four height levels in a “nopaloteca”.**

| Niveles y altura (m) | Peso fresco (g)    |
|----------------------|--------------------|
| 1 (0.5 m)            | 4.8 a <sup>†</sup> |
| 2 (1.0 m)            | 3.5 b              |
| 3 (1.5 m)            | 4.9 a              |
| 4 (2.0 m)            | 4.4 a              |

<sup>†</sup>Valores promedio con letra diferente indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). ♦ Average values with different letters are statistically different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Rodríguez *et al.* (2005) determined that cochineal with the highest FW had the lowest CAC, even though they can have more eggs, which assumes an inverse relationship between CAC and fecundity. This relationship also suggests the existence of a physiological compromise in terms of resource allocation to reproduction or defense. The trend may also be related to better protection that a higher FW offers to the “migrant” nymphs for establishment and development, in detriment of CAC. Likewise, Méndez-Gallegos *et al.* (2010) determined that the cohort with the highest population growth values produced the lowest CAC.

Another important aspect is intraspecific competition. A reduction in the number of insects on the surface of the cladode could be reflected in an increase in CAC, as a defense mechanism (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). It could also be interpreted that, receiving little light, the conditions are adequate for establishment and development of *D. coccus*. But there is a negative effect on CAC when the host photosynthetic rate decreases (Nobel, 1998). It follows that the differences in *D. coccus* FW can be attributed to spatial distribution of illumination and relative humidity, but mainly of temperature, in the levels of the “nopaloteca”.

The FW obtained in this study in the pre-oviposition phase was high (4.9 g per cladode); this is associated with the weight of the eggs contained in the females. In contrast, those that concluded the reproductive process had only 3.9 g per cladode. This implies taking advantage of the reproductive process to obtain progeny for a successive generation of *D.*

El PF obtenido en este estudio en la fase de preoviposición fue superior (4.9 g por cladodio), lo cual se asocia con el peso de los huevos contenidos en las hembras. En contraste, aquellas que concluyeron el proceso reproductivo tuvieron solo 3.9 g por cladodio. Lo anterior implica que se puede aprovechar el proceso de reproducción para obtener progenie para una generación sucesiva de *D. coccus* y al mismo tiempo generar una CAC mayor. Los valores promedio de PF en nuestro estudio fueron bajos en comparación a los 9.6 g de cochinita fresca obtenidos en estudios en Perú con este mismo sistema (Hernández *et al.*, 2017).

El análisis de correlación (Pearson) se mostró significativo sólo para PF y CAC, lo cual indica que a menor peso fresco del insecto la CAC es más alta (Cuadro 2); un resultado similar al registrado por Alonso *et al.* (2013). Existen algunas tendencias destacadas que podrían explicar el comportamiento de las variables productivas (Cuadro 2). Por ejemplo, entre iluminación total (ILTOTAL), temperatura mínima (TMIN), humedad relativa promedio (HRPROM) y la CAC (CA) o entre la temperatura máxima (TMAX) e iluminación (ILTOTAL) y el PF. Todas las tendencias indican que CAC y PF aumentan en forma proporcional, cuando una de las dos variables se incrementa hasta cierto límite; lo cual sugiere que *D. coccus* tiene umbrales específicos para su desarrollo óptimo.

*coccus* and, at the same time, generate a higher CAC. The average values of FW in our study were low, compared with the 9.6 g of fresh cochineal obtained in studies in Peru with the same system (Hernández *et al.*, 2017).

The correlation analysis (Pearson) was significant only for FW and CAC, indicating that the lower the fresh weight of the insect, the higher the CAC (Table 2). A similar result was reported by Alonso *et al.* (2013). There are some outstanding trends that could explain the behavior of the productive variables (Table 2), for example, in total illumination (ILTOTAL), minimum temperature (TMIN), average relative humidity (HRPROM) and CAC (CA), or between maximum temperature (TMAX) and illumination (ILTOTAL) and FW. All the trends indicate that CAC and FW increase proportionally when one of the two variables, increases up to a certain limit. This suggests that *D. coccus* has specific thresholds for optimal development.

The results and trends obtained in this study indicate that both relative humidity and luminosity, but principally temperature, at each height level within the “nopaloteca” affected productivity (FW) and quality (CAC) of *D. coccus*. Therefore, and because cochineal producers use colonies of their own systems as rearing stock for successive generations of production or they commercialize them as seed

**Cuadro 2. Matriz de correlación entre variables productivas y variables climáticas analizadas.**

**Table 2. Correlation matrix between the analyzed productive and climatic variables.**

|         | AC <sup>†</sup> | PF                       | TMAX         | TPROM       | TMIN        | HRMAX        | HRPROM       | HRMIN        | ILTOTAL      |
|---------|-----------------|--------------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|         | 1.00            | <b>-0.38<sup>‡</sup></b> | <b>0.21</b>  | 0.06        | <b>0.26</b> | <b>-0.18</b> | <b>0.41</b>  | <b>0.24</b>  | <b>0.28</b>  |
| PF      |                 | 1.00                     | <b>-0.11</b> | 0.05        | 0.01        | -0.03        | <b>-0.33</b> | <b>-0.10</b> | <b>-0.19</b> |
| TMAX    |                 |                          | 1.00         | <b>0.89</b> | -0.06       | <b>0.48</b>  | <b>0.36</b>  | <b>-0.80</b> | <b>0.94</b>  |
| TPROM   |                 |                          |              | 1.00        | <b>0.24</b> | <b>0.18</b>  | -0.05        | <b>-0.82</b> | <b>0.71</b>  |
| TMIN    |                 |                          |              |             | 1.00        | <b>-0.86</b> | <b>-0.34</b> | <b>0.29</b>  | <b>-0.26</b> |
| HRMAX   |                 |                          |              |             |             | 1.00         | <b>0.54</b>  | <b>-0.60</b> | <b>0.59</b>  |
| HRPROM  |                 |                          |              |             |             |              | 1.00         | 0.04         | <b>0.53</b>  |
| HRMIN   |                 |                          |              |             |             |              |              | 1.00         | <b>-0.69</b> |
| ILTOTAL |                 |                          |              |             |             |              |              |              | 1.00         |

<sup>†</sup>AC = Concentración de ácido carmínico (%); PF = peso fresco (%); TMAX = temperatura máxima (°C); TPROM = temperatura promedio (°C); TMIN = temperatura mínima (°C); HRMAX = humedad relativa máxima (%); HRPROM = humedad relativa promedio (%); HRMIN = humedad relativa mínima (%); ILTOTAL = iluminación total (lux). <sup>‡</sup>Los valores en negrita son significativos (r, Pearson;  $\alpha=0.05$ ). ♦ AC = Carminic acid concentration (%); PF = fresh weight (%); TMAX = maximum temperature (°C); TPROM = average temperature (°C); TMIN = minimum temperature (°C); HRMAX = maximum relative humidity (%); HRPROM = average relative humidity (%); HRMIN = minimum relative humidity (%); ILTOTAL = total illumination (lux). <sup>‡</sup>Values in bold type are significant (r, Pearson;  $\alpha=0.05$ ).

Los resultados y tendencias obtenidos en esta investigación indican que tanto la humedad relativa y la luminosidad, pero principalmente la temperatura de cada nivel de cría dentro de la “nopaloteca”, influyeron en la productividad (PF) y calidad (CAC) de *D. coccus*. Por lo tanto, y debido a que los productores de cochinilla utilizan colonias de su propio sistema como pies de cría para las siguientes generaciones de producción o las comercializan como simiente, se sugiere seleccionar las hembras provenientes del nivel 3 (1.5 m) en la “nopaloteca”.

Con la finalidad de incrementar la CAC en *D. coccus* se recomienda dejar que las hembras concluyan su proceso reproductivo, aunque se requiera un número mayor de insectos por unidad de medida. Esta cantidad mayor se requiere por la reducción del peso corporal que implica el proceso reproductivo. Una ventaja adicional de esta opción es que la hembra muere de manera natural, y se evita su sacrificio.

## CONCLUSIONES

El nivel (altura) más eficiente en la nopaloteca para la producción de ácido carmínico fue 1.0 m. Sin embargo, no proporciona las mejores condiciones para que las hembras de *D. coccus* generen peso corporal mayor. La parte media de la estructura brinda las condiciones adecuadas para incrementar tanto la productividad, como la concentración del ácido carmínico.

La etapa de postoviposición fue mejor para la recolecta de las hembras, en función de la concentración de ácido carmínico, la cual fue mayor cuando el peso fresco de la hembra se redujo. Estos resultados pueden facilitar a los productores la toma de decisiones, sobre las condiciones requeridas para mantener o incrementar la calidad y el rendimiento de la cochinilla en su sistema de cría, de acuerdo con sus objetivos (venta para colorante o pie de cría).

## LITERATURA CITADA

- Aldama-Aguilera, C., C. Llanderal-Cázares, M. Soto-Hernández, y L. E. Castillo-Márquez. 2005. Producción de grana-cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en plantas de nopal a la intemperie y en microtúneles. *Agrociencia* 39:161-171.
- Alonso, M., G. Palacios, S. P. Ortín, A. Talamo, R. Rojas, L. B. Lozano, M. E. Toncovich, and E. E. A. Cerrillos. 2013. Evaluation of carminic acid obtained from cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) produced under protected conditions. *Acta Hort.* 995: 401-404.

insects, we suggest selection of females from level 3 (1.5 m) in the “nopaloteca”.

With the goal of increasing CAC in *D. coccus*, we recommend allowing the females to conclude their reproductive process, even though it requires a larger number of insects per unit of measure. This higher number is required because of the reduction in body weight that occurs in the reproductive process. An additional advantage of this option is that the females die naturally, and their sacrifice is avoided.

## CONCLUSIONS

The most efficient height level in the “nopaloteca” for production of carminic acid was 1.0 m. However, this level does not provide the best conditions for *D. coccus* females to generate more body weight. The middle part of the structure provides adequate conditions for increasing both productivity and the concentration of carminic acid.

The post-oviposition stage was better for collecting the females, as a function of the concentration of carminic acid, which was higher when the fresh weight of the female was reduced. These results can facilitate decision-making by the producers regarding the conditions required to maintain or increase quality and yield of cochineal in their rearing systems, depending on their objectives (sale for dye or for rearing stock).

—End of the English version—



- Anculle, A. A., C. V. Castro, y O. A. Julca. 2017. Caracterización de fincas productoras de tuna (*Opuntia ficus-indica*) para la producción de cochinilla del carmín (*Dactylopius coccus*) en La Joya (Arequipa, Perú). *Aporte Santiaguino* 10: 245-258.
- Briseño-Garzón, A., y C. Llanderal. 2008. Contenido de ácido carmínico en hembras de grana cochinilla de diferentes edades. In: Llanderal C., D. H. Zetina, A. L. Viguera, y L. Portillo (eds). *Grana Cochinilla y Colorantes Naturales*. Colegio de Postgraduados. ISBN: 978-607-7533-10-8. Texcoco, México. pp:16-20.
- Campos-Figueroa, M. C., y C. Llanderal-Cázares. 2003. Producción de grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. *Agrociencia*. 37: 149-155.
- Chávez-Moreno, C. K., A. Tecante, and A. Casas. 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction, and distribution. *Biodivers. Conserv.* 18: 3337.

- Dettner, K. 2014. Toxins, defensive compounds, and drugs from insects. *In*: Hoffmann, K. (ed). Insect Molecular Biology and Ecology. 1st edition. eBook ISBN: 9780429156137. CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 39-93.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2015. Scientific opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. EFSA J. 13: 1-65.
- Flores-Alatorre, H. L., V. Abrego-Reyes, J. A. Reyes-Esparza, E. Ángeles, and F. Alba-Hurtado. 2014. Variation in the concentration of carminic acid produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopidae) at various maturation stages. J. Econ. Entomol. 107: 1700-1705.
- Hernández, A. A. D., L. L. A. Matos, C. J. A. Rojas, V. A. P. Santa Cruz, L. A. A. Cortez, y D. L. A. Huayna. 2017. Utilización de la técnica nopaloteca para la crianza de *Dactylopius coccus* Costa bajo condiciones controladas. Rev. Infinitum 7:1-8.
- Méndez-Gallegos, S. de J., L. A. Tarango-Arambula, A. Carnero, R. Tiberi, y O. Díaz-Gómez. 2010. Crecimiento poblacional de la cochinilla *Dactylopius coccus* Costa criada en cinco cultivos de nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. Agrociencia. 44: 225-234.
- Müller-Maatsch, J., and C. Gras. 2016. The "carmine problem" and potential alternatives. *In*: Carle, R. and R. Schweiggert (eds). Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages, Industrial Applications for Improving Food Color. 1st edition. eBook ISBN:9780081003923. Wood head Publishing, Elsevier Ltd. Cambridge, UK. pp: 385-428.
- Nobel, P. S. 1998. Los Incomparables Agaves y Cactus. Trillas. México. pp: 121-125.
- OEPM (Oficina Española de Patentes y Marcas). 2019. Proceso industrial de producción de cochinilla del carmín. España. <https://patentados.com/2011/proceso-industrial-de-produccion>. (Consulta: marzo 2019).
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. (Consulta: abril 2019).
- Rodríguez, L. C., E. Faúndez, J. Seymour, C. A. Escobar, L. Espinoza, M. Petroutsas, A. Ayres, y H. M. Niemeyer. 2005. Factores bióticos y concentración de ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: Dactylopiidae). Agric. Téc. 65(3):323-329.
- Tello, V., y J. Vargas. 2015. Efecto de la luz artificial a diferentes fotoperiodos sobre dos variables productivas de la grana cochinilla, *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) para su cultivo bajo condiciones controladas. IDESIA (Chile) 33:23-30.
- Tovar A., M. Pando-Moreno, and C. Garza. 2005. Evaluation of three varieties of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as hosts of the cochineal insect *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) in a semiarid area of northeastern Mexico. Econ. Bot. 59: 3-7.

# OCCURRENCE OF ROOT-KNOT NEMATODE ON WINTER TOMATO AND ITS EFFECT ON YIELD UNDER SUBTROPICAL CLIMATE

## OCURRENCIA DEL NEMÁTODO AGALLADOR DE LA RAÍZ EN TOMATE INVERNAL Y SU EFECTO SOBRE EL RENDIMIENTO EN CLIMA SUBTROPICAL

Hai Yan **Wu**, Qiong **He**, Xun Bo **Zhou**\*

Guangxi key laboratory of Agric-Environment and Agric-products Safety, Agricultural College of Guangxi University, Nanning 530004, China. (xunbozhou@gmail.com).

### ABSTRACT

Root-knot nematodes (RKN; *Meloidogyne* spp.), a major plant pathogen of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), causes yield loss in various tomato cultivars. Climatic conditions affect RKN infection; however, the effect of subtropical climate on epidemic RKN that have affected winter tomatoes in China is poorly known. In order to investigate the dynamics of the RKN populations in the rhizosphere soil of winter tomato and to analyze the relationship between grafted and non-grafted tomatoes and their yields, field experiments were conducted at the towns of Shuangqiao and Taiping in Guangxi Province, China during 2014-2016. The experimental fields of early and late sowing tomatoes were located at Shuangqiao and Taiping, respectively. ANOVA and means comparison (Tukey;  $p \leq 0.05$ ) were performed by using SPSS software version 19.0. Results showed that RKN (*Meloidogyne incognita*) had three generations in early and late sowing tomatoes. In early sowing tomato at: 0-31, 32-113, and 114-155 d after transplanting (DAT) RKN generations occurred at 31, 81, and 28-42 d respectively. In late sowing tomato, there were three generations at 0-60, 47-101, and 88-157 DAT, nematode needed 46-60, 40, and 55 d to finish each generation. Some nematicides were applied to suppress J2s populations in the fields when the J2 populations peaked. The yield of grafted tomato was significantly higher than that of non-grafted tomato ( $p \leq 0.05$ ). This result suggested that tolerance to RKN in grafted tomato rootstock was higher than that in non-grafted tomato.

**Key words:** *Meloidogyne incognita*, generations, rhizosphere, early sowing, late sowing, grafting.

### RESUMEN

El nematodo agallador de la raíz (NAR; *Meloidogyne* spp. o RKN, por sus siglas en inglés), es un fitopatógeno importante del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) que causa pérdidas en el rendimiento de sus cultivares. Las condiciones climáticas afectan la incidencia del NAR; sin embargo, se conoce poco del efecto del clima subtropical en los nematodos epidémicos que afectan al tomate invernal en China. Para estudiar la dinámica de poblaciones de los NAR en la rizósfera del cultivo de tomate invernal, y para analizar la relación entre tomates injertados y no injertados y sus rendimientos, se realizaron experimentos de campo en las localidades de Shuangqiao y Taiping en la provincia china de Guangxi entre 2014 y 2016. Los campos experimentales de tomates de siembra temprana y tardía se ubicaron en Shuangqiao y Taiping, respectivamente. El ANDEVA y la prueba de comparación de medias (Tukey;  $p \leq 0.05$ ) se efectuaron con el paquete estadístico SPSS, v. 19.0. Los resultados mostraron que los NAR (*Meloidogyne incognita*) formaron tres generaciones en tomate de siembra temprana y tardía. En tomate temprano, a los 0-31, 32-113, y 114-155 días después del trasplante (DDT), las cuales requirieron 31, 81 y 28-42 d, respectivamente. Durante la temporada de cultivo de tomate de siembra tardía, hubo tres generaciones a los 0-60, 47-101 y 88-157 DDT; los nematodos requirieron 46-60, 40 y 55 d para completar cada generación. Algunos nematicidas se aplicaron para suprimir a las poblaciones juveniles de segunda generación (J2) en los campos en los cuales las poblaciones J2 alcanzaron niveles máximos. El rendimiento del tomate injertado fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) que el del tomate no injertado. Este resultado indica que la tolerancia al NAR en portainjertos de tomates injertados fue mayor que en el tomate no injertado.

**Palabras clave:** *Meloidogyne incognita*, generaciones, rizósfera, siembra temprana, siembra tardía, injerto.

\* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.  
Received: June, 2019. Approved: April, 2020.  
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 717-729. 2020.

## INTRODUCTION

**R**oot-knot nematode (RKN; *Meloidogyne* spp.) disease affects most plant species. This nematode interacts with other plant pathogens and thereby exacerbates damages caused by other related soilborne diseases (Stirling *et al.*, 2004; Maqsood *et al.*, 2020). The yield of vegetables and other food crops can be reduced after an attack by RKN (Simon *et al.*, 2011; Kayani *et al.*, 2017). Tomato is widely cultured in open planting and greenhouses in China, but RKN often causes yield loss (Qiao *et al.*, 2010). In a field infected with RKN, a 36.5-81.3% yield loss was detected in an untreated control test plot, relative to the yield of a test plot treated with emamectin benzoate and cadusafos (Ma *et al.*, 2017).

The population densities of different *Meloidogyne* spp., such as *Meloidogyne naasi* and *Meloidogyne incognita*, in a field leads to different degrees of yield loss (Kayani *et al.*, 2017). The grain yield of rice is reduced by 97% at an initial RKN population density of 10 second-stage juveniles (J2) per gram of soil and 31% at the initial population density of 0.1 J2 g<sup>-1</sup> of soil (Poudyal *et al.*, 2005). RKN can cause from 25 to 100% in the yield of tomato cultivars (Seid *et al.*, 2015). The extent of crop loss can be influenced by the initial nematode population, crop susceptibility, cropping sequence, plant age, soil fertility, and secondary pathogen involvement (Simon *et al.*, 2011).

Yield reduction in plants directly depends on the initial population density of nematodes during planting (Moosavi, 2015; Kayani *et al.*, 2017). The population density of RKN in a field can be affected by many factors, such as temperature (Morris *et al.*, 2011), field capacity (Karajeh and Mohawesh, 2016), and nematicide application (Liu *et al.*, 2014). Population dynamics of RKN were described in many crops, including rice (Win *et al.*, 2013), cucumber (Giné *et al.*, 2014), and carrot (Heve *et al.*, 2015).

RKN disease in winter crops, such as tomato, is destructive in Guangxi Province, China. Guangxi has a subtropical monsoon climate, which allows nematodes to survive in soil all the year. However, the population dynamics of RKN in winter tomato exposed in such environment is poorly known. Therefore, the objectives of this study were to investigate: 1) the dynamics of RKN populations in

## INTRODUCCIÓN

**L**a enfermedad por el nematodo agallador de la raíz (NAR, *Meloidogyne* spp., en inglés RKN) afecta a muchas especies de plantas. Este nematodo interactúa con otros fitopatógenos, con ello exagera los daños causados por otras enfermedades relacionadas y transmitidas por el suelo (Stirling *et al.*, 2004; Maqsood *et al.*, 2020). El rendimiento de vegetales y otros cultivos alimenticios puede verse reducido luego de un ataque de NAR (Simon *et al.*, 2011; Kayani *et al.*, 2017). El cultivo del tomate es extenso en invernaderos y en campo abierto en China, pero el NAR suele reducir rendimientos (Qiao *et al.*, 2010). En un campo infectado con NAR se detectó una reducción en el rendimiento de 36.5-81.3% en una parcela testigo sin tratamientos, respecto a una parcela de prueba tratada con benzoato de emamectina y cadusafos (Ma *et al.*, 2017).

Las densidades de población de especies de *Meloidogyne* spp., tales como *Meloidogyne naasi* y *Meloidogyne incognita* en campo conducen a grados de reducción diferentes en el rendimiento (Kayani *et al.*, 2017). El rendimiento de grano de arroz se redujo en 97% con una densidad poblacional de 10 NAR juveniles de segunda generación (J2) por gramo de suelo y 31% en una densidad poblacional inicial de 0.1 J2 g<sup>-1</sup> de suelo (Poudyal *et al.*, 2005). El NAR puede causar entre 25 y 100% de reducción en el rendimiento de cultivares de tomate (Seid *et al.*, 2015). El grado de pérdida del cultivo puede verse influenciado por la población inicial de nematodos, susceptibilidad del cultivo, la secuencia de cultivo, la edad de la planta, fertilidad del suelo y el involucramiento de patógenos secundarios (Simon *et al.*, 2011).

La reducción del rendimiento en plantas depende, de manera directa, de la densidad de población inicial de los nematodos durante la siembra (Moosavi, 2015; Kayani *et al.*, 2017). La densidad poblacional de NAR en un campo puede verse afectada por muchos factores, tales como la temperatura (Morris *et al.*, 2011), la capacidad del campo (Karajeh y Mohawesh, 2016) y la aplicación de nematicida (Liu *et al.*, 2014). Las dinámicas de población de NAR se han descrito para muchos cultivos, incluidos arroz (Win *et al.*, 2013), pepino (Giné *et al.*, 2014) y zanahoria (Heve *et al.*, 2015).

La enfermedad del NAR en cultivos de invierno, como el tomate, es destructiva en la provincia

rhizosphere soil (RS) of early and late sowing winter tomatoes during growth season, 2) the differences in nematode population between RS and non-rhizosphere soil (nRS), 3) the yield of grafted and non-grafted tomatoes influenced by RKN, and 4) the number of generations of RKNs on winter tomato under subtropical monsoon climate.

## MATERIALS AND METHODS

### Dynamics of root-knot nematode population in rhizosphere soil and the yields of early sowing winter tomato

For the early sowing tomato, the seedlings were transplanted in early October. The experimental site was located at Shuangqiao, Nanning, Guangxi, China (23° 05' 54.59" N, 108° 21' 09.79" E). Two plots were set up: 182.0 m<sup>2</sup> each plot, 7 beds. The soil was loamy with pH 5.6 and contained 47.6 g kg<sup>-1</sup> of organic matter, 1.7 g kg<sup>-1</sup> of total N, 175.9 mg kg<sup>-1</sup> of available N, 24.5 mg kg<sup>-1</sup> of available P, and 361.2 mg kg<sup>-1</sup> of available K. The previous crop was rice.

The initial population density (before transplanting) of the RKN J2 in this field was 21.0 J2s per 100 cm<sup>3</sup> soil. Plant pattern was as following: each plant bed had two rows of tomato seedlings. The row spacing, bottom bed width, and bed height were 0.3, 1.0, and 0.3 m, respectively. The ditch width was set to 0.3 m, and the planting distance was set to 0.4 m (Figure 1).

de Guangxi, China. Guangxi cuenta con un clima subtropical de monzón, lo cual permite a los nematodos sobrevivir en el suelo durante todo el año. Sin embargo, se sabe poco de la dinámica poblacional de NAR en el tomate de invierno expuesto a tal ambiente. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron investigar: 1) la dinámica poblacional de NAR en la rizósfera del suelo (RS) de tomate invernal de siembra temprana y tardía durante su temporada de cultivo, 2) las diferencias en las poblaciones de nematodos entre RS y suelo sin rizósfera (nRS), 3) el rendimiento de tomates injertados y no injertados infectados por NAR, y 4) el número de generaciones de NAR en tomate invernal bajo clima subtropical de monzón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Dinámica poblacional del nematodo agallador de la raíz en la rizósfera del suelo y rendimiento del tomate invernal de siembra temprana

Para el tomate de siembra temprana, las plántulas se trasplantaron a principios de octubre. El sitio experimental se ubicó en Shuangqiao, Nanning, Guangxi, China (23° 05' 54.59" N, 108° 21' 09.79" E). Dos parcelas se prepararon: 182.0 m<sup>2</sup> cada parcela, 7 camas. El suelo era arcilloso con un pH de 5.6 y contenía 47.6 g kg<sup>-1</sup> de materia orgánica, 1.7 g kg<sup>-1</sup> de N total, 175.9 mg kg<sup>-1</sup> de

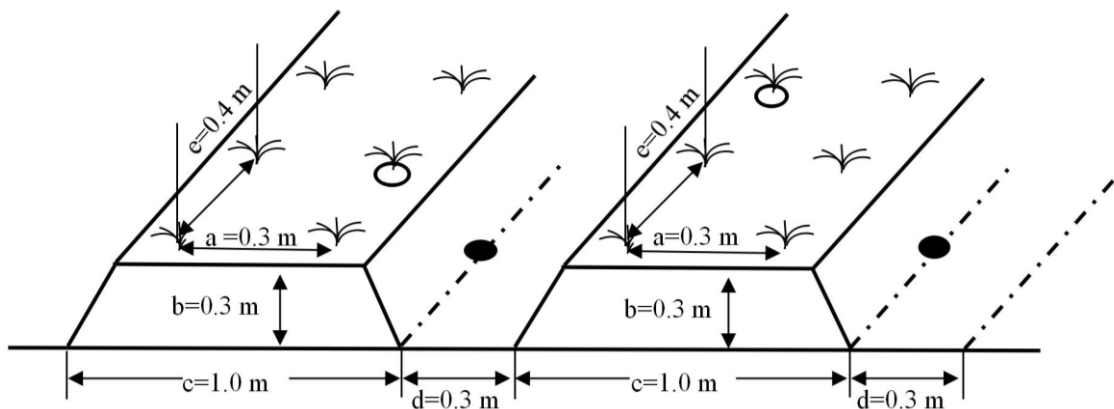


Figure 1. Map for tomato planting and sample spots during tomato growing season in the field. a: the row spacing; b: the bed height; c: the width of the bottom of the bed; d: the ditch width; e: individual spacing. ○, rhizosphere sample spot, indicates a sample spot that is 5 cm away from the tomato seedling main stem; ●, non-rhizosphere sample spot, indicates a sample spot that is at the edge of the bed where no root reached.

Figura 1. Mapa para la siembra de tomate y puntos de muestreo durante la temporada de cultivo de tomate en el campo. a: espaciado entre hileras; b: altura de camas; c: el ancho inferior de las camas; d: ancho de la zanja; e: espaciado individual. ○, punto muestra de rizósfera, indica un punto muestra a 5 cm del tallo principal de la plántula; ●, punto muestra no de rizósfera, indica un punto muestra al borde de la cama no alcanzado por ninguna raíz.

The grafted seeds (rootstock cultivar, Japanese super rootstock F1, Tailiang Germchit Co., Ltd.) and the scion cultivar (Henghe 5, Guangxi Dewodi Vegetable Seed Company) seeds were sown on August 25, 2015 and September 9, 2015, respectively.

Grafting was performed on September 22, 2015. Grafted and non-grafted seedlings (cultivar, Henghe 5) were transplanted when the 4th–5th leaf stages appeared on October 6, 2015. Each type had a plot of 280 m<sup>2</sup>. The fruits were completely harvested on March 23, 2016. Fertilizer application, irrigation, and other management strategies for the two experimental plots were standard. No nematicide was applied during the tomato growing season.

In the harvesting stage, the number of fruits per plant of grafted and non-grafted tomatoes was counted and weighed using an electronic scale separately. The mean weight per fruit and the fruits per plant were recorded, and the total yields of the grafted and non-grafted tomatoes were calculated.

#### **Dynamics of root-knot nematode population in the RS of late sowing winter tomato**

For late sowing tomato, the seedlings were transplanted in last October. In 2014–2015, and the experiment was performed in a tomato field located in Taiping town, Nanning, Guangxi Province (23° 06' 18.46" N, 108° 26' 10.42" E). The soil was loamy with pH 5.8 and contained 25.4 g kg<sup>-1</sup> of organic matter, 1.6 g kg<sup>-1</sup> of total N, 151.9 mg kg<sup>-1</sup> of available N, 19.2 mg kg<sup>-1</sup> of available P, and 141.2 mg kg<sup>-1</sup> of available K. The previous crop was rice.

The initial population density (before transplanting) of the RKN J2 in this field was 1.3 J2s per 100 cm<sup>3</sup> soil. Lime (395.0 kg ha<sup>-1</sup>) was utilized in the experimental field before tomato was transplanted. The experiment had two plots (182.0 m<sup>2</sup> each plot, 7 beds), and each plant bed had two rows of tomato seedlings. The row spacing, the bottom bed width, and the bed height were 0.3, 1.0, and 0.3 m, respectively. The ditch width was set to 0.3 m, and the planting distance was set to 0.4 m (Figure 1).

Two tomato cultivars, Gaisi (Beijing Mirike International Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd.) and Falali (Shandong Shouguang New Century Seedling Co., Ltd.), were used in this experiment. The tomato seedlings were sown in a seedling plate on October 2, 2014 and transplanted when the 4th–5th leaf stages were out on October 30, 2014. Then, the fruit was completely harvested on April 5, 2015. The fertilizer application, irrigation, and other management strategies for the two cultivar tomatoes were the same. Then, 5.7% emamectin benzoate ME (60.0 mL ha<sup>-1</sup>) was applied three times in the first three consecutive weeks after tomato was transplanted (once a week).

N disponible, 24.5 mg kg<sup>-1</sup> de P disponible, y 361.2 mg kg<sup>-1</sup> de K disponible. El cultivo anterior fue arroz.

La densidad de población inicial (antes de trasplantar) de J2 del NAR en este campo era de 21.0 J2s por 100 cm<sup>3</sup> suelo. El patrón de siembra fue el siguiente: cada cama contenía dos hileras de plántulas de tomate. El espaciado entre hileras, el ancho inferior de la cama y la altura de la cama fueron 0.3, 1.0, y 0.3 m, respectivamente. El ancho de la zanja se determinó en 0.3 m, y la distancia de siembra, en 0.4 m (Figura 1). Germoplasma para injerto (cultivar de portainjerto, super portainjerto japonés F1, Tailiang Germchit Co., Ltd.) y germoplasma del cultivar de vástago (Henghe 5, Guangxi Dewodi Vegetable Seed Company) se plantaron el 25 de agosto de 2015 y el 9 de septiembre de 2015, respectivamente.

El injerto se realizó el 22 de septiembre de 2015. Semillas injertadas y no injertadas (cultivar, Henghe 5) se trasplantaron en la etapa de aparición de las 4<sup>a</sup>–5<sup>a</sup> hojas, el 6 de octubre de 2015. Cada tipo contó con una parcela de 280 m<sup>2</sup>. Los frutos se cosecharon por completo el 23 de marzo de 2016. La aplicación de fertilizante, riego y otras estrategias de manejo fueron las estándar en ambas parcelas experimentales. No se aplicó nematicida durante la temporada de desarrollo del tomate.

En la etapa de cosecha, el número de frutas por planta injertada y no injertada se contabilizó y se registró el peso de forma separada con una báscula. El peso medio por fruto, y el peso total de los frutos por planta se registraron y se calculó el rendimiento total de los tomates injertados y no injertados.

#### **Dinámica poblacional del NAR en la RS del cultivo de tomate invernal de siembra tardía**

Para el tomate de siembra tardía, se trasplantaron las plántulas a finales de octubre en 2014–2015, y el experimento se llevó a cabo en un campo de tomate ubicado en el pueblo de Taiping, Nanning, provincia de Guangxi (23° 06' 18.46" N, 108° 26' 10.42" E). El suelo era arcilloso, con un pH de 5.8 y contenía 25.4 g kg<sup>-1</sup> de materia orgánica, 1.6 g kg<sup>-1</sup> de N total, 151.9 mg kg<sup>-1</sup> de N disponible, 19.2 mg kg<sup>-1</sup> de P disponible y 141.2 mg kg<sup>-1</sup> de K disponible. El cultivo anterior fue arroz.

La densidad de población inicial (antes de trasplantar) de la J2 de NAR en este campo fue de 1.3 J2s por 100 cm<sup>3</sup> de suelo. Cal (395.0 kg ha<sup>-1</sup>) se utilizó en el campo experimental antes de trasplantar el tomate. El experimento contaba con dos parcelas (182.0 m<sup>2</sup> cada parcela, 7 camas), y cada cama de plantas contaba con dos hileras de plantas de tomate. El espaciado entre hileras, el ancho inferior de la cama, y la altura de la cama fueron de 0.3, 1.0 y 0.3 m, respectivamente. El ancho de la zanja se ajustó a 0.3 m y el dispositivo de siembra se ajustó a 0.4 m (Figura 1).

Dos cultivares de tomate, Gaisi (Beijing Mirike International Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd.) y

In 2015-2016, the experiment field was established at Shuangqiao town, Guangxi Province (23° 05' 54.59" N, 108° 21' 09.79" E). One plot was set up (182.0 m<sup>2</sup> each plot, 7 beds). The soil was loamy with pH 5.7, 45.4 g kg<sup>-1</sup> of organic matter, 1.1 g kg<sup>-1</sup> of total N, 177.3 mg kg<sup>-1</sup> of available N, 53.5 mg kg<sup>-1</sup> of available P, and 193.6 mg kg<sup>-1</sup> of available K. The previous crop was rice.

The initial population density (before transplanting) of the RKN J2 in this field was 109.3 J2s per 100 cm<sup>-3</sup> soil. Plant pattern was the same as above (Figure 1). Cultivar Henghe 5 (Guangxi Dewodi Vegetable Seed Company) was used in this trial. Tomato seedlings were sowing in a seedling plate on October 3, 2015 and transplanted when 4th-5th leaf stages appeared on November 1, 2015. The fruits were then completely harvested on April 7, 2016. The fertilizer and irrigation application, 5.7 % emamectin benzoate ME (60.0 mL ha<sup>-1</sup>), and other management strategies for the tomatoes, were the same as those in the first-year trial.

The maximum and minimum daily air temperatures ( $T_{Max}$ ,  $T_{Min}$ ) on the day of sampling were recorded during tomato growth.

### Sample collection

The soil in the field was randomly obtained from 15 spots for the testing of initial population density in each plot before tomato planting. Surface soil of 1 cm depth was removed, and 5-10 cm deep soil was obtained. The soil samples were mixed well for nematode extraction. Soil samples were collected during the tomato growth period. For Gaisi and Falali, soil samples were collected from November 4, 2014 to April 5, 2015; for Henghe 5 was from November 6, 2015 to April 6, 2016; for grafted and non-grafted tomatoes were from October 9, 2015 to March 23, 2016.

The RS sample was obtained from the tomato rhizosphere region that was 5 cm away from the tomato seedling main stem, and the nRS sample (control) was obtained from the bed edge where no root reached. Approximately 1 cm of the surface soil was removed, the sample was taken from approximately 10 cm depth soil, and five spots were selected in each row for 20 spots for the RS samples of each tomato cultivar and the nRS samples in each field. The soil sample was mixed well for nematode extraction.

### Nematode extraction

Nematodes were extracted from a 100 cm<sup>3</sup> well-mixed soil sample through sugar flotation-sieving and centrifugation and at 65 °C gentle heat and fixed in triethanolamine formalin (Zheng *et al.*, 2012). The RKN J2 was identified based on morphology and counted by optical stereoscopy and microscopy (ShunYu

Falali (Shandong Shouguang New Century Seedling Co., Ltd.) se usaron en este experimento. Las plántulas de tomate se sembraron en una charola el 2 de octubre de 2014 y trasplantaron cuando las 4<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> hojas verdaderas emergieron, el 30 de octubre de 2014. Luego, el fruto se cosechó por completo el 5 de abril de 2015. La aplicación de fertilizante, riego y otras estrategias de manejo para ambos cultivares de tomate fueron las mismas. Luego, se aplicó 5.7% de benzoato de emamectina ME (60.0 mL ha<sup>-1</sup>) tres veces durante tres semanas consecutivas después del trasplante del tomate (una vez por semana).

En 2015-2016, el campo experimental se estableció en el pueblo de Shuangqiao, provincia de Guangxi (23° 05' 54.59" N, 108° 21' 09.79" E). Las parcelas se delimitaron (182.0 m<sup>2</sup>, 7 camas por cada parcela). El suelo era arcilloso, con un pH de 5.7, 45.4 g kg<sup>-1</sup> de materia orgánica, 1.1 g kg<sup>-1</sup> de N total N, 177.3 mg kg<sup>-1</sup> de N disponible, 53.5 mg kg<sup>-1</sup> de P disponible, y 193.6 mg kg<sup>-1</sup> de K disponible. El cultivo anterior fue arroz.

La densidad poblacional inicial (antes del trasplante) de la J2 del NAR en este campo fue de 109.3 J2s por 100 cm<sup>-3</sup> de suelo. El patrón de siembra fue el mismo descrito antes (Figura 1). Para esta prueba se usó el cultivar Henghe 5 (Guangxi Dewodi Vegetable Seed Company). Las plántulas de tomate se sembraron en charolas el 3 de octubre de 2015 y trasplantaron en la etapa de aparición de las 4<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> hojas el 1 de noviembre de 2015. Los frutos se cosecharon por completo el 7 de abril de 2016. Las aplicaciones de fertilizante y riego, 5.7 % benzoato de emamectina ME (60.0 mL ha<sup>-1</sup>) y otras estrategias de manejo de los tomates fueron iguales a las del ensayo del primer año.

Las temperaturas diarias del aire máximas y mínimas ( $T_{Max}$ ,  $T_{Min}$ ) en el día del muestreo se registraron durante el crecimiento del tomate.

### Recolección de muestras

El suelo del campo se obtuvo de manera aleatoria de 15 puntos para la prueba de densidad poblacional inicial en cada parcela antes de sembrar los tomates. El primer centímetro del suelo superficial se eliminó y se obtuvo la muestra de suelo de una profundidad de 5-10 cm. Estas muestras se colectaron durante el periodo de siembra del tomate, y se mezclaron bien para realizar la extracción de nematodos. En Gaisi y Falali, las muestras de suelo se colectaron del 4 de noviembre de 2014 al 5 de abril de 2015; en Henghe 5, fue del 6 de noviembre de 2015 al 6 de noviembre de 2016; en los tomates injertados y no injertados, fue del 9 de octubre de 2015 al 23 de marzo de 2016.

La muestra de RS se obtuvo de la región de la rizósfera del tomate que se encontraba a 5 cm del tallo principal de la plántula del tomate, y la muestra del nRS (control) se obtuvo del borde de la cama, a donde no alcanzaba a llegar ninguna raíz. El primer centímetro de la superficie del suelo se descartó; la muestra se

SZ6745N, Ningbo Sunny Instruments Co., Ltd., China). The J2 populations were expressed as the number of nematodes per 100 cm<sup>3</sup> soil (Coyne *et al.*, 1999).

### Data analysis

Data from individual experiments were analyzed with ANOVA by using SPSS (v. 19.0). Means were compared using Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Figures were created using SigmaPlot 10.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Population dynamics of J2 in the RS and the yields of early sowing winter tomato

In the field site of Shuangqiao town, anthesis and fruit-set of grafted tomato and non-grafted tomato occurred on November 7, 2015 (32 days after transplanting, DAT), and November 13, 2015 (37 DAT) respectively. The population dynamics of J2 in the RS of grafted tomato seedlings was remarkably different from that of the non-grafted tomato seedlings (Figure 2). The number of J2 in the RS of grafted tomato was significantly higher than

tomó de una profundidad del suelo de aproximadamente 10 cm, y se seleccionaron cinco puntos en cada hilera hasta 20 puntos para las muestras de RS de cada cultivar de tomate y las muestras de nRS en cada parcela. Las muestras de suelo se homogenizaron para la extracción de nematodos.

### Extracción de nematodos

Los nematodos se extrajeron de una muestra de suelo bien mezclada de 100 cm<sup>3</sup> por medio de tamizado de azúcar por flotación y centrifugado, seguido de exposición a un ligero calor de 65 °C y se fijó en trietanolamina formalina (Zheng *et al.*, 2012). La J2 de NAR se identificó por medio de morfología y se contabilizaron con microscopía óptica estereoscópica (ShunYu SZ6745N, Ningbo Sunny Instruments Co., Ltd., China). Las poblaciones J2 se expresaron como el número de nematodos por 100 cm<sup>3</sup> de suelo (Coyne *et al.*, 1999).

### Análisis de datos

Los datos de los experimentos individuales se analizaron con ANDEVA en SPSS (v. 19.0). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los gráficos se crearon con SigmaPlot 10.0.

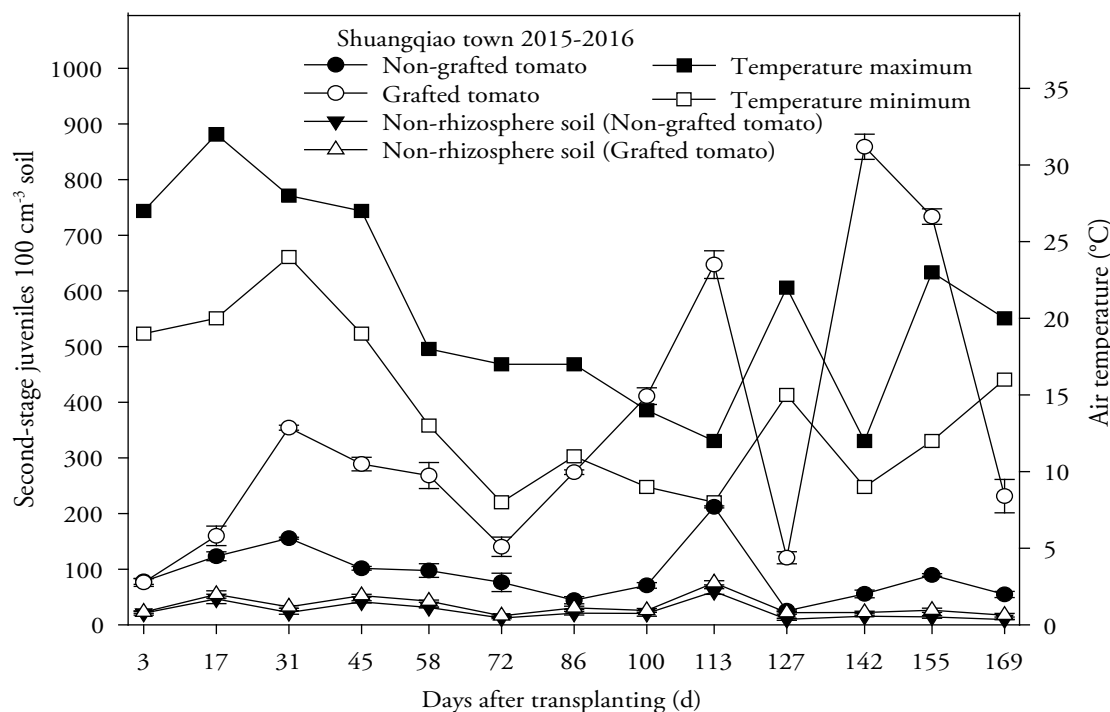


Figure 2. Dynamic of sampling day air temperature and second-stage juvenile population in the rhizosphere soil during early sowing tomato growth.

Figura 2. Dinámica de muestreo de temperatura del aire diurno de muestreo y población de juveniles de segunda generación (J2) en la rizósfera del suelo durante el crecimiento del tomate de siembra temprana.

that in the nRS of grafted tomato during tomato growth ( $p \leq 0.05$ ). The number of J2 in the RS was significantly higher than that in the nRS for non-grafted tomato during tomato growth, except 127 and 142 DAT ( $p \leq 0.05$ ). The number of RKN J2 in the RS of grafted tomato was significantly higher than that of non-grafted tomato, except at 3 DAT ( $p \leq 0.05$ ). At 3, 17, 58, and 72 DAT, the number of J2 in the RS of non-grafted and grafted tomatoes was significantly higher than that in the nRS ( $p \leq 0.05$ ).

The J2 population in the RS of non-grafted tomato that peaked at DAT 31 ( $T_{\text{Max}}$  28.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  24.0 °C), DAT 113 ( $T_{\text{Max}}$  12.0,  $T_{\text{Min}}$  8.0 °C), and DAT 155 ( $T_{\text{Max}}$  23.0,  $T_{\text{Min}}$  12.0 °C) were 155.7, 212.0, and 89.7 J2s per 100 cm<sup>-3</sup> soil; which were 7.0, 3.5, and 6.3 times those in the nRS of non-grafted tomato, respectively. The J2 population in the RS of grafted tomato that peaked at DAT 31 ( $T_{\text{Max}}$  28.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  24.0 °C), DAT 113 ( $T_{\text{Max}}$  12.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  8.0 °C), and DAT 142 ( $T_{\text{Max}}$  12.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  9.0 °C) were 354.3, 647.3, and 859.0 J2s per 100 cm<sup>-3</sup> soil, which were 11.0, 8.6, and 38.5 times those in the nRS of grafted tomato, respectively. The J2s population sampled from non-grafted tomato were remarkably higher than those sampled from grafted tomato. This result suggested that grafting rootstock could suppress RKN population and decrease their damage during tomato growth period.

The RKN had three generations, as revealed by the dynamics of J2 in the RS of the grafted and non-grafted tomato during early sowing tomato growth. First generation (31 d), second generation (81 d) and the third generation (28-42 d) developed at the early anthesis, the fruit-set period, and the late harvesting time respectively (Table 1). Therefore, some measures (nematicide application) can be adopted for the control of J2s population in the fields

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Dinámica poblacional de J2 del NAR en la RS y rendimientos de tomate invernadero de siembra temprana

En el sitio del campo en el pueblo de Shuangqiao, la antesis y el cuajado de tomates injertados y no injertados ocurrió el 7 de noviembre de 2015 (32 días después del trasplante, DDT) y el 13 de noviembre de 2015 (37 DDT) respectivamente. La dinámica poblacional de la J2 en la RS de plántulas de tomate injertado fue notablemente diferente al de las plántulas de tomate no injertadas (Figura 2). El número de J2 en la RS de tomate injertado fue significativamente mayor que aquel en el nRS de tomate injertado durante el crecimiento del tomate ( $p \leq 0.05$ ). El número de J2 en el RS fue significativamente más alto que en el nRS para el tomate sin injertar durante el crecimiento del tomate, excepto 127 y 142 DDT ( $p \leq 0.05$ ). El número de J2 NAR en el RS de tomate injertado fue significativamente mayor que en el del tomate no injertado, excepto 3 DDT ( $p \leq 0.05$ ). A los 3, 17, 58, y 72 DDT, el número de J2 en la RS de tomates no injertados e injertados fue significativamente mayor que en el nRS ( $p \leq 0.05$ ).

Las poblaciones de J2 en el RS de tomate no injertado que alcanzaron su punto máximo a los 31 DDT ( $T_{\text{Max}}$  28.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  24.0 °C), 113 DDT ( $T_{\text{Max}}$  12.0,  $T_{\text{Min}}$  8.0 °C), y 155 DDT ( $T_{\text{Max}}$  23.0,  $T_{\text{Min}}$  12.0 °C) fueron de 155.7, 212.0 y 89.7 J2s por 100 cm<sup>-3</sup> de suelo; 7.0, 3.5, y 6.3 veces las de aquellos en el nRS de tomate no injertado, respectivamente. Las poblaciones de J2 en el ST de tomate injertado que alcanzaron su punto máximo a los 31 DDT ( $T_{\text{Max}}$  28.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  24.0 °C), 113 DDT ( $T_{\text{Max}}$  12.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  8.0 °C), y 142 DDT ( $T_{\text{Max}}$  12.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  9.0 °C)

**Table 1. The time nematode needed to finish one generation during tomato growing season.**

**Cuadro 1. El tiempo requerido por el nematodo para completar una generación durante la temporada de siembra del tomate.**

|              | Treatments         | First generation (d) | Second generation (d) | Third generation (d) |
|--------------|--------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Early sowing | Grafted tomato     | 31 (0-31 DAT)        | 81 (32-113 DAT)       | 28 (114-142 DAT)     |
|              | Non-grafted tomato | 31 (0-31 DAT)        | 81 (32-113 DAT)       | 42 (114-155 DAT)     |
|              | Henghe 5           | 46 (0-46 DAT)        | 40 (47-87 DAT)        | 55 (88-143 DAT)      |
| Late sowing  | Gaisi              | 60 (0-60 DAT)        | 40 (61-101 DAT)       | 55 (102-157 DAT)     |
|              | Falali             | 46 (0-46 DAT)        | 40 (47-87 DAT)        | 55 (88-143 DAT)      |

DAT, days after transplanting ♦ DAT, días después de trasplante.

at the J2 population peak time, *i.e.* at 31, 113, 142, and 155 DAT in early sowing tomato. A number of nematicidal products, such as fluensulfone and fluopyram, show good potential for the management of southern RKN in lima beans (Jones *et al.*, 2017). Abamectin has been diffusely applied to control RKN disease in tomatoes (Qiao *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2015).

The average fruit weights of grafted and non-grafted tomatoes were 0.1 and 0.1 kg per fruit and  $3.4 \pm 0.1$  and  $2.1 \pm 0.2$  kg per plant, respectively (Table 2). The yields of grafted tomato were significantly higher than those of non-grafted tomato ( $64083.7 \pm 62.8$  and  $14577.0 \pm 48.2$  kg ha<sup>-1</sup> respectively;  $p \leq 0.05$ ). The yield of grafted tomato was 4.4 times that of non-grafted tomato because the rootstock of grafted tomato can tolerate RKN to a greater extent than that of the non-grafted tomato. This phenomenon suggested that grafting rootstock can effectively protect tomato roots from nematode infection. Furthermore, grafting methods have been widely applied to improve tomato yield (Kunwar *et al.*, 2015).

### Population dynamics of J2 in the RS during late sowing winter tomato growth

J2 was detected in the RS in all sampling time points during tomato growth in 2014-2016. The J2 population varied in different tomato varieties, experimental fields, and years of tomato growth.

In the field site in Taiping town, anthesis and fruit-set of Gaisi and Fallali occurred on November 29, 2014 (30 DAT), and December 4, 2014 (35 DAT) respectively. The number of J2 from the RS of Gaisi was remarkably different from that of Falali in 2014-2015, in contrary to the nRS difference. The number of J2s in the RS of Falali were higher ( $p \leq 0.05$ ) than

fueron de 354.3, 647.3 y 859.0 J2s por 100 cm<sup>-3</sup> de suelo, es decir, 11.0, 8.6 y 38.5 veces las de aquellos en el nRS de tomate injertado, respectivamente. La población de J2s muestreada de tomate no injertado fue notablemente más alta que aquellos muestreados de tomate injertado. Este resultado sugirió que injertar en este portainjertos podría suprimir la población de NAR y reducir su daño durante el periodo de crecimiento del tomate.

El NAR contó con tres generaciones, según lo presentado por la dinámica de J2 en la RS de tomates injertados y no injertados durante el crecimiento de tomate de siembra temprana. La primera (31 d), segunda (81 d) y tercera generación (28-42 d) se desarrollaron en la antesis, el cuajado y el tiempo de siembra tardía, respectivamente (Cuadro 1). Por lo tanto, algunas medidas (aplicaciones de nematicida) pueden adaptarse para el control de poblaciones de J2 en el campo en la hora pico de la población de J2, *i.e.* a los 31, 113, 142, y 155 DDT en tomate de siembra temprana. Una serie de productos nematicidas, tales como fluensulfona y fluopiram, presentan un buen potencial para el manejo de NAR sureño en habas (Jones *et al.*, 2017). La abamectina ha sido ampliamente usada para controlar la enfermedad de NAR en tomates (Qiao *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2015).

El peso promedio de los frutos de tomates injertados y no injertados fue de 0.1 y 0.1 kg por fruto y  $3.4 \pm 0.1$  y  $2.1 \pm 0.2$  kg por planta, respectivamente (Cuadro 2). Los rendimientos del tomate injertado fueron mayores ( $p \leq 0.05$ ) al del tomate no injertado ( $64083.7 \pm 62.8$  y  $14577.0 \pm 48.2$  kg ha<sup>-1</sup> respectivamente). El rendimiento del tomate injertado fue 4.4 mayor al del tomate no injertado, ya que el portainjerto del tomate injertado tiene una mayor tolerancia al NAR que el del tomate no injertado. Este fenómeno sugiere que los portainjertos con sus raíces pueden proteger de una infección por nematodos al injerto

**Table 2. Yield mean of grafted and non-grafted tomatoes.**  
**Cuadro 2. Rendimiento medio de tomates injertados y no injertados.**

| Treatments         | Single fruit weight (kg) | Fruit weight per plant (kg) | Yield (kg ha <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Grafted tomato     | 0.1±0.0 a                | 3.4±0.1 a                   | 64083.7 ± 62.8 a             |
| Non-grafted tomato | 0.1±0.0 b                | 2.1±0.2 b                   | 14577.0 ± 48.2 b             |

Means with different letter indicate statistical difference (Tukey test;  $p \leq 0.05$ ) ♦ Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey test;  $p \leq 0.05$ ).

those of Gaisi at 19, 46, and 87 DAT; but lower ( $p \leq 0.05$ ) at 60, 74, 101, 116, 129, and 143 DAT (Figure 3, 2014–2015). The number of J2s in the RS

de tomate de manera efectiva. Más aun, los métodos para injertar se aplican en forma amplia para mejorar el rendimiento del tomate (Kunwar *et al.*, 2015).

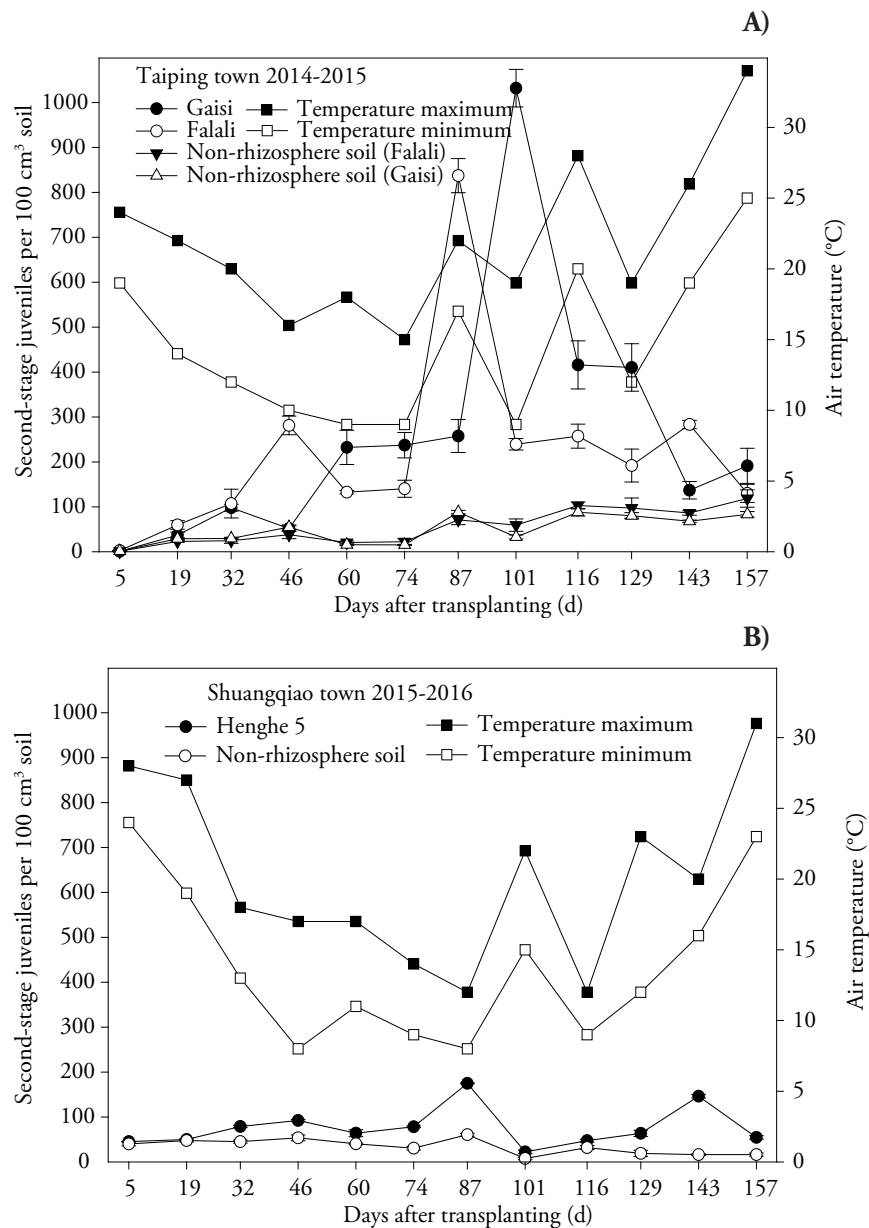


Figure 3. Dynamic changes of sampling day air temperature and second-stage juvenile populations in the rhizosphere soil during late sowing winter tomato growth in two localities and seasons Taiping 2014-2015 (A) and Shuangqiao 2015-2016 (B), Guangxi Province, China.

Figura 3. Cambios en la temperatura del aire en días de muestreo y dinámica poblacional de la 2<sup>a</sup> generación de juveniles (J2) en la rizósfera del suelo del cultivo de tomate invernal de siembra tardía en dos localidades y ciclos: Taiping 2014-2015 (A) y Shuangqiao 2015-2016 (B), provincia de Guangxi, China.

of Gaisi and Falali substantially differed from those in nRS. The number of J2s in the RS of Gaisi at 32, 60, 74, 87, 101, 116, 129, and 143 DAT and those of Falali at 19, 32, 46, 60, 74, 87, 101, 116, and 143 DAT were higher ( $p \leq 0.05$ ) than those of their correspondent nRS ( $p \leq 0.05$ ).

In the RS of Gaisi, the peak J2 populations at DAT 60 ( $T_{\text{Max}}$  18.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  9.0 °C), DAT 101 ( $T_{\text{Max}}$  19.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  9.0 °C), and DAT 157 ( $T_{\text{Max}}$  34.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  25.0 °C) were 232.3, 1032.0, and 191.3 J2s per 100 cm<sup>-3</sup> soil, which were 14.8, 31.3, and 2.3 times those in the nRS of Gaisi, respectively. The peak J2 populations in the RS of Falali at DAT 46 ( $T_{\text{Max}}$  16.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  10.0 °C), DAT 87 ( $T_{\text{Max}}$  22.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  17.0 °C), and DAT 143 ( $T_{\text{Max}}$  26.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  19.0 °C) were 281.3, 837.3, and 283.3 J2s per 100 cm<sup>-3</sup> soil, which were 7.4, 11.8, and 3.3 times those in the nRS of Falali, respectively.

At the field site in Shuangqiao town during the 2015-2016 growing season, anthesis and fruit-set of Henghe 5 occurred on December 3, 2015 (32 DAT), and December 9, 2015 (38 DAT) respectively. The J2 population in the RS of Henghe 5 was significantly higher than that in the nRS during tomato growth, except at 19-74 DAT ( $p \leq 0.05$ ; Figure 3, 2015-2016). The number of J2 in the RS of Henghe 5 that decreased at 5 DAT, increased at 74 DAT, peaked at DAT 46 ( $T_{\text{Max}}$  17.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  8.0 °C), DAT 87 ( $T_{\text{Max}}$  12.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  8.0 °C), and DAT 143 ( $T_{\text{Max}}$  20.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  16.0 °C) was 92.3, 175.0, and 146.3 J2s per 100 cm<sup>-3</sup> soil, which were 1.7, 2.9, and 9.0 times that in the nRS, respectively.

Temperature is one of the crucial factors that can affect the life cycle of RKN (Fernandez *et al.*, 2014). The life cycle of *M. incognita* is completed in tomato at average soil temperature between 16.2 °C and 30.0 °C (Ploeg and Maris, 1999). In our study, the average  $T_{\text{Max}}$  was higher than 16 °C during the tomato growing period. Thus, controlling the RKN was difficult in Nanning, China.

For early sowing tomato, the first generation required 31 d, and the second and third generation required 81 and 28-42 d, respectively. The second generation of early sowing tomato (81 d) was longer than that of the first and third generation during growing season because of the decreasing air temperature. The J2 population from the grafted tomato rhizosphere was bigger than that of non-grafted tomato during the tomato growing period.

## Dinámica de población de J2 en la RS durante el crecimiento de tomate invernal de siembra tardía

La 2ª generación de juveniles (J2) se detectó en la RS en todas las fechas de muestreo del cultivo de tomate en 2014-2016. La población J2 varió según el cultivar del tomate, el campo experimental y los años de crecimiento del tomate.

En el sitio de campo del pueblo de Taiping, ocurrió la anthesis y cuajado de Gaisi y Falali el 29 de noviembre de 2014 (30 DDT) y el 4 de diciembre de 2014 (35 DDT) respectivamente. El número de J2 del RS de Gaisi fue notablemente diferente al de Falali en 2014-2015, en oposición a la diferencia de nRS. El número de J2 en RS del cultivar Falali fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) que en Gaisi a los 19, 46 y 87 DDT, pero menor ( $p \leq 0.05$ ) a los 60, 74, 101, 116, 129 y 143 DDT (Figura 3, 2014-2015). El número de J2 en RS de Gaisi y Falali se diferenció sustancialmente de aquellos en nRS. El número de J2 en RS de Gaisi a 32, 60, 74, 87, 101, 116, 129 y 143 DDT y los de Falali a 19, 32, 46, 60, 74, 87, 101, 116 y 143 DDT fueron mayores ( $p \leq 0.05$ ) a los de su nRS correspondiente ( $p \leq 0.05$ ).

En la RS de Gaisi, las poblaciones pico de J2 a los 60 DDT ( $T_{\text{Max}}$  18.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  9.0 °C), 101 DDT ( $T_{\text{Max}}$  19.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  9.0 °C) y 157 DDT ( $T_{\text{Max}}$  34.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  25.0 °C) fueron de 232.3, 1032.0 y 191.3 J2s por 100 cm<sup>-3</sup> de suelo, 14.8, 31.3 y 2.3 veces mayor a las del nRS de Gaisi, respectivamente. Las poblaciones pico de J2 en el RS de Falali 46 DDT ( $T_{\text{Max}}$  16.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  10.0 °C), 87 DDT ( $T_{\text{Max}}$  22.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  17.0 °C) y 143 DDT ( $T_{\text{Max}}$  26.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  19.0 °C) fueron de 281.3, 837.3 y 283.3 J2s por 100 cm<sup>-3</sup> de suelo, 7.4, 11.8 y 3.3 veces mayor a la del nRS de Falali, respectivamente.

En el sitio de campo de Shuangqiao, durante la temporada de siembra de 2015-2016, la anthesis y el cuajado de Henghe 5 ocurrieron el 3 de diciembre de 2015 (32 DDT) y el 9 de diciembre de 2015 (38 DDT) respectivamente. La población de J2 en el RS de Henghe 5 fue significativamente mayor a aquella en nRS durante el crecimiento del tomate, excepto a 19-74 DDT ( $p \leq 0.05$ ; Figura 3, 2015-2016). El número de J2 en el RS de Henghe 5 que se redujo a los 5 DDT, aumentó a los 74 DDT y alcanzó un pico a los 46 DDT ( $T_{\text{Max}}$  17.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  8.0 °C), 87 DDT ( $T_{\text{Max}}$  12.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  8.0 °C), y 143 DDT ( $T_{\text{Max}}$  20.0 °C,  $T_{\text{Min}}$  16.0 °C) fue de 92.3, 175.0, y 146.3

In addition, grafted tomato had higher production than that of non-grafted tomato, suggested that the stock (rootstock cultivar, Japanese super rootstock F1, Tailiang Germchit Co., Ltd.) has stronger roots system and is tolerant to the nematode.

For the late sowing tomato, the first generation required 46-60 d, and the second and the third generation required 40 and 55 d, respectively. The growing period of Gaisi, Falali, and Henghe 5 is similar. The anthesis of Gaisi and Falali initially appeared at 30 DAT and then entered anthesis period, whereas the anthesis of Henghe 5 initially appeared 2 d later than Gaisi and Falali. Gaisi, Falali, and Henghe 5 fruit set occurred at 5, 5, and 6 d after blossoming, respectively.

The fruit ripening of Gaisi, Falali, and Henghe 5 started from 116 DAT. The RKN populations of Gaisi, Falali, and Henghe 5 peaked at the same time approximately, that is, the first and second generation, during the fruit set period; and the third generation, during the harvesting time. Thus, the RKN had three generations, as revealed by the J2 dynamics in the RS of Gaisi, Falali, and Henghe 5 during tomato growth.

The nematode population of the third generation at Gaisi, Falali and Henghe 5, decreased with the increase of air temperature due to tomato roots becoming old with less feeding sites for J2s. Several nematicides, such as fluensulfone, fluopyram, and abamectin (Ullah *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2017) can be adopted to control J2 population in the fields on the J2 population peak times, at 46, 60, 87, 101, 143, and 157 DAT of late sowing tomato.

## CONCLUSIONS

During winter tomato growing season, root-knot nematodes populations in rhizosphere soil of tomatoes had three peaks, and there was no difference, in rhizosphere soil root-knot nematodes populations, between early and late sowing tomatoes. The nematode populations of rhizosphere soil were consistently higher than those of non-rhizosphere soil, in both early and late sowing cultivars. The yield of grafted tomato was 4.4 times higher than that of non-grafted tomato. Root-knot nematodes completed three generations on winter tomato growing under subtropical monsoon climate in Nanning, China.

J2s por 100 cm<sup>3</sup> de suelo, que fueron 1.7, 2.9 y 9.0 veces mayor a la del nRS, respectivamente.

La temperatura es uno de los factores cruciales que puede afectar el ciclo de vida del NAR (Fernandez *et al.*, 2014). El ciclo de vida de *M. incognita* se complete en el tomate a una temperatura del suelo promedio de entre 16.2 °C y 30.0 °C (Ploeg y Maris, 1999). En este estudio, la T<sub>max</sub> promedio fue mayor a 16 °C durante el periodo de crecimiento del tomate. Por ello, resulta difícil controlar el NAR en Nanning, China.

Para el tomate de siembra temprana, la primera generación requirió de 31 d, mientras que la segunda y tercera requirieron de 81 y 28-42 d, respectivamente. La segunda generación de tomate de siembra temprana (81 d) fue más larga que la primera y tercera durante la temporada de siembra, debido a la reducción en la temperatura del aire. La población J2 de la rizosfera de tomate injertado fue mayor a la del tomate no injertado durante el periodo de siembra de tomate. Además, el tomate injertado tuvo una mayor producción que el tomate no injertado, esto sugiere que el portainjerto (cultivar de portainjerto, super portainjerto japonés F1, Tailiang Germchit Co., Ltd.) tiene un sistema radical más fuerte y es tolerante al nematodo.

Para el tomate de siembra tardía, la primera generación requirió de 46-60 d, mientras que la segunda y tercera requirieron de 40 y 55 d, respectivamente. El periodo de crecimiento de Gaisi, Falali, y Henghe 5 es similar. La anthesis de Gaisi y Falali aparecieron, inicialmente, a los 30 DDT y luego entraron al periodo de anthesis, mientras que la anthesis de Henghe 5 inicialmente apareció 2 d después de Gaisi y Falali. Las frutas de Gaisi, Falali y Henghe 5 emergieron 5, 5 y 6 d después del brote, respectivamente.

La maduración de las frutas de Gaisi, Falali y Henghe 5 comenzaron a partir de los 116 DDT. Las poblaciones de NNR de Gaisi, Falali y Henghe 5 alcanzaron sus picos aproximadamente al mismo tiempo, es decir, las generaciones primera y segunda, durante el periodo de cuajado, y la tercera generación, durante el tiempo de cosecha. Por ello el NNR tuvo tres generaciones, según lo revelado por la dinámica de J2 en el RS de Gaisi, Falali y Henghe 5 durante el crecimiento del tomate.

La población de nematodos de la tercera generación en Gaisi, Falali y Henghe 5 se redujo con el aumento de la temperatura del aire, debido a que las

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by National industrial system Guangxi Innovation Team (nycytxgxcxd-10-04), the National Natural Science Foundation of China (31660511, 31460464). EssayStar (<http://essaystar.com>) reviewed and edited first draft of this manuscript to English.

## LITERATURE CITED

- Coyne, D. L., A. Plowright, J. Twumasi, and D. J. Hunt. 1999. Prevalence of plant parasitic nematodes associated with rice in Ghana with a discussion of their importance. *Nematology*. 1: 399–405.
- Fernandez, L., M. T. N. Cabasan, and D. De Waele. 2014. Life cycle of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* at different temperatures under non-flooded and flooded conditions. *Arch. Phytopath. Plant Prot.* 47: 1042–1049.
- Giné, A., M. López-Gómez, M. D. Vela, C. Ornat, M. Talavera, S. Verdejo-Lucas, and F. J. Sorribas. 2014. Thermal requirements and population dynamics of root-knot nematodes on cucumber and yield losses under protected cultivation. *Plant Pathol.* 63: 1446–1453.
- Heve, W. K., T. H. Been, C. H. Schomaker, and M. G. Teklu. 2015. Damage thresholds and population dynamics of *Meloidogyne chitwoodi* on carrot (*Daucus carota*) at different seed densities. *Nematology*. 17: 501–514.
- Jones, J. G., N. M. Kleczewski, J. Desaegeer, S. L. F. Meyer, and G. C. Johnson. 2017. Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in lima bean. *Crop Prot.* 96: 151–157.
- Karajeh, M., and O. Mohawesh. 2016. Root-Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) - Deficit irrigation interactions on eggplant cropped under open field conditions. *J. Hortic. Res.* 24: 73–78.
- Kayani, M. Z., T. Mukhtar, and M. A. Hussain. 2017. Effects of southern root knot nematode population densities and plant age on growth and yield parameters of cucumber. *Crop Prot.* 92: 207–212.
- Kunwar, S., M. L. Paret, S. M. Olson, L. Ritchie, J. R. Rich, J. Freeman, and T. McAvoy. 2015. Grafting using rootstocks with resistance to *Ralstonia solanacearum* against *Meloidogyne incognita* in tomato production. *Plant Dis.* 99: 119–124.
- Liu, J., J. Sun, J. Qiu, X. Liu, and M. Xiang. 2014. Integrated management of root-knot nematodes on tomato in glasshouse production using nematicides and a biocontrol agent, and their effect on soil microbial communities. *Nematology*. 16: 463–473.
- Ma, Y., Y. Li, H. Lai, Q. Guo, and Q. Xue. 2017. Effects of two strains of *Streptomyces* on root-zone microbes and nematodes for biocontrol of root-knot nematode disease in tomato. *Appl. Soil Ecol.* 112: 34–41.
- Maqsood, A., H. Wu, M. Kamran, H. Altaf, A. Mustafa, S. Ahmar, N. T. T. Hong, K. Tariq, Q. He, and J. T. Chen. 2020. Variations in growth, physiology, and antioxidative defense responses of two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars after co-infection of *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita*. *Agronomy*. 10: 159; doi:10.3390/agronomy10020159.

raíces de los tomates se avejentaban con menos sitios de alimentación de los J2. Varios nematicidas, tales como fluensulfona, fluopiram y abamectina (Ullah *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2017) pueden ser usados para controlar a la población de J2 en momentos pico, a los 46, 60, 87, 101, 143 y 157 DDT del tomate de siembra tardía.

## CONCLUSIONES

Durante la temporada del crecimiento del tomate invernial, las poblaciones de nematodos agalladores de la raíz en la rizósfera del suelo del cultivo de tomate presentaron tres puntos de crecimiento máximo, y no hubo diferencia entre las poblaciones del nematodo agallador de la raíz en la rizósfera del suelo de los tomates de siembra temprana y tardía.

La población de nematodos en la rizosfera del suelo fue consistentemente mayor que la del suelo sin rizosfera, tanto en los cultivares de siembra temprana como tardía.

El rendimiento de tomate injertado fue 4.4 veces mayor que el del tomate no injertado. Los nematodos agalladores de la raíz completaron tres generaciones en cultivo de tomate invernial bajo un clima subtropical de monzón en Nanning, China.

—Fin de la versión en Español—



- Moosavi, M. R. 2015. Damage of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* to bell pepper, *Capsicum annuum*. *J. Plant Dis. Protect.* 122: 244–249.
- Morris, K. S., F. G. Horgan, M. J. Downes, and C. T. Griffin. 2011. The effect of temperature on hatch and activity of second-stage juveniles of the root-knot nematode, *Meloidogyne minor*, an emerging pest in north-west Europe. *Nematology*. 13: 985–993.
- Ploeg, A. T., and P. C. Maris. 1999. Effects of temperature on the duration of the life cycle of a *Meloidogyne incognita* population. *Nematology*. 1: 389–393.
- Poudyal, D. S., R. R. Pokharel, S. M. Shrestha, and G. B. Khatri-Chetria. 2005. Effect of inoculum density of rice root knot nematode on growth of rice cv. Masuli and nematode development. *Austral. Plant Path.* 34: 181–185.
- Qiao, K., L. Jiang, H. Wang, X. Ji, and K. Wang. 2010. Evaluation of 1,3-dichloropropene as a methyl bromide alternative in tomato crops in China. *J. Agr. Food Chem.* 58: 11395–11399.

- Qiao, K., X. Liu, H. Wang, X. Xia, X. Ji, and K. Wang. 2012. Effect of abamectin on root-knot nematodes and tomato yield. *Pest Manage. Sci.* 68: 853–857.
- Seid, A., C. Fininsa, T. Mekete, W. Decraemer, and W. M. Wesemael. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)-a century-old battle. *Nematology*. 17: 995–1009.
- Simon, S., K. P. Singh, and G. Ghosh. 2011. Distribution of root-knot nematode on major field crops in Uttar Pradesh (India). *Arch. Phytopath. Plant Prot.* 44: 191–197.
- Stirling, G. R., D. Griffin, K. Ophel-Keller, A. McKay, D. Hartley, J. Currar, A. M. Stirling, C. Monsour, J. Winch, and B. Hardie. 2004. Combining an initial risk assessment process with DNA assays to improve prediction of soilborne diseases caused by root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the Queensland tomato industry. *Austral. Plant Path.* 33: 285–293.
- Ullah, Z., N. Javed, S. A. Khan, I. UI Haq, and Q. Shakeel. 2015. Efficacy of Biopesticides for management of root knot nematode on tomato. *Int. J. Veget. Sci.* 21: 215–222.
- Win, P. P., P. P. Kyi, Z. T. Z. Maung, and D. D. Waele. 2013. Population dynamics of *Meloidogyne graminicola* and *Hirschmanniella oryzae* in a double rice-cropping sequence in the lowlands of Myanmar. *Nematology*. 15: 795–807.
- Zheng, G. D., L. B. Shi, H. Y. Wu, and D. L. Peng. 2012. Nematode communities in continuous tomato-cropping field soil infested by root-knot nematodes. *Acta. Agr. Scand. B-S. P.* 62: 216–223.

