



Acta Agronómica

Vol 68 (4)

octubre - diciembre 2019 / october - december 2019

ISSN 0120 - 2812

e-ISSN 2323-0118



68-4

*Sede
Palmira*



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Comité Editorial / Editorial Board

Arnulfo Gómez Carabali

Editor Jefe / in Chief

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
agomezcar@unal.edu.co

America Josefina Quintero Chacón

Universidad Nacional del Táchira, Venezuela
americajquintero@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0001-9377-7086>

Arcangelo Loss

Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil
arcangelo.loss@ufsc.br
<http://orcid.org/0000-0002-3005-6158>

Felipe Rafael Garcés Fiallos

Universidad de Guayaquil, Ecuador
felipegarces23@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0002-1795-4439>

Francisco Cruz Sosa

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México
cuhp@xanum.uam.mx
<http://orcid.org/0000-0002-7127-7264>

Gisella S. Cruz García

Oxfam Novib, La Haya, Países Bajos
gisella.cruzgarcia@oxfamnovib.nl
<http://orcid.org/0000-0002-2699-3157>

Juan Humberto Avellaneda Cevallos

Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador
juan.avellaneda@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1805-4803>

Javier Antonio Benavides Montano

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
abenavidesm@unal.edu.co
<http://orcid.org/0000-0003-3247-5994>

Joel Tupac Otero Ospina

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
jtoteroo@unal.edu.co
<http://orcid.org/0000-0002-0810-183X>

John Ocampo

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
jaocampop@unal.edu.co
<http://orcid.org/0000-0002-2720-7824>

José Luis Chávez Servia

Instituto Politécnico Nacional, México
jchavez@ipn.mx
<http://orcid.org/0000-0002-8816-4127>

Luis Carlos Martínez

Universidad Federal de Viçosa-MG, Brasil
lc.martinez@outlook.com
<http://orcid.org/0000-0001-7741-2984>

Luis Fernández Portillo

Universidad de Loyola, Andalucía, España
portillo@uloyola.es
<http://orcid.org/0000-0001-7152-5267>

Maia Fradkin

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de Argentina, Argentina
maiafradkin@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1575-7634>

María Aurora Londoño Avendaño

Universidad de Valle - Santiago de Cali, Colombia
maria.avendano@correounivalle.edu.co

María del Mar Delgado Serrano

Universidad de Córdoba Escuela T.S. de Ingeniería Agronómica y Montes, España
mmdelgado@uco.es
<http://orcid.org/0000-0003-0171-6079>

María Fernanda Quintero Castellanos

Universidad autónoma de san Luis Potosí, México
mfquinteroc@unal.edu.co
<http://orcid.org/0000-0002-9130-0679>

Marinaldo Divino Ribeiro

Universidad Autónoma de Barcelona, CREA, Brasil
fgojedac@unal.edu.co

Mercedes del Río Celestino

Instituto de Investigación y Formación Agraria y pesquera (IFAPA), España
mercedes.rio.celestino@juntadeandalucia.es
<http://orcid.org/0000-0001-9130-2669>

Patrick Lavelle

Universidade Federal de Viçosa-MG, Brasil
plavelle48@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-2127-1067>

Pedro Mercado Ruaro

Instituto de Biología, UNAM, México
mruaro@ib.unam.mx

Ramón Diez Matallana

Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú
rdiez@lamolina.edu.pe
<http://orcid.org/0000-0001-8247-1452>

Sérgio Ruffo Roberto

Universidade Estadual de Londrina, Brasil
sroberto@uel.br
<http://orcid.org/0000-0003-2357-187X>

Silvia López Ortíz

Colegio de Posgraduados, Campus Veracruz, México
silvialopez@colpos.mx
<http://orcid.org/0000-0002-5202-3365>

Código QR sitio web



Comité Científico / Scientific Committee

Juan Pablo Martínez Dávila

COLPOS, Colegio de Posgraduados, Veracruz, Estado de Veracruz, México.
jpmartin@colpos.mx

Julián Ramírez Villegas

Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira, Valle del Cauca, Colombia
j.r.villegas@cgiar.org
<http://orcid.org/0000-0002-8044-583X>

Félix Hernández Hernández

Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) Universitat Jaume I Castellón, España
hernandf@uji.es
<http://orcid.org/0000-0003-1268-3083>

Charlotte Poschenrieder Wiens

Universidad Autónoma de Barcelona, España.
charlotte.poschenrieder@uab.cat

Pablo Rafael Speranza Gastaldi

Universidad Nacional Autónoma de México, México.
mruaro@ib.unam.mx
<http://orcid.org/0000-0003-3457-0151>

Daniel Debouck

Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, Palmira-Valle, Colombia
d.debouck@cgiar.org

Margarida L R Aguiar-Perecin

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". (ESALQ)/Universidade de São Paulo, Brasil
mlrapere@usp.br

Paulo Roberto Da Silva

Universidade Estadual do Centro-Oeste, Brasil
prsilva@unicentro.br

Andrea Liliana Clavijo McCormick

Max Planck Institute for Chemical Ecology, Germany. University Ökologie. Zürich, Schweiz
andrea.clavijo@usys.ethz.ch

Gisella Susana Cruz García

CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira, Valle del Cauca, Colombia
g.s.cruz@cgiar.org

Idupulapati M. Rao

Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira, Valle del Cauca, Colombia
i.rao@cgiar.org
<http://orcid.org/0000-0002-8381-9358>

Mercedes del Rio Celestino

Instituto de Investigación y Formación Agraria y pesquera (IFAPA). La Mojonera, Almería-España
mercedes.rio.celestino@juntadeandalucia.es
<http://orcid.org/0000-0001-9130-2669>

Marcelo Guerra

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
mguerra@ufpe.br
<http://orcid.org/0000-0003-1438-9742>

Código QR sitio web



Misión / Mission

Revista Acta Agronómica

Misión: Misión: La revista Acta Agronómica, editada trimestralmente por la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, publica artículos científicos en español e inglés, de trabajos en los ámbitos de las Ciencias Agrarias y del Desarrollo Rural Sostenible, de autores afiliados a organizaciones educativas e investigativas de Colombia, de las naciones de la Comunidad Andina, de América Latina, del Caribe y de Iberoamérica. Los artículos de revisión se escriben a solicitud del Comité Editorial de la revista. Las opiniones son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Envío de documentos y correspondencia: actaagronomica_pal@unal.edu.co

Redacción de manuscritos: En esta edición se publica la Guía Abreviada para la redacción de manuscritos. Al documento "Instrucciones a los Autores" se puede acceder en el sitio web: www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica

Reproducción de artículos: Se autoriza la fotocopia de artículos para fines académicos citando la fuente.

Acceso en línea: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica

Indexada: ISI (Web of Science), SCOPUS, SciELO, Redalyc, Qualis (CAPES), Dialnet, DOAJ (Directory of Open Journal Access), e-Revistas, Publindex (Colciencias), entre otros. | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 / Impresión: Image Impresores, Colombia, 100 ejemplares, Julio de 2015

Acta Agronómica Journal

Mission: Mission: Acta Agronomica Journal, edited quarterly by National University of Colombia, campus Palmira, publishes scientific papers in Spanish and English, in Agricultural Sciences, Agroindustry, Environment and related areas, resulting of research of authors associated to education and research institutions from different countries. Reviews are written and published by the journal Editorial Board or editor in chief invitation. Opinions are of exclusive responsibility of the authors.

Documents and correspondence can be send to: actaagronomica_pal@unal.edu.co.

Document preparation: an abbreviated guide is published in this edition. To access Authors Instructions complete guide, go to the website www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica

Article reproduction or copy: Copies with academic aims are authorized with source citation.

On line access: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica.

Indexed in: ISI (Web of Science), SCOPUS, SciELO, Redalyc, Qualis (CAPES), Dialnet, DOAJ (Directory of Open Journal Access), e-Revistas, Publindex (Colciencias), among others. | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 / Printed 100 copies by Image Impresores, Cali, Colombia, July 2015.

Revista Acta Agronómica

Missao: a revista Acta Agronómica, editada trimestralmente pela Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, publica artigos científicos resultados de pesquisas em Castelhana e Inglês, nos âmbitos das Ciências Agrárias, Agroindustriais, Ambientais e outras áreas afins, de autores associados a entidades de educação e de pesquisa de países em geral. Os artigos de revisão são escritos por solicitação do Comitê Editorial ou do(a) editor (a) chefe da revista. As opiniões são de exclusiva responsabilidade dos autores.

Documentos e correspondências: actaagronomica_pal@unal.edu.co.

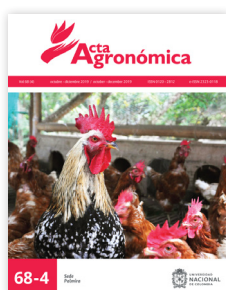
Preparação de documentos: Nesta edição, ou no site web www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica se pode acessar o guia abreviado para a redação dos documentos, "Instruções para os Autores", e as instruções do OJS (Open Journal System).

Produção ou cópias: Estão autorizadas fotocópias dos artigos para fins acadêmicos, citando a fonte. A aceitação de publicidade não implica aprovação nem o respaldo dos respectivos produtos ou serviços por Acta Agronómica, nem pela Universidad Nacional de Colombia.

Acesso em linha: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica.

Indexada em: ISI (Web of Science), SCOPUS, SciELO, Redalyc, Qualis (CAPES), Dialnet, DOAJ (Directory of Open Journal Access), E-Revistas, Publindex (Colciencias), entre outros. | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 / Impressos 100 exemplares por Image Impresores, Cali, Colombia, julho de 2015.

Comité Técnico / Technical Board



Coordinadora editorial
Corrección de estilo:
Supervisión:
Diseño y diagramación:
Administrador web:

Selene Alarcón Vasquez
Juan Alberto Ramírez Pérez
Arnulfo Gómez Carabalí
Alexander Pereira Mosquera
José Ranieri Correa Cárdenas

Créditos fotografía:
Nota:

Alexander Pereira Mosquera, Diseñador Industrial y Fotógrafo.
Fotografía de cría de pollo campesino, Imagen tomada en la Granja Agroecológica El Mirador, Vereda Pomares, Santarosa de Tapias, Sonso, Guacarí (Valle del Cauca)
D.I. Alexander Pereira Mosquera / apereiram@gmail.com

Diseño de portada:

Guía abreviada para preparación de documentos / Brief guide for document preparation

Guía abreviada para preparación de documentos

Tipos y características de los documentos: Los trabajos sometidos a publicación no podrán someterse a otra revista mientras dure el proceso de revisión. Los errores de ortografía y la omisión de normas de presentación de documentos según la política editorial de Acta Agronómica son causales de rechazo.

Artículo científico: Presenta los resultados de investigación científica basada en hipótesis teórica o experimental, que signifique un aporte original al conocimiento. Relata la manera de delimitar la pregunta de investigación, el camino para someterla a prueba (análisis estadístico del experimento, protocolos disciplinarios) y la confrontación de los datos generados con la literatura actual. El rango aceptable para la configuración del documento es de 3500 hasta de 5000 palabras y hasta 20 referencias bibliográficas, incluyendo títulos (en el idioma original y en inglés), resumen (hasta 250 palabras), palabras clave, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión y referencias bibliográficas.

Artículo de revisión: Será enviado a la revista únicamente por invitación directa del comité editorial o editora jefe de Acta Agronómica. Contiene el resultado de trayectorias dedicadas a la investigación o temas de frontera en las áreas de interés de la revista. Los límites máximos del documento son 10.000 palabras y hasta 80 referencias bibliográficas, incluyendo título (idioma original e inglés), resumen, abstract, introducción, capítulos, subcapítulos y referencias bibliográficas.

Preparación y formato del documento:

- Software Microsoft Office Word (Documento de Word 97-2003). Fuente Bookman Old Style, 14 para títulos, 12 para texto.
- Ajuste del documento al tamaño de papel carta (21.5 x 27.9 cm) y márgenes de 2.5 cm.
- Digite a doble espacio a través de todo el texto (incluyendo tablas y figuras).
- Palabras claves y key words deben ir ordenadas alfabéticamente. No repetir palabras del título.
- Únicamente usar la designación de Tabla y Figura (2000 x 1200 px, resolución 300 dpi, formato jpg, png)
- Los agradecimientos son opcionales y pueden contener máximo 30 palabras
- Para las referencias bibliográficas usar el estilo de la *American Psychological Association* (APA). No utilizar referencias como tesis, folletos, cartillas, resúmenes de congresos o eventos científicos.
- La revista adopta el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Envío de documentos: El envío de documentos es responsabilidad del autor para correspondencia y se realiza exclusivamente a través de la plataforma *Open Journal System*, página web de Ac Ag, http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica.

Brief guide for document preparation

Types and characteristics of documents: The papers submitted to publication may not submit to another journal while the review process. Spelling errors and omission of document presentation rules according to the Acta Agronomica editorial policy are grounds of non- acceptance.

Scientific article: Presents the results of science research based in theoretical or experimental hypothesis that means an original contribution to knowledge. Describe the way to delimit the research question, the road to carry out the evaluation (the experiment statistical analysis, disciplinary protocols) and the data confrontation generated with the current literature. The configuration document acceptable range is from 3500 words to 5000 words and until twenty (20) bibliographic references, including titles (in original language and English title), abstract (250 words), key words, introduction, materials and methods, results and discussion and bibliographic references.

Review article: Will be submit to the journal only by direct invitation of the Acta Agronomica editorial board or chief editor. Contains the result of the dedicated paths to the research or border issues in the areas of interest of the journal. The maximum limits of the document are 10.000 words and 80 bibliographic references including title (original language and English title), abstract, key words introduction, chapters, bychapters and bibliographic references.

Document preparation and format:

- Software Microsoft Office Word (Word document 97-2003). Bookman Old Style, 14 for titles, 12 for text.
- Set document to letter size paper (21.5 x 27.9 cm) and 2.5 cm margins.
- Type double-spaced throughout the text (including tables and figures).
- Key words must be order alphabetically, do not repeat any title words.
- Use Table and Figure designation (2000 to 1200 px, resolution 300 dpi, format jpg, png).
- Acknowledgments are optional and can contain up to 30 words.
- For the bibliographic references, use the American Psychological Association (APA) style. No use references as thesis, pamphlets, brochures, summary congress and scientific events.
- The journal adopts the International System of Units (IS).

Article submission: Document submit is responsibility of the corresponding author and it is performed exclusively through the Open Journal System platform. Ac Ag website: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica.

Contenido / Content

Pag.

Dinámica de nitrógeno del suelo en agroecosistemas bajo el efecto de abonos verdes Nitrogen dynamics of soil in agroecosystems under the effect of green fertilizers <i>Breno Augusto Sosa Rodríguez, Marina Sánchez de Prager, Yuly Samanta García Vivas, Marden Daniel Espinoza Guardiola, Jesus Alexis Rodríguez, Glauco Miguel Sosa Rodríguez</i>	257
Efecto de enmiendas agrícolas en las reservas de carbono y nitrógeno en Oxisoles de la Amazonía del Brasil Effect of agricultural correctives in the stocks of carbon and nitrogen of Oxisol in the Brazilian Amazon <i>José Augusto Amorim Silva do Sacramento, Paulo Henrique da Silva Gomes, Carlos Alberto Costa Veloso, Arystides Resende Silva, Edilândia Farias Dantas, Juan Daniel Villacis Fajardo</i>	265
Características morfológicas de variedades de café cultivadas en condiciones de sombra Morphological characteristics of coffee varieties grown in shade conditions <i>Manuel Emilio Milla Pino; Segundo Manuel Oliva Cruz, Santos Triunfo Leiva Espinoza, Roicer Collazos Silva, Oscar Andrés Gamarra Torres, Miguel Ángel Barrena Gurbillón, Jorge Luis Maicelo Quintana</i>	271
Efecto de hongos formadores de micorrizas arbusculares en clones de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad Caturra Effect of arbuscular mycorrhizae in clones of <i>Coffea arabica</i> , Caturra variety <i>Geomar Vallejos-Torres, Tito Sánchez, Marco A. García, Marcial Trigos y Luis A. Arévalo</i>	278
Induction of resistance and chemical management of mildew and Asian rust in soybean cultivation Inducción de resistencia y manejo químico del mildew y la roya asiática en el cultivo de soja <i>Daniel Claudio Grigolo, Jean Carlo Possenti, Sergio Miguel Mazaro, Marcieli da Silva, Karina Guollo</i>	285
Nutritional contents in <i>Myrciaria dubia</i> plants in function of in Potassium doses applied through fertigation Contenido de nutrientes en plantas de <i>Myrciaria dubia</i> en función de dosis de potasio aplicadas por fertirrigación <i>Carlos Abanto-Rodríguez, Edvan Alves Chagas, Wellington Farias Araújo, Matheus Gonçalves Paulichi, João Vitor Garcia de Lima, Eduardo Medeiros de Oliveira, João Luiz Lopes Monteiro Neto, Sonicley da Silva Maia, José Sanchez-Choy, Nadia Masaya Panduro Tenazona</i>	291
Genome size and ploidy variations in pearl millet (<i>Pennisetum glaucum</i>) and napier grass (<i>Pennisetum purpureum</i>) genotypes Tamaño de genoma y variaciones de ploidía en genotipos de <i>Pennisetum glaucum</i> y <i>Pennisetum purpureum</i> <i>David Adedayo Animasaun, Joseph Akintade Morakinyo, Oba Toyin Mustapha and Rama Krishnamurthy</i>	299
Pre-treatments effect on the tetrazolium test on <i>Epidendrum barbaricum</i> Hágsater & Dodson seeds Efecto de pretatamientos en la prueba de tetrazolio en semillas de <i>Epidendrum barbaricum</i> Hágsater & Dodson <i>Seir Antonio Salazar Mercado, Edison Alexander Botello Delgado, Jesús David Quintero Caleño</i>	306
Effect of <i>Mentha spicata</i> L. infusión on the productive performance and organoleptic characteristics of Cobb 500 broilers Efecto de la infusión de <i>Mentha spicata</i> L. en el rendimiento y las características organolépticas de canales de pollos de engorde Cobb 500 <i>Angel Roberto Sánchez Quinche, Julia Cristina Solórzano Saldarriaga, José Nicasio Quevedo Guerrero, José Roberto Paladines Romero, Ion Pérez Baena</i>	312
Detección molecular de begomovirus en arvenses asociadas al cultivo de tomate en Panamá Molecular detection of begomovirus in weeds associated with tomato crops in Panama <i>Yatzari L. Ortiz Sánchez, Orlando O. Osorio Burgos, Maira E. Díaz Vergara</i>	319

Código QR sitio web



Dinámica de nitrógeno del suelo en agroecosistemas bajo el efecto de abonos verdes

Nitrogen dynamics of soil in agroecosystems under the effect of green fertilizers

Breno Augusto Sosa Rodríguez^{1*}, Marina Sánchez de Prager², Yuly Samanta García Vivas¹, Marden Daniel Espinoza Guardiola¹, Jesus Alexis Rodríguez¹, Glauco Miguel Sosa Rodríguez³

1. Departamento de Suelos, Centro Universitario Regional del Litoral Atlántico, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, La Ceiba, Atlántida, Honduras. 2. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Valle del Cauca, Colombia. 3. Departamento de Producción Vegetal, Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho, Honduras. *Autor para correspondencia: breno.sosa@unah.edu.hn

Rec: 2018-04-30 Acep: 2019-04-05

Resumen

Los abonos verdes (AV) son frecuentemente utilizados en agroecosistemas para mejorar y/o restaurar la fertilidad del suelo. El objetivo de este estudio fue evaluar la dinámica de nitrógeno (N) y carbono (C) del suelo en sistemas de maíz y soya bajo el efecto de AV residuales. En un Vertisol Typic Haplustert ubicado en el Valle del Cauca-Colombia se estableció la asociación *Mucuna pruriens* var. *utilis* – maíz (*Zea mays*), la cual 90 días después de la siembra fue incorporada al suelo como AV o se dispuso sobre la superficie del suelo como acolchado orgánico (AO). Posteriormente fueron sembrados los cultivos maíz-soya en forma intercalada para formar 11 tratamientos bajo el diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial $3^2 + 2$ y tres repeticiones. Las parcelas principales fueron AV, AO y barbecho (B). Las subparcelas correspondieron a la fertilización con compost, fertilizante de síntesis química industrial y cero fertilización (testigo). En forma paralela fueron sembrados como referentes los monocultivos de maíz y soya manejados de forma tradicional. En las etapa de floración y llenado de grano de los cultivos se midieron como variables en suelo: N total, amonio, nitrato, N-inorgánico total, carbono orgánico; y en tejido vegetal de maíz y soya: carbono y N. Los resultados mostraron que, la aplicación de materiales orgánicos de alta calidad, AV/AO, estimularon la mineralización del C y la dinámica de las diferentes fracciones de N en el suelo, sin cambios significativos en el contenido de estos elementos en el tejido vegetal del cultivo de maíz y soya.

Palabras clave: Maíz; soya; prácticas agroecológicas; nitrógeno; relaciones planta-suelo.

Abstract

The green fertilizers (AV) are implemented in agroecosystems to improve and/or restore soil fertility. The objective was to evaluate the nitrogen (N) dynamics of soil in maize and soybean systems under the effect of AV. In a Typic Haplustert located in Valle del Cauca-Colombia, the association *Mucuna pruriens* var. *utilis* - corn and, 90 days after sowing, the residues were incorporated as AV or placed on the soil surface as organic mulch (AO). The corn-soybean crops were then planted in an intercalated form and 11 treatments were formulated under the randomized complete block design with a factorial arrangement of $3^2 + 2$ with three replications. The main parcels constituted AV, AO and fallow (B). The subplots corresponded to compost fertilization, industrial chemical synthesis fertilizer and no addition. At the same time, corn and soy monocultures managed in a conventional manner were planted as research references. In the stage of flowering and grain filling of the crops, some variables were analyzed, related to the soil: total N, ammonium, nitrate, total inorganic N, organic carbon; in vegetable tissue of corn and soybean: carbon and N. The results indicated that the addition of high quality organic materials, AV/AO, stimulated the mineralization of the C and dynamics of the different fractions of N in the soil, without significant changes in the content of these elements in the plant tissue of the corn and soybean crop.

Keywords: Corn; Soy; Agroecological Practices; Nitrogen; Plant-soil relationships.

Introducción

El nitrógeno (N) es el nutriente más importante para la producción de cultivos, no obstante su disponibilidad en el suelo en muchas ocasiones es limitante para las reacciones bioquímicas y fisiológicas necesarias en el crecimiento, desarrollo y producción de las plantas (Rao, 2009). En cultivos como maíz (*Zea mays* L.) el N es un elemento básico y su participación en los costos de producción es variable entre 15 y 30% (FENALCE, 2011). En 2016, en Colombia se importaron 1,752,803 t de soya y 4,562,348 t de maíz, lo que representa más de 60% de la demanda anual para satisfacer la seguridad alimentaria en los diversos sectores agrícolas y sociales (FENALCE, 2017).

Las principales fuentes de N para cultivos son la mineralización del N orgánico en el suelo y su adición de formas sintéticas y orgánicas. Gran parte del suministro del N total (95%) es debido a la presencia y mineralización de la materia orgánica del suelo (MOS) (Philippot y Germon, 2005). La mayor cantidad de N orgánico se encuentra en las primeras capas del suelo. Cuando se agregan volúmenes importantes de materiales orgánicos, la mineralización provee de 0.5 a 2 kg/ha por día, lo que equivale a 20-80% de los requerimientos por las plantas, dependiendo del tipo de cultivo y las condiciones del suelo (Broadbent, 1984).

Según los datos de la FAO (FAO, 2015) en 2018 a nivel mundial se utilizarán 200 millones de toneladas de fertilizantes de síntesis, la mayor parte como fuentes nitrogenadas, lo cual tiene relevancia al aportar aproximadamente 100 millones de toneladas de N por año en los diferentes agroecosistemas (IFA, 2005), no obstante la eficiencia de éstas no supera el 33% (Glass, 2003). Esta baja eficiencia de N es causada por prácticas agronómicas como la fertilización excesiva, compactación del suelo y riego por gravedad, que favorecen las pérdidas de este nutriente por erosión, lixiviación y volatilización.

La recuperación o conservación de la fertilidad de los suelos cultivados es una práctica necesaria para garantizar la seguridad alimentaria. Una de las tecnologías aplicadas en estos procesos es el establecimiento de cultivos como maíz y soya que son incorporados en forma de barbecho (B) en poscosecha; otra alternativa es la siembra e incorporación de *Mucuna pruriens* L. como abono verde (AV) o dispuesto sobre el suelo como acolchado orgánico (AO), prácticas utilizadas en asociación o en rotación que aportan material vegetal in situ para mantener, mejorar o restaurar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Zribi et al., 2011).

Estos materiales aumentan la eficiencia en el uso de N mediante relaciones simbióticas como la fijación biológica (FBN) en leguminosas (Shoko et al., 2007) y el reciclado de nutrientes mediante el crecimiento de la biota del suelo, que favorece la mineralización de la MO, y la mayor disponibilidad de nutrimentos y agua (Baijukya et al., 2004).

El objetivo de este estudio fue evaluar la dinámica de nitrógeno (N) y carbono (C) del suelo y la planta en sistemas de maíz y soya utilizando *Mucuna pruriens* var. *utilis* – maíz (*Zea mays* L.) como AV y fertilización nitrogenada de síntesis.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó en el Campo Experimental de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira (CEUNP), Valle del Cauca, Colombia. Este campo se encuentra a 3° 25' 34" N y 76° 25' 53" O, a 980 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 24 °C, humedad relativa de 69% y 1406 mm de precipitación anual.

El suelo es Haplustert típico franco fino isohipertérmico con pendiente de 1%, que se encontraba en barbecho (B) desde hacía 8 años, aproximadamente, (Tabla 1). Los análisis de las propiedades físicas indicaron una textura franco arcillosa, que permite una adecuada labor de cultivo, siempre y cuando, la humedad

Tabla 1. Características químicas del suelo (Vertisol Typic Haplustert) en el sitio experimental. (0 – 20 cm de profundidad).

CO (g/kg)	pH H ₂ O	N total	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	P	S	B	Fe	Mn	Cu	Zn	K	Ca	Mg	Na	CIC
(Bray II)																
mg/kg												-cmol _c /kg-				
26.6	6.84	1.1745	4.42	13.84	57.45	28.03	1.45	8.83	61.75	0.67	1.49	0.44	10.9	5.63	0.10	21.1

gravimétrica no sea alta. La textura pesada más la alta densidad aparente encontrada (1.72 g/cm³), que se refleja en muy baja porosidad total (35.34%), generan condiciones de reducción favoreciendo la emisión de gases de efecto invernadero (GEI).

Los tratamientos (Tabla 2) fueron dispuestos en un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial 3² +2 con tres repeticiones. Las cuatro parcelas principales fueron el componente vegetal (AV, AO y dos con B) previo al establecimiento de los cultivos, todos seguidos por sistemas de cultivos asociados (maíz + soya) y de monocultivos (maíz o soya). Las subparcelas correspondieron a tres diferentes programas de fertilización (compost, fertilizante de síntesis química industrial y cero fertilización. Las unidades experimentales fueron parcelas en campo de 20 m² (6 x 3.34 m) para los tratamientos 1 a 9 y de 30 m² (6 x 5 m) para los tratamientos 10 y 11. Durante el desarrollo del trabajo se midieron la precipitación más el riego aplicado y la temperatura ambiental (Figura 1).

Tabla 2. Descripción de tratamientos del experimento.

Parcela principal	Subparcela	Tratamiento
1. Abono Verde <i>Mucuna pruriens</i> + <i>Zea mays</i> L.	Cultivo intercalado de maíz y soya, tratado con abono orgánico.	AV-FO
	Cultivo intercalado de maíz y soya, tratado con fertilizante de síntesis.	AV-FQ
	Cultivo intercalado de maíz y soya, sin fertilización adicional.	AV-SF
2. Acolchado Orgánico <i>Mucuna pruriens</i> + <i>Zea mays</i> L.	Cultivo intercalado de maíz y soya, tratado con abono orgánico.	AO-FO
	Cultivo intercalado de maíz y soya, tratado con fertilizante de síntesis.	AO-FQ
	Cultivo intercalado de maíz y soya, sin fertilización adicional.	AO-SF
3. Barbecho	Cultivo intercalado de maíz y soya, tratado con abono orgánico.	B-FO
	Cultivo intercalado de maíz y soya, tratado con fertilizante de síntesis.	B-FQ
	Cultivo intercalado de maíz y soya, sin fertilización adicional.	B-SF
4. Barbecho	Monocultivo comercial de maíz, tratado con fertilizante de síntesis.	B-FQ
	Monocultivo comercial de soya, tratado con fertilizante de síntesis.	B-FQ

En campo se sembraron asociados como AV la leguminosa mucuna (*Mucuna pruriens* L. var. *utilis* (CIAT No. 9349) y maíz (*Zea mays* L.) (variedad ICA 305) en las unidades experimentales correspondientes a los tratamientos 1 a 6. Después de un período de cultivo aproximado de 3 - 4 meses, cuando el grano se encontraba en estado lechoso (R3), se procedió a la cosecha del maíz y a la incorporación de la biomasa resultante como AV al suelo. Para ello, los cultivos se cortaron en trozos que permanecieron en descomposición durante 20 a 30 días.

Posteriormente, el establecimiento del cultivo de maíz (variedad ICA 305) se realizó con una densidad de siembra de 40,000 plantas/ha y la soya (variedad ICA P34) con una densidad de 200,000 plantas/ha, en un arreglo 1:2, un surco de maíz por dos de soya en cada unidad experimental.

Las fertilizaciones con fuentes orgánicas y sintéticas se realizaron en dos momentos, a los 15 y 45 días después de la resiembra de los cultivos. La fertilización sintética consistió en la aplicación de 50 kg/ha de N, P y K utilizando fertilizante triple quince (15-15-15) equivalente a 335 g en parcelas de cultivo intercalado y 501 g en el monocultivo, de acuerdo con los requerimientos encontrados por Moreno et al. (2008). Para los tratamientos con abono orgánico, la dosis se calculó de forma equivalente para alcanzar una dosis igual de N a la aplicada con el fertilizante sintético, para ello se utilizó gallinaza compostada en dosis de 3.4 t/ha, equivalente a 50 kg/ha de N. Los demás tratamientos no recibieron aplicación de fertilizantes o enmiendas.

Para conocer la dinámica de N y carbono (C) en el sistema de maíz y soya, fueron analizadas las variables: NH₄⁺, NO₃⁻, N inorgánico total (N_{it}) (NH₄⁺ + NO₃⁻), N total y carbono orgánico (CO) en el suelo y, la acumulación de N y C en la planta. En cada etapa de floración y llenado de grano de maíz fueron recolectadas nueve submuestras de suelo

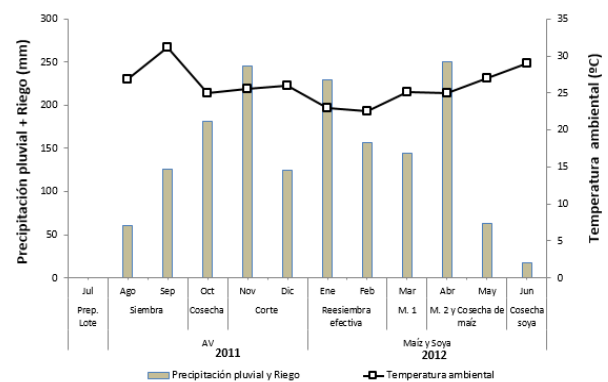


Figura 1. Distribución mensual de la temperatura ambiental y lámina de agua en el suelo (precipitación pluvial + riego) durante el experimento.

y tres hojas/planta ubicadas al lado opuesto de la espiga de las 10 plantas muestreadas para analizar los resultados en cada tratamiento.

La información obtenida se sometió a análisis de varianza ($P < 0.05$), prueba de promedios de Duncan ($P < 0.05$) y correlaciones de Pearson, mediante el uso del software SAS versión 9.1.3 (SAS, 2002).

Resultados

N total

En floración se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos (Figura 2). El N total a nivel de parcelas principales (AV, AO y B) y subparcelas (FO, FQ y SF) fue estadísticamente similar, con excepción del tratamiento B-FQ, siendo el menor valor. Las concentraciones encontradas en este ensayo (1450 a 1550 mg/kg) coinciden con las encontradas por Revelli et al. (2010) e inclusive fueron mayores que las encontradas en suelos agrícolas (1500 mg/kg).

N inorgánico (NH_4^+ , NO_3^- y N_{it} ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$))

En floración de los cultivos, la concentración de NH_4^+ en el suelo fue más alta ($P < 0.05$) en el tratamiento SF (Figura 3). De la misma manera, la amonificación fue mayor en las parcelas con tratamientos AV y AO combinados con FO, en comparación con FQ, donde se encontraron las concentraciones más bajas, aunque las diferencias no fueron significativas cuando se comparan con los valores obtenidos con el tratamiento SF.

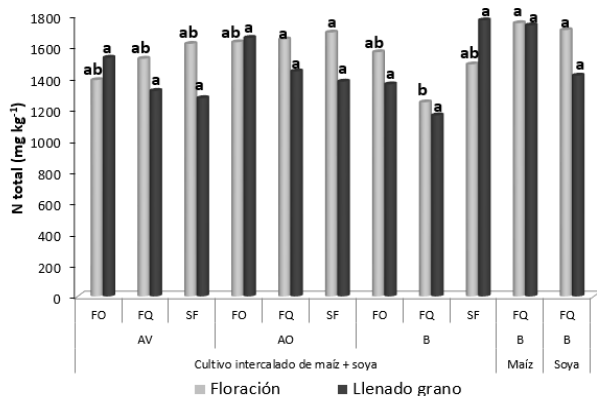


Figura 2. Concentración de N total (mg kg^{-1}) en el suelo en las etapas y tratamientos evaluados en el ensayo.

Para cada sistema y etapa de cultivo, promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes según Duncan ($P > 0.05$).

Los tratamientos aparecen en la Tabla 2.

La mayor nitrificación ocurrió en las parcelas principales de los cultivos intercalados en los tratamientos FO y FQ, por el contrario, en el tratamiento SF en AV se observó una reducción significativa ($P < 0.05$).

En la etapa de floración, la amonificación (Figura 3) fue más alta que la nitrificación cuando se aplicaron AV y AO combinados con FO y SF, por el contrario, la nitrificación predominó sobre la amonificación en AV y AO bajo la condición FQ (uso fertilización industrial), mientras que con el uso de barbecho (B) fue mayor en todas las condiciones evaluadas.

Aunque en la etapa de llenado de grano no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos para NH_4^+ y NO_3^- , sí se observó una tendencia creciente de la concentración de NH_4^+ en esta fase fenológica, que superó ampliamente al proceso de nitrificación, como se observa en la Figura 4. Es importante señalar el efecto de la humedad en el suelo en los procesos de mineralización del N; mientras que en floración la precipitación fue de 145 mm (Figura 3), en la etapa de llenado de grano fue de 250 mm (Figura 4), lo cual influyó en el comportamiento de estos procesos en el Vertisol donde se realizó este trabajo. La amonificación ocurre tanto en medio aeróbico como en anaeróbico, mientras que la nitrificación es un proceso netamente aeróbico (Sylvia et al., 2005). En este caso, la humedad, alta compactación del suelo y el tipo de arcillas 2:1 predominante en el suelo, crearon condiciones desfavorables para la nitrificación.

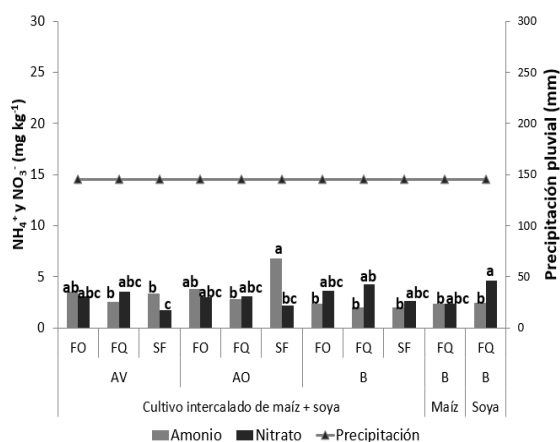


Figura 3. Concentración de NH_4^+ y NO_3^- (mg kg^{-1}) en el suelo durante la etapa productiva de floración.

Para cada sistema y forma de N, promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($P > 0.05$).

Las mayores diferencias para la variable N_{it} ($NH_4^+ + NO_3^-$) ocurrieron entre etapas fenológicas del cultivo (Figura 5), siendo mayor la concentración en la etapa de llenado de grano del maíz. Sin embargo, en esta última etapa, como se discutió con anterioridad, predominó el NH_4^+ debido a las condiciones de precipitación sumadas a las condiciones edáficas. Las concentraciones de N_{it} , como total de N en el suelo, variaron desde 0.4% en floración hasta 1.94% en la etapa de llenado grano, resultados que concuerdan con los encontrados por Philippot y Germon (2005), entre 0.3% y 2% de N total en el suelo.

Carbono orgánico en el suelo

La mayor concentración de CO en el suelo ocurrió ($P < 0.05$) en la fase de floración del cultivo de maíz (Figura 6). Los suelos en las parcelas principales AV y AO presentaron valores similares ($P > 0.05$) de CO en los tratamientos FO, FQ y SF. Shoko et al. (2007) encontraron que la biomasa de *M. pruriens* aporta al suelo material de descomposición para los microorganismos, aumentando la MO y el CO.

C y N en tejido vegetal del cultivo de soya

La mayor acumulación de C en las hojas de soya ocurrió en floración (Figura 7) ($P < 0.05$). Dentro de ambas épocas de evaluación (floración y llenado de grano) los tratamientos presentaron valores similares ($P > 0.05$). La concentración de N en las hojas de soya fue diferente ($P < 0.05$) entre tratamientos y épocas fenológicas (Figura 7). En floración los niveles registrados en las

parcelas AV y AO combinadas con FO, FQ y SF fueron similares estadísticamente, con excepción de B-FO donde se registró el valor más bajo.

En la fase de llenado de grano, los valores de C encontrados en las parcelas AV, AO y B manejadas con FO, FQ y SF fueron similares, sin embargo, la aplicación de B como compost en AV favoreció la mayor concentración N vs. el tratamiento cero fertilización (SF).

C y N en tejido vegetal de maíz

En la fase de floración del cultivo de maíz se registró un efecto significativo ($P < 0.05$) de los tratamientos para la acumulación de C en las hojas (Figura 8). Los valores en las parcelas AV, AO y B con FQ fueron similares, mientras que en las parcelas con FO y SF los valores fueron diferentes.

Para N en las hojas, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos en la etapa de llenado de grano (Figura 8). En esta época, la acumulación de este nutrimento fue similar entre los tratamientos, con excepción de AV-FO que difirió significativamente de B-FO y B-SF, en estos dos últimos se encontró la mayor concentración de N en el cultivo.

Concentraciones de N y C en el suelo y en la planta

En las concentraciones de N y C en el suelo y en la planta de maíz se observó una relación negativa esperada entre las fracciones inorgánicas del N (NH_4^+ vs. NO_3^-), ya que el NH_4^+ es la base para la producción de NO_3^- .

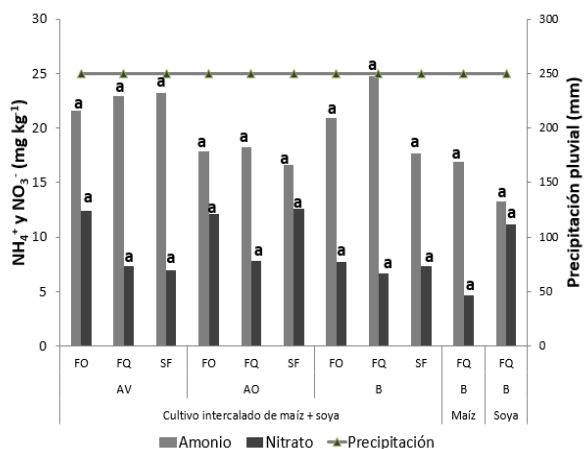


Figura 4. Concentración de NH_4^+ y NO_3^- (mg/kg) en el suelo en los tratamientos durante la etapa productiva de llenado de grano.

Para cada sistema y forma de N, promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($P > 0.05$).

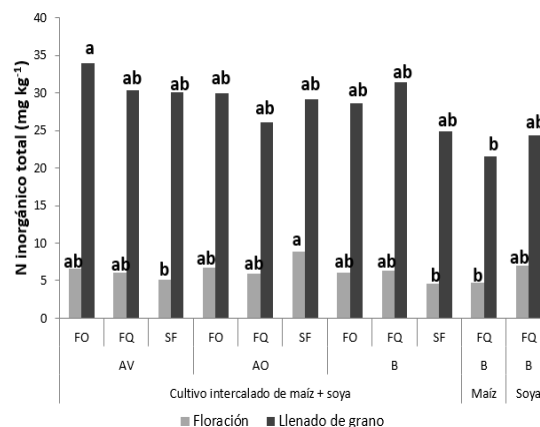


Figura 5. Concentración de N_{it} (mg/kg) en el suelo y precipitación pluvial (mm) en las etapas y tratamientos evaluados.

Para cada sistema y etapa de cultivo, promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($P > 0.05$).

La mayor concentración de NH_4^+ en el suelo correspondió con la mayor concentración de C e inversamente con el N presente en las hojas de maíz. La primera relación puede explicarse por efecto de masas, ya que el C es el nutrimento base para la acumulación de todas las moléculas de biomasa vegetal. Sin embargo, su producción debe estar acompañada por el suministro de nutrientes a partir del suelo y el N, después del C, es el nutrimento de mayor demanda para la producción de biomasa.

Si se hacen comparaciones en las relaciones C:N máximas y mínimas obtenidas en el tejido de maíz y soya en este ensayo (Tabla 3) se observa que mientras en soya esta relación varía entre 11.4 y 15.6, en maíz esta variación es de 18.7 a 21.2, lo que significa que en este último se acumula más C en el tejido y por el contrario,

en soya más N. Lo anterior es de esperar por el tipo de plantas (C_4 y C_3 , respectivamente) y la habilidad fijadora de N_2 en leguminosas que se traduce en mayor contenido de proteína.

Discusión

La floración fue la etapa fenológica donde las variables evaluadas expresaron sus máximos valores. En esta etapa la fisiología de las plantas es muy dinámica y aumentan su metabolismo para la producción, en este caso, de granos (Azcón Bieto y Talón, 2008).

El N total en este suelo (1450 – 1550 mg/kg) fue similar a valores encontrados en la mayoría de suelos tropicales agrícolas, no sólo en Colombia, sino también en Honduras y Argentina (Revelli et al., 2010). El N total en el suelo no significa

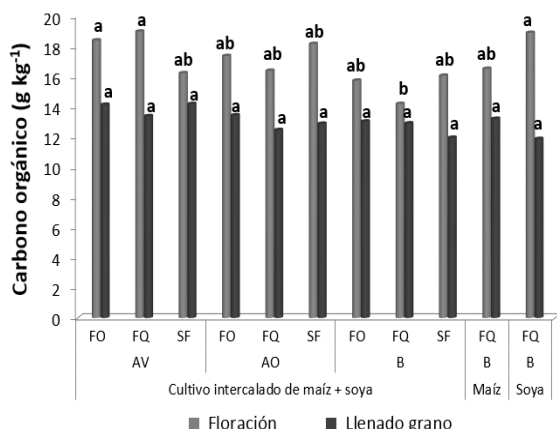


Figura 6. Concentración de carbono orgánico (g/kg) en el suelo en cada tratamiento durante las etapas productivas de los cultivos.

Para cada sistema y etapa de cultivo, promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($P > 0.05$).

Tabla 3. Relación C:N en tejido vegetal del cultivo de soya y maíz.

Arreglo de cultivo	Subparcela*	Maíz	Soya	
Cultivo intercalado de maíz + soya	AV	21.2	13.3	
	AV	FQ	21.0	13.6
		SF	20.9	13.8
	AO	FO	19.0	13.7
		FQ	20.5	11.5
		SF	19.7	11.4
B	FO	20.5	15.6	
	FQ	20.0	15.0	
	SF	18.9	14.7	
Monocultivo maíz	B	18.7	12.1	

* Los tratamientos aparecen en la Tabla 2.

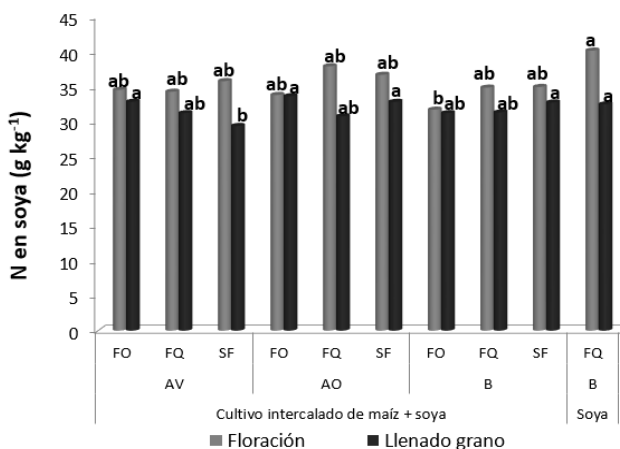
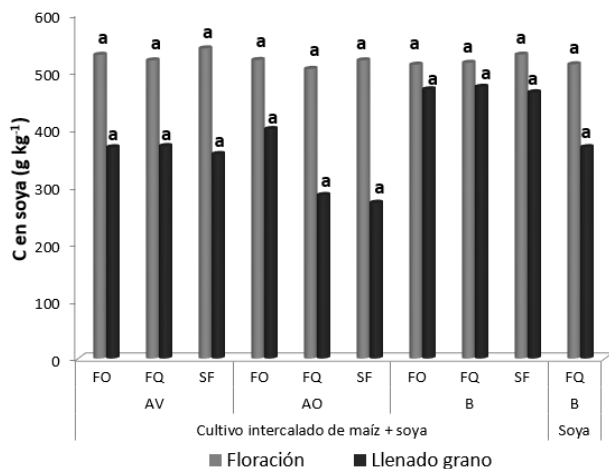


Figura 7. Concentración de C y N (g/kg) en las hojas del cultivo de soya en las etapas y tratamientos evaluados.

Para cada sistema y etapa de cultivo, promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($P > 0.05$).

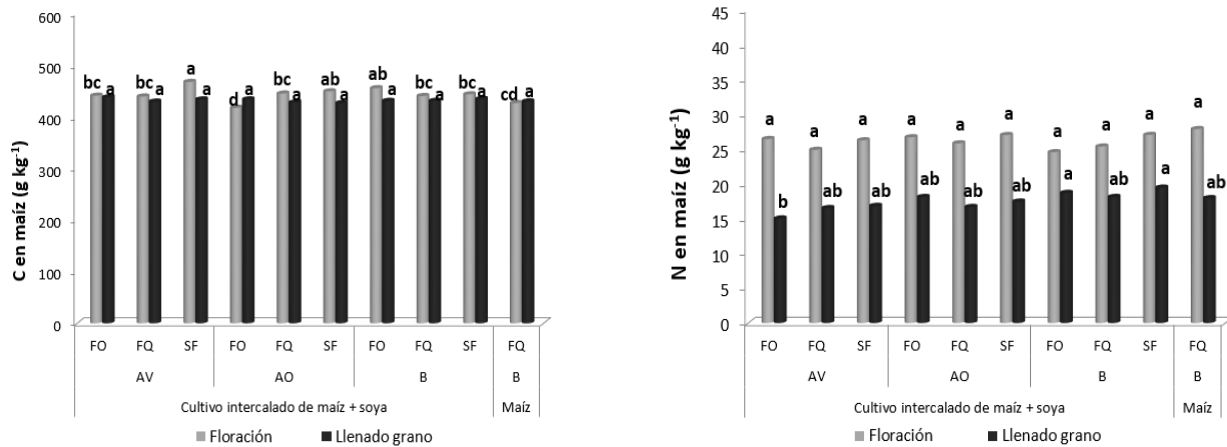


Figura 8. Concentración de C y N (g/kg) en las hojas del cultivo de maíz en las etapas y tratamientos evaluados.

Para cada sistema y etapa de cultivo, promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($P > 0.05$).

disponibilidad, ya que aproximadamente 98 - 99% de éste está constituido por N orgánico, el cual debe mineralizarse gradualmente para pasar a formas disponibles por las plantas, siendo el N_{it} la fuente disponible. En este ensayo el valor del N_{it} varió entre 0.4 y 2% de la reserva de N total en el suelo, valor que coincide con los hallazgos de Philippot y Germon (2005). Estos mismos investigadores encontraron que el N_{it} , compuesto de las fracciones NH_4^+ y NO_3^- tienen dinámicas complementarias en el suelo. Como se conoce, el NH_4^+ es el sustrato sobre el cual las bacterias oxidantes de amonio (BOA) desarrollan su metabolismo y, cuando éstas incrementan su actividad, dan como resultado final NO_3^- . En el presente ensayo se observó que cuando se aplicaron AV y AO combinado con FO predominó la amonificación, mientras que estos mismos abonos con la aplicación de FQ estimularon una mayor tasa de nitrificación, situación que se explica por la biomasa agregada a este suelo con limitaciones de oxigenación y por el efecto estimulante del fertilizante de síntesis química sobre la mineralización de la MO presente en el suelo.

En este ensayo la tendencia similar presentada con las aplicaciones de AV y AO con B en la expresión de CO fue afectada por la acumulación de este elemento, debido a que el suelo permaneció 8 años con residuos de barbecho, en decir, acumuló CO. Las respuestas con los tratamientos AV-FO y AO-FO fueron afectadas por las condiciones físicas del suelo y la tasa de mineralización. Para Adiku et al. (2010) las aplicaciones de compost y otros materiales orgánicos son reguladas por la tasa de mineralización y condiciones del suelo, por tanto la acumulación de CO en el suelo ocurre de manera gradual.

La relación inversa entre CO en el suelo y la concentración de C en hojas de soya podría relacionarse con la habilidad de las leguminosas para fijar N_2 y almacenarlo en forma de proteínas, lo cual es favorecido por el CO en el suelo.

Las acumulaciones de C y N en las hojas de soya fueron similares a las encontradas en las hojas de *M. pruriens* sembrada como AV en este ensayo, las cuales fueron, en promedio, 417 g/kg y 49 g/kg, respectivamente. Ngome et al. (2012) encontraron valores de N entre 25 y 66 g/kg y Shoko et al. (2007) entre 18 y 30 g/kg en hojas de maíz en floración. El N absorbido en edades tempranas por las plantas es altamente móvil vía floema a los distintos puntos de crecimiento en los órganos de la planta, donde permanece para luego ser movilizado en etapas de alta demanda como la floración y llenado de grano (Salisbury y Ross, 1994). Esta dinámica se reflejó en los procesos biológicos en el suelo y fisiológicos en los cultivos de maíz y soya.

En este trabajo las tendencias similares y aun en algunas diferencias significativas, el efecto del uso de las fuentes nitrogenadas sobre la acumulación de C y N en las hojas de soya y maíz posiblemente fue afectado por los procesos fisiológicos que sufre el N desde su absorción en el suelo hasta la distribución de los asimilados en los distintos órganos de la planta. Es decir, los procesos fisiológicos inherentes a cada etapa fenológica regulan el posible efecto de los tratamientos, ya que en varios trabajos de investigación, bajo condiciones totalmente diferentes, se encontraron valores similares en los contenidos de estos nutrimentos (Malavolta et al., 1997; Shoko et al., 2007; Ngome et al., 2012; Sosa et al., 2014).

Conclusiones

En el sistema maíz-soya, la incorporación al suelo de materiales orgánicos de alta calidad (*M. pruriens* var. utilis - maíz como AV/AO) estimularon la mineralización y consecuentemente la dinámica del C y de las diferentes fracciones de N en el suelo, sin cambios significativos en el contenido de estos elementos en el tejido vegetal. La humedad fue el factor regulador que más influyó en estas actividades biológicas en el suelo.

Agradecimientos

Al Grupo de Investigación en Agroecología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, por el apoyo financiero y los recursos necesarios para ejecutar la investigación.

Referencias

- Adiku, S.G.; Amon, N.K.; Jones, J.W.; Adjadeh, T.A.; Kumaga, F.K.; Dowuona, G.N. y Nartey, E.K. 2010. Simple Formulation of the Soil Water Effect on Residue Decomposition. In *Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41:267-276. <https://doi.org/10.1080/00103620903460781>
- Azcón Bieto, J. y Talón, M. 2000. *Fundamentos de la Fisiología Vegetal*. Madrid McGraw-Hill. 515 p.
- Baijukya, F.; De Ridder, N. y Giller, K. 2004. Nitrogen release from decomposing residues of leguminous cover crops and their effect on maize yield on depleted soils of Bukoba District, Tanzania. *J. Plant Soil*, 279: 77-93. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-2504-0>
- Broadbent, F.F. 1984. Plant use of soil nitrogen. En: R.D. Haulk (Ed.), *Nitrogen in crop production*. ASA, CSSA y SSSA, Madison, WI, EEUU. 171-182 p. <https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/acesspublicati/nitrogenincropp/171>
- FAO. 2015. El uso de fertilizantes sobrepasará los 200 millones de toneladas en 2018. <http://www.fao.org/news/story/es/item/277654/icode/>
- FENALCE (Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas). 2017. Informe de Indicadores Cerealistas 2017A. 87 p. <http://www.fenalce.org/archivos/indicer2017a.pdf>
- FENALCE (Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas). 2011. Perspectivas cerealistas: Producción, Mercado, Clima. 40 p. <http://fenalce.org/archivos/Perspectivas%20%20No.81.pdf>
- Glass, A.D.M. 2003. Nitrogen use efficiency of crop plants: Physiological constraints upon nitrogen absorption. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22:453-470. <https://doi.org/10.1080/07352680390243512>
- IFA (International Fertilizer Association). 2005. *World Fertilizer Use*. IFA (Ed.), Paris, France. 124 p. <http://www.fao.org/documents/card/es/c/b0f8bfc5-4c95-54b0-80cd-96b810006037/>
- Malavolta, E.; Vitti, G.C. y De Oliveira, S.A. 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2da Ed. rev e atual. POTAFOS. Piracicaba-SP. 319 p.
- Moreno, B.A.M.; Narro, L.L.A.; Vanegas, A.H.; Molina, G.C.E.; Ospina, R.J.G. y Agudelo, M. 2008. Respuesta del maíz a la fertilización química en la zona cafetera central de Colombia. *Cenicafé*, 59:75-80. <http://hdl.handle.net/10778/181>
- Ngome, A.F.E.; Becker, M. y Mtei, K.M. (2012). Leguminous cover crops differentially affect maize yields in three contrasting soil types of Kakamega, Western Kenya. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics (JARTS)*, 112:1-10. <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:hebis:34-2011101139312>
- Philippot, L. y Germon, J. 2005. Contribution of Bacteria to Initial Input and Cycling of Nitrogen in Soils. https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_8 In: BUSCOT François and VARMA Ajit (Editors.) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Leipzig, New Delhi: Springer-Verlag. 159-172 p.
- Rao, I.M. 2009. *Essential plant nutrients and their functions*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Working Document No. 36. Cali, Colombia. 36 p. https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/54682/essential_plant_nutrients.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Revelli, G.R.; Gagliardi, R.C.; Sbodio, O.A. y Tercero, E.J. 2010. Propiedades fisicoquímicas en suelos predominantes del noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina. *Ciencia del suelo*, 28:123-130. https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_Santiago+del+Estero%2C+Argentina&btnG=
- Salisbury, B.F. y Ross, C.W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamérica. México. 759 p.
- SAS. 2002. *User's guide Versión 9.1.3*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/.../viewer.htm>
- Sylvia, D.; Harter, P.; Fuhrmann, J. y Zuberer, D. 2005. (Editors). *Principles and applications of soil microbiology*. 2nd Edition. New Jersey: Pearson Prentice Hall. 640 p.
- Shoko, M.D.; Tagwira, F. y Zhou, M. 2007. The potential of reducing nitrogen fertilizer rates using a soyabean-sugarcane production system in the South Eastern Lowveld of Zimbabwe. *Afr. J. Agric. Res.* 2:16-26. <http://www.academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/D6D871A33883>
- Sosa, B.A.; Sánchez, de P., Sanclemente, O.E. 2014. Influencia de abonos verdes sobre la dinámica de nitrógeno en un Typic Haplustert del Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica*. 63 (4) 2014, p 343-351. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.38528>
- Zribi, W.; Faci, J.M. y Aragüés, R. 2011. Efectos del acolchado sobre la humedad, temperatura, estructura y salinidad de suelos agrícolas. *Separata ITEA. Información técnica económica agraria*, 107:148-162. <http://hdl.handle.net/10532/1796>

Efecto de enmiendas agrícolas en las reservas de carbono y nitrógeno en Oxisoles de la Amazonía del Brasil

Effect of agricultural correctives in the stocks of carbon and nitrogen of Oxisol in the Brazilian amazon

José Augusto Amorim Silva do Sacramento^{1*}, Paulo Henrique da Silva Gomes², Carlos Alberto Costa Veloso³, Arystides Resende Silva³, Edilândia Farias Dantas⁴, Juan Daniel Villacis Fajardo⁵

1. Instituto de Biodiversidade e Florestas, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brasil. 2. Secretaria de Agricultura de Óbidos, Prefeitura de Óbidos, Pará, Brasil. 3. Centro de Pesquisa Agropecuário do Trópico Úmido, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil. 4. Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. 5. Universidade Estadual do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil. *Autor para correspondencia: jassacramento@yahoo.com.br

Rec: 2019-03-19 Acep: 2020-03-17

Resumen

En un Oxisol Distrófico de textura arcillosa del campo experimental de la Empresa Brasileña de Producción Agropecuaria (Embrapa) en la ciudad de Belterra, estado de Pará (Brasil) se evaluó el efecto de los correctivos agrícolas (cal dolomita y yeso) en las reservas de carbono y nitrógeno en el suelo. Las muestras de suelo fueron tomadas en pequeñas calicatas de 0.60 x 0.60 x 0.60 en tres repeticiones y un diseño en bloques al azar con cinco tratamientos (cal/yeso -kg/ha) en sistemas agrícolas durante 5 años en rotación de maíz/soya bajo siembra directa (SSD). Los tratamientos (T), cal (GO)/yeso (GO), fueron: T1 (C0G0) = sin cal/sin yeso, T2 (C1G1) = 1000/500, T3 (C4G2) = 4000/1000, T4 (C4G2) = (4000/1000), más un testigo en bosque nativo (BNA) sin enmiendas. Las muestras fueron tomadas de 0 – 5; 5 – 10; 10 – 20; 20 – 40 e 40 – 60 cm de profundidad en el suelo. Los resultados mostraron que la aplicación de yeso más cal en sistema de siembra directa de cultivos comerciales maíz/soya aumenta la disponibilidad de nutrientes en las capas superiores del suelo hasta 20 cm de profundidad. Los mejores resultados en el perfil del suelo se obtuvieron con el tratamiento C4G2.

Palabras clave: Siembra directa, bosque nativo, atributos físicos y químicos.

Abstract

In a clay-colored dystrophic Oxisol from the experimental field of the Brazilian Agricultural Production Company (EMBRAPA) in the city of Belterra, State of Pará, the effect of the agricultural corrective measures (cal dolomita and gypsum) on the carbon and nitrogen reserves was evaluated. ground. The soil samples were taken in small pits of 0.60 x 0.60 x 0.60 in three replications and a random block design with three replications and five treatments (lime / gypsum -kg / ha) in agricultural systems under direct seeding (SSD): Treatment 1 (C0G0) = no lime / no gypsum, Treatment 2 (C1G1) = 1000/500, Treatment 3 (C4G2) = 4000/1000, Treatment 4 (C4G2) = (4000/1000) plus a witness in forest Native (BNA) without amendments. The soil samples were taken every 10 cm up to 60 cm deep. The results showed that the application of gypsum and lime in the direct seeding system of commercial crops increases the availability of nutrients in the upper layers of the soil up to 20 cm deep. The best results in the soil profile were obtained with the C4G2 treatment.

Key words: No tillage, native forest, physical and chemical characteristics.

Introducción

En la Amazonía de Brasil es común la práctica de tumba y quema de la vegetación para el establecimiento de cultivos (Rego y Kato, 2017). En este sistema convencional la ruptura de los agregados del suelo favorece el contacto directo de la biomasa microbiana con el material orgánico, acelerando la tasa de descomposición de los constituyentes orgánicos, lo que favorece la emisión de CO₂ a la atmósfera. Por otra parte, el sistema de siembra directa (SSD) favorece el drenaje y la reducción de emisiones CO₂ a la atmósfera debido a la mayor producción y acumulación de biomasa vegetal y el control de los procesos erosivos (Guimarães, 2015).

La aplicación de cal dolomita como correctivo es una práctica común para reducir los niveles tóxicos de Al³⁺ y Mn²⁺ en el suelo. El yeso agrícola (CaSO₄·2H₂O) se aplica como complemento al encalado, resultando Al(SO₄) (Sumner, 1995) un compuesto no fitotóxico que favorece el desarrollo radicular, lo que eleva los niveles de carbono y nitrógeno del suelo (Costa, 2015). La aplicación conjunta de estas enmiendas es frecuente en Brasil para favorecer la sostenibilidad de los cultivos y la conservación de los ecosistemas, debido a la reducción del lavado de residuos agrotóxicos (Casão Jr. et al., 2012).

Este trabajo tuvo por objetivo evaluar los efectos de la aplicación de cal agrícola y yeso en sistemas de siembra directa maíz/soya y en bosque nativo sobre los contenidos de carbono y nitrógeno en Oxisoles de la Amazonía de Brasil.

Materiales y métodos

Area de estudio

El experimento se realizó en el Campo Experimental de la Empresa Brasileña de Pesquisa Agropecuaria (Embrapa-Amazonía Oriental), localizado en el municipio de Belterra, Pará, a 2° 63' S y 54° 95' W, a 175.74 m.s.n.m. Desde 2012 en el sitio experimental se utiliza el Sistema de Siembra Directa (SSD) en rotación de los cultivos de maíz/soya. De acuerdo con la clasificación de Köppen el clima en la zona es tropical (Am) con una precipitación, promedio, de 1116 mm entre julio de 2015 y julio de 2016; una temperatura mínima de 22 °C y máxima de 29 °C. La cal dolomita (15% de Mg, PRNT = 90%) fue aplicada en la superficie del suelo e incorporada a 20 cm de profundidad con arado, 60 días antes de la siembra de maíz; y el yeso (15% de S y 26% de Ca) fue aplicado 30 días después del encalado. En la Tabla 1 se incluye el resultado del análisis de suelo entre 0 y 20 cm de profundidad.

Muestreo y análisis del suelo

Las muestras de suelos disturbado y no disturbado fueron recolectadas en el área experimental en sitios cultivados durante 5 años en rotación de maíz/soya en un sistema de siembra directa (SSD). Las muestras fueron tomadas de 0 – 5; 5 – 10; 10 – 20; 20 – 40 e 40 – 60 cm de profundidad en el suelo. Las muestras fueron tomadas en pequeñas calicatas de 0.60 x 0.60 x 0.60 en tres repeticiones y dispuestas en un diseño en bloques al azar con tres repeticiones y cinco tratamientos (T) (cal/yeso -kg/ha): T1 (COG0) = sin cal/sin yeso, T2 (C1G1) = 1000/500, T3 (C4G2) = 4000/1000, T4 (C4G2) = (4000/1000) más un testigo en bosque nativo (BNA) de primera sucesión de las especies Angelim (*Dinia excelsa* Ducke), Faveira-pastelta (*Parkia pendula* Benth.), Paricá (*Parkia multijugaa* Benth.) y Freijó (*Cordia goeldiana* Huber).

Análisis de las características físicas del suelo

La densidad del suelo fue determinada por el método de anillo volumétrico; para la densidad de partículas se siguió la metodología del matraz aforado y la porosidad total fue determinada a través de la relación entre la densidad del suelo y la densidad de partícula, teniendo en cuenta el principio de la determinación del volumen total del suelo ocupado por agua y aire (Embrapa, 2017).

Carbono orgánico y nitrógeno total

La determinación del carbono orgánico total en el suelo (COT) se hizo de acuerdo con el método de Yeomans y Bremner (1988). El nitrógeno total (NT) por destilación de Kjeldahl y determinación según Bremner (1996). El análisis de reservas de carbono y nitrógeno total se calculó a partir de la ecuación 1 propuesta por (Cardoso et al., 2010):

$$EstCOT \text{ y } NT = (C \text{ y } N \times Ds \times e) / 10, \text{ Ec. 1}$$

donde, C y N = niveles de carbono y nitrógeno; Ds = densidad del suelo; e = espesor; 10 = unidad de conversión para mg/ha.

Diseño experimental y análisis de los datos

El diseño experimental fue en bloques al azar, con tres repeticiones, y cinco tratamientos dispuestos en parcelas subdivididas. Los resultados de las características físicas del suelo (Ds, Dp y PT) y los contenidos C y N, fueron sometidos al análisis de varianza (Anova). Las medias fueron comparadas por el test de Tukey al 5% de probabilidad, utilizando el software ASSISTAT Versión 7.7 beta 2011 (Silva y Azevedo, 2016).

Tabla 1. Caracterización química y física del suelo. Municipio de Belterra, Pará, Brasil.

Prof. (cm)	pH (H ₂ O)	P (mg/kg)	Ca	Mg	K	Al	H+Al	T	Sat. (%)				
										(Cmol _c /kg)			
0 – 20	4.9	6.0	1.6	0.8	0.14	0.6	7.2	9.74	26.08	31	39	261	700

pH = potencial hidrogeno (acidez activa), P = fósforo; Ca = calcio, Mg = magnesio; K = potasio; Al = aluminio; H + Al = acidez potencial; T = Acidez total (pH = 7); Sat. = saturación por bases; MO = materia orgánica; Ar = arena total; Arc. = arcilla.
FUENTE: Veloso et al., 2012.

Resultados y discusión

La densidad del suelo (Ds) no varió entre tratamientos. El área testigo de bosque nativo (BNA) presentó los menores valores hasta 20 cm de profundidad en el suelo. Los tratamientos presentaron valores similares de Ds en las profundidades entre 0 y 60 cm. No obstante después de 10 cm de profundidad, la densidad del suelo presentó valores superiores (Tabla 2).

La porosidad total (PT) presentó mayores valores en el área de referencia de bosque nativo (BNA) hasta 20 cm de profundidad debido, posiblemente, a la mayor presencia de materia orgánica, lo que favorece la agregación y formación de la estructura y menores niveles de carbono orgánico en esta profundidad (Tabla 2).

De acuerdo con Kiehl (1979) la distribución de la porosidad total de un suelo ideal para la producción agrícola debe ser de 0.50 dag/m³. En el presente estudio, sólo los resultados de porosidad obtenidos en los tratamientos C2G2 en la profundidad 0.10 – 0.20 m y en el tratamiento C4G2 en las profundidades 0.10 – 0.20 y 0.40 – 0.60 m presentaron valores de porosidad ajustados a la clase de suelo ideal para la producción agrícola.

Los niveles de carbono en la profundidad 0 – 5 cm en el BNA fueron significativos ($P < 0.05$) cuando se comparan con los demás tratamientos (Tabla 3). De acuerdo con Malavolta (1989) los niveles de carbono encontrados en el BNA en la profundidad de 0 – 5 cm pueden ser considerados altos, seguidos de valores medios para los demás tratamientos en la profundidad entre 0 y 20 cm y niveles bajos en profundidades entre 20 y 60 cm para todos los tratamientos.

Para Guimarães et al. (2015) las reservas de carbono orgánico total (COT) se relacionan con las características físicas y biológicas del suelo, por su estrecha relación con la estructura y la estabilidad de agregados del suelo, y por su importancia como fuente de energía para los

Tabla 2. Características físicas del suelo (densidad del suelo - Ds, densidad de partícula - Dp y porosidad total - PT) en áreas con diferentes niveles** de cal C y yeso G. Región Amazónica de Brasil

Profundidad del suelo (cm)	Ds	Dp	PT
	(Mg/m ³)		(%)
C0G0			
0 – 5	1.16	2.4	51
5 – 10	1.24	2.5	49
10 – 20	1.29	2.5	48
20 – 40	1.25	2.4	47
40 – 60	1.30	2.6	49
C1G1			
0 – 5	1.10	2.4	54
5 – 10	1.19	2.5	52
10 – 20	1.22	2.6	52
20 – 40	1.32	2.4	49
40 – 60	1.25	2.6	51
C2G2			
0 – 5	1.16	2.5	53
5 – 10	1.15	2.5	53
10 – 20	1.18	2.5	50
20 – 40	1.25	2.4	48
40 – 60	1.24	2.6	52
C4G2			
0 – 5	1.15	2.5	53
5 – 10	1.16	2.4	52
10 – 20	1.21	2.5	50
20 – 40	1.21	2.5	52
40 – 60	1.25	2.5	50
BNA			
0 – 5	0.94	2.4	60
5 – 10	1.06	2.3	54
10 – 20	1.07	2.5	56
20 – 40	1.13	2.5	54
40 – 60	1.21	2.5	52

No se aplicó la prueba de comparación de promedios porque la prueba de 'F' de interacción no fue significativa.

** (cal/yeso -kg/ha) C0G0 = control; C1G1 (1000/500); C2G2 (2000/1000); C4G2 (4000/1000); BNA = bosque nativo.

Tabla 3. Reservas de COT en áreas con diferentes niveles** de cal C y yeso G. Región Amazónica de Brasil.

Profundidad del suelo (cm)	COG0	C1G1	C2G2	C4G2	BNA
Reservas de COT (g/kg¹)					
0 - 5	24.3bA*	20.9bA	25.1bA	22.9bA	33.6aA
5 - 10	22.2aA	19.9aA	22.7aA	21.8aA	22.3aB
10 - 20	21.6aA	17.7aA	19.9aA	23.4aA	21.5aB
20 - 40	14.4aB	10.7aB	12.2aB	14.2aB	14.4aC
40 - 60	9.2aC	8.1aB	8.7aB	10.8aB	8.5aD

*Medias seguidas por letras iguales minúscula en columna y mayúscula en fila no difieren estadísticamente entre sí ($P > 0.05$).

** (cal/yeso -kg/ha) COG0 = control; C1G1 (1000/500); C2G2 (2000/1000); C4G2 (4000/1000); BNA = bosque nativo.

microorganismos. Los resultados en el presente estudio están relacionados con la alta producción de materia orgánica del bosque nativo (BNA), la producción de biomasa del sistema de siembra directa y el efecto de la agregación de cationes Ca^{2+} contenidos en la cal y yeso y disponible a través del perfil del suelo.

El incremento de C está relacionado con las fracciones de la materia orgánica, principalmente la fragmentada, que igualmente se relaciona con el material recientemente agregado al suelo (Rossi et al., 2012). De acuerdo con Matías et al. (2012), la tasa de estratificación de carbono orgánico, que compara la reserva de éste en la capa superficial del suelo con la de las capas inferiores, es esencial en el control de la erosión, la infiltración de agua y en la conservación de nutrientes.

Hasta 60 cm de profundidad en los suelos no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en el COT. No obstante hasta esta profundidad los mayores contenidos ocurrieron en los tratamientos C4G2 (116.6 mg/ha) y COG0 (116.3 mg/ha) (Tabla 4). De acuerdo con Álvarez et al. (1999), con excepción de algunos tratamientos, en los demás se presentaron reservas de COT (entre 23.6 y 35.7 mg/ha) consideradas aceptables. En este caso, los tratamientos de encalado y aplicación de yeso asociados al sistema de siembra directa contribuyeron con estos resultados.

De acuerdo con Embrapa (2015) el proceso más eficiente para aumentar las reservas de carbono en el suelo es aquél que incorpora fuentes de nitrógeno (N) en el sistema, un elemento necesario para la eficiencia de los microorganismos y las plantas.

Para aumentar las reservas de carbono en el suelo es necesario un balance positivo del nitrógeno. En la región del estudio, en sistemas

de siembra directa se estima que para almacenar una 1 t de carbono en el suelo se necesitan aproximadamente 80 kg de nitrógeno. Con excepción de los tratamientos COG0, C1G1 y C2G4 en profundidades entre 40 y 60 cm, que presentaron niveles bajos de N (< 0.8 g/kg), los demás tratamientos presentaron niveles entre medio y alto (Tabla 5).

El nitrógeno total (NT), un parámetro importante en la producción agrícola, principalmente en la evaluación de los servicios ecosistémicos, presentó diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$) (Tabla 6).

Estos resultados son debidos a los niveles y reservas de COT residuales del bosque recién convertido para sistemas de producción agrícola, a los residuos de vegetación en el sistema de siembra directa (SSD) y a la alta relación C/N por los cultivos utilizados en la rotación.

Las mayores reservas de COT y NT se concentraron entre 20 y 40 cm de profundidad en el suelo. De acuerdo con Gubiani (2015) el suelo bajo SSD presentó mayores reservas de C y N acumulado en el perfil del suelo, debido a la tasa de incorporación de residuos vegetales sobre la superficie y a las características físico-químicas del suelo, en particular la cantidad y el tipo de coloides inorgánicos.

Considerando que el área objeto de este estudio fue convertida recientemente de bosque nativo a área de cultivo con aplicaciones de cal y yeso bajo sistema de siembra directa, se puede inferir que las existencias de COT y NT permanecen prácticamente inalteradas y que, aun así, fue posible identificar el tratamiento C2G2 como principal incorporador de carbono y nitrógeno en el suelo.

Tabla 4. Reservas de carbono orgánico total (COT) del suelo en áreas con diferentes niveles** de cal C y yeso G. Región Amazónica de Brasil.

Profundidad del suelo (cm)	C0G0	C1G1	C2G2	C4G2	BNA
Reservas de COT (Mg/ha⁻¹)					
0 – 5	14.5	11.5	15.0	13.3	15.7
5 – 10	13.9	11.9	12.8	12.7	12.1
10 – 20	28.1	21.3	23.9	24.1	23.6
20 – 40	35.7	28.2	30.0	34.8	33.8
40 – 60	23.8	20.1	21.5	27.6	20.9
	116.3	93.0	103.3	116.6	106.2

No se aplicó la prueba de comparación de promedios porque la prueba de 'F' de interacción no fue significativa.

** (cal/yeso -kg/ha) C0G0 = control; C1G1 (1000/500); C2G2 (2000/1000); C4G2 (4000/1000); BNA = bosque nativo.

Tabla 5. Reservas de N del suelo en áreas con diferentes niveles** de cal C y yeso G. Región Amazónica de Brasil.

Profundidad del suelo (cm)	C0G0	C1G1	C2G2	C4G2	BNA
Reservas de NT (g/kg⁻¹)					
0 – 5	1.7	1.5	1.8	1.7	2.3
5 – 10	1.6	1.4	1.5	1.7	1.7
10 – 20	1.5	1.4	1.5	1.5	1.6
20 – 40	1.3	0.9	0.9	1.1	1.3
40 – 60	0.7	0.6	0.8	0.7	0.8

No se aplicó la prueba de comparación de promedios porque la prueba de 'F' de interacción no fue significativa.

** (cal/yeso -kg/ha) C0G0 = control; C1G1 (1000/500); C2G2 (2000/1000); C4G2 (4000/1000); BNA = bosque nativo.

Tabla 6. Reservas de N en el suelo en áreas con diferentes niveles** de cal C y yeso G. Región Amazónica de Brasil.

Profundidad del suelo (cm)	C0G0	C1G1	C2G2	C4G2	BNA
Reservas de NT (Mg ha⁻¹)					
0 – 5	1.0 aC*	0.8 aC	1.1 aCD	1.0 aC	1.1aCD
5 – 10	1.0 aC	0.8 aC	0.8 aD	0.9 aC	0.8 aD
10 – 20	1.9 aC	1.6 aBC	1.8 aBCD	1.8 aBC	1.8 aCD
20 – 40	3.1 aB	2.4 aB	2.3 aB	2.6 aB	3.1 aB
40 – 60	1.9 aC	1.5 aBC	1.9 aBC	1.8 aBC	2.1 aBC
	9.4 aA	7.2 cA	7.9 bcA	8.3 bcA	8.7 abA

*Medias seguidas por letras iguales minúscula en columna y mayúscula en fila no difieren estadísticamente entre sí (P > 0.05).

** (cal/yeso -kg/ha) C0G0 = control; C1G1 (1000/500); C2G2 (2000/1000); C4G2 (4000/1000); BNA = bosque nativo.

Conclusiones

Los correctivos agrícolas, yeso y cal, asociados con la siembra directa presentaron los mayores efectos en las capas superficiales del suelo, lo que favorece la disponibilidad de nutrientes entre 0 y 20 cm, justamente la zona de crecimiento radicular de la mayoría de las plantas cultivadas.

En el tratamiento C4G2 (4000/1000 kg/ha) hasta 60 cm de profundidad en el suelo se presentaron los mejores resultados para las reservas de carbono y nitrógeno, con significancia para las reservas de este último nutriente. En este tratamiento los valores de nitrógeno fueron los que más se aproximaron al área de referencia (bosque nativo) en las condiciones edafoclimáticas de la región Oeste de Pará, Amazonia de Brasil.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Embrapa Amazônia Oriental por la asociación en la idealización, conducción y ejecución de esta investigación.

Referencias

- Albuquerque, M. A. 2012. Estoques de carbono e nitrogênio e emissões de gases de efeito estufa em Latossolo Vermelho sob sistemas de culturas em plantio direto (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Alvarez Venegas, V.H.; Novais, R. F.; Barros, N.F.; Cantarutti, R.B.; Lopes, A.S. 1999. Interpretação dos resultados das análises de solos. En: Ribeiro, A. C.; Guimarães, P. T. G. (Ed.), Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. pp. 25-32. Viçosa, Brasil: CFSEMG.
- Bonini, C. S. B.; Alves, M. C. 2012. Qualidade física de um Latossolo Vermelho em recuperação há dezessete anos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 16 4: 329–336p. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662012000400001>.
- Castro, G. S. A.; Crusciol, C. A. C.; Calonego, J. C.; Rosolem, C. A. 2015. Management Impacts on Soil Organic Matter of Tropical Soils. *Vadose Zone Journal* 14:1: doi:10.2136/vzj2014.07.0093
- Casão Junior, R.; Araújo, A. G.; Llanilo, R. F. 2012. Plantio direto no Sul do Brasil: Fatores que facilitaram a evolução do sistema e o desenvolvimento da mecanização. Londrina, Brasil: IAPAR.
- Cardoso, E. L.; Silva, M. L. N.; Silva, C. A.; Curi, N.; Freitas, D. A. F. de. 2010. Estoques de carbono e nitrogênio em solo sob florestas nativas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45 9: 1028-1035p. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010000900013>.
- Costa, C. H. M. 2015. Calagem superficial e aplicação de gesso em sistema plantio direto de longa duração: efeitos no solo e na sucessão milho/crambe/feijão-caupi. (Tese de doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de ciências Agrônômicas, Botucatu, São Paulo.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2015. XXI Ciênc. para a vida – Carbono nos porões - Embrapa. Brasil.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2017. Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análises de solos. Brasília, Brasil: Embrapa
- Grohs, D. S., Polleto, N., Mundstock, C. M. R. 2009. Teores de nitrogênio mineral do solo para predição do potencial produtivo de cevada. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33 6:1745-1754p. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832009000600023>.
- Gubiani, E. 2015. Estoque de carbono e nitrogênio em solo sob sistemas de manejo e culturas de inverno. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- Guimarães, T. M.; Filho, A. C. A.C., Costa C. H. M. 2015. Efeito da calagem no estoque de carbono do solo em sistema semeadura direta. *Journal of Agronomic Sciences* 4 especial:71-90p. <http://www.dca.uem.br/V4NE/05-11.pdf>
- Kiehl, E.J. 1979. Manual de edafologia. Relações solo-planta. São Paulo, Brasil: Ceres.
- Malavolta, E., 1989. ABC da adubação. São Paulo, Brasil: Ceres.
- Matias, S. S. R; Correa, M. A. R.; Camargo, L. A.; Farias, M. T.; Centurion, J. F.; Nóbrega, J. C. A. 2012 Influência de diferentes sistemas de cultivo nos atributos físicos e no carbono orgânico do solo. *Revista Brasileira Ciências Agrárias* 73: 414-420p. doi:10.5039/agraria.v7i3a1462
- Rego, A.K.C.; Kato, O. R.; Agricultura de corte e queima e alternativas agroecológicas na Amazônia. 2017. *Novos Cadernos NAEA20* 3:203-224p. <https://periodicos.ufpa.br/index.php/ncn/article/view/3482>
- Rossi, C.Q., Pereira, M. G., Giácomo, S. G., Betta, M., Polidoro, J. C. 2012. Frações lábeis da matéria orgânica em sistema de cultivo com palha de braquiária e sorgo. *Revista Ciência Agronomica Londrina* 43 1: 38–46p. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902012000100005>
- Santos, H. G. dos; Jacomine, P. K. T.; Anjos, L. H. C. dos; Oliveira, V. A. de; Oliveira, J. B. de; Coelho, M. R.; Lumberras, J. F.; Cunha, T. J. F. 2018. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, Brasil: Embrapa.
- Silva, F. DE A. S. E.; Azevedo, C. A. V. de. 2009. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: World congress on computers in agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Sumner, M. E. 1995. Amelioration of subsoil acidity with minimum disturbance. In: Jayawar-Dane , N.S. & Stewart, B.A. (Ed.). *Subsoil management technics*. pp. 147-184). Athens, Grécia: Lews Publishers.
- Veloso, C. A. C., Silva, A. R. B., Franzine, V. I., Silva, A. R. 2012. Produtividade do milho no Oeste do Pará em função de doses de calcário e gesso – Belém, PA. Belém, Brasil: Embrapa Amazônia Oriental.
- Yeomans, J. C.; Bremner, J. M. 1988. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19 13:1467-1476p. <https://doi.org/10.1080/00103628809368027>

Características morfológicas de variedades de café cultivadas en condiciones de sombra

Morphological characteristics of coffee varieties grown in shade conditions

Manuel Emilio Milla Pino, Segundo Manuel Oliva Cruz*, Santos Triunfo Leiva Espinoza, Roicer Collazos Silva, Oscar Andrés Gamarra Torres, Miguel Ángel Barrena Gurbillón, Jorge Luis Maicelo Quintana

Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Amazonas, Perú. *Autor para correspondencia: soliva@indes-ces.edu.pe

Rec: 2018-02-16 Acep: 2019-12-26

Resumen

El cultivo de café es una de las principales actividades agrícolas en la región Amazonas de Perú. El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el comportamiento agronómico de las variedades Catimor, Maragogipe y Castillo de café (*Coffea arabica*), establecidas bajo un sistema agroforestal, empleando como sombra árboles de *Eucalyptus torreliana*, *Colubrina glandulosa* y *Pinus tecunumanii*. El estudio de inició en 2017 en el distrito de Huambo, Provincia de Rodríguez de Mendoza, Amazonas-Perú. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental en bloques completos al azar, y consistió en tres bloques y nueve tratamientos. Las variables evaluadas fueron: altura de planta, altura hasta la primera hoja, número de hojas, estado general de la planta y diámetro del tallo. La metodología utilizada consistió en análisis individual para cada tiempo, prueba de homogeneidad de varianzas y análisis conjunto en el tiempo para un mismo espacio, considerando la interacción tratamiento x tiempo, en evaluaciones a 30, 60, 90, 120 y 150 días después del establecimiento del cultivo. Los resultados indican que la variedad de café Castillo, tanto bajo sombra de *P. tecunumanii* como de *C. glandulosa*, presentó el mejor comportamiento agronómico; mientras que la variedad Maragogipe bajo sombra de *E. torreliana* o de *C. glandulosa* mostró un deficiente comportamiento agronómico.

Palabras clave: *Coffea arabica*, condiciones agroclimáticas, crecimiento vegetativo, sistemas agroforestales, Perú.

Abstract

Coffee crop is one of the main activities in the Amazon region, ranking as third in Peru. The purpose of this work was to evaluate the agronomic behavior of three coffee varieties (Catimor, Maragogipe and Castillo) established under an agroforestry system, using as shade trees *Eucalyptus torreliana*, *Colubrina glandulosa* and *Pinus tecunumanii*, whose experimental study was established in the district of Huambo, Province of Rodríguez de Mendoza, Amazonas-Peru during 2017. Treatments were distributed in a randomized complete block experimental design, with three blocks and nine treatments. The evaluated variables were plant height, height to the first leaf, number of leaves, general state of the plant and diameter of the stem. The methodology used consisted of individual analysis for each time, homogeneity test of variances and joint analysis over time for the same space, considering the interaction treatment*time, performing evaluations at 30, 60, 90, 120 and 150 days after crop settlement. The results indicated that the variety of Castillo coffee either with shade of *P. tecunumanii* or with shade of *C. glandulosa* leads to a better agronomic behavior, and the variety of coffee Maragogipe both with shade of *E. torreliana* and with shadow of *C. glandulosa* shows a poor agronomic behavior.

Key words: agroclimatic conditions, agroforestry systems, *Coffea arabica*, vegetative growth, sustainable, Perú.

Introducción

El cultivo del café ha sido clave y trascendental, no solo por su importancia en indicadores económicos, sino también por participar en el tejido social, cultural, institucional y político de muchos países de Sur- y Centroamérica. A lo largo de la historia ha sido un rubro tradicional, considerado rentable y la base de encadenamientos de mucho valor agregado. El café es considerado clave para el desarrollo de países productores y representa el producto más comercializado en el mundo, siendo solo superado solo por el petróleo (Bosselmann et al., 2009), además, es la bebida más consumida después del agua. La dinámica de producción mundial de café constituye una fuente vital de empleo e ingresos para 25 millones de personas y es para algunos países una fuente crucial para el sostenimiento de servicios medioambientales (Chiquillo et al., 2013).

En el Perú la producción de café representa el principal producto de agroexportación, siendo un importante impulsor de la economía nacional. No obstante, los cambios medio ambientales presentan nuevos desafíos para los productores, entre ellos: la reducción de los recursos naturales, una mayor incidencia de plagas y enfermedades como la broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari) y la roya (*Hemileia vastatrix* Berkeley and Broome), entre otras adversidades como consecuencia del cambio climático (Caswell et al., 2012; Jezeer y Verweij, 2015).

El café por tradición ha sido cultivado bajo sombra de diferentes especies de árboles (Farfán y Mestre, 2004). Las ventajas de los sistemas agroforestales relacionados al cultivo bajo sombra están ampliamente investigadas y es evidente que estos sistemas tienen un papel importante en la conservación de la biodiversidad (Bhagwat et al., 2008; Pérez et al., 2012). Las especies usadas como sombra tienen un rol esencial en la generación de condiciones microclimáticas y su efecto puede contribuir a regular ciertas plagas y enfermedades (Suatunce et al., 2009; Mouen Bedimo et al., 2012); pero también aportar productos comerciales en beneficio de los pequeños caficultores, que buscan diversificar su economía (Aguilar et al., 2001; Hagggar et al., 2011). El efecto de las diferentes interacciones en los sistemas agroforestales (café y árboles de sombra) es influenciado por las condiciones del medio (suelo/clima) así como de la elección del genotipo (especie, variedad) (Farfán y Urrego, 2004).

La importancia del conocimiento del desarrollo foliar y de otras características agronómicas en la planta de café, así como el estado fitosanitario y la fertilidad del suelo son de utilidad para determinar el potencial de producción. De

igual forma, en los últimos años, debido a la disponibilidad de programas estadísticos (software) y al conocimiento comprensivo de cómo responden las plantas a los factores de clima y suelo, ha sido posible desarrollar metodologías para evaluar el comportamiento del crecimiento y la producción de los principales cultivos (Thornley y France, 2007). Por tanto, y debido a la importancia de este rubro para la economía de los países, es importante evaluar el desarrollo y crecimiento del café desde sus primeras etapas de crecimiento, esto con el fin de estimar el potencial productivo del cultivo, especialmente ante la amenaza del cambio climático (Lin, 2007).

Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el comportamiento de tres variedades de café establecidas bajo sombra de tres especies de arbóreas, considerando datos de variables agronómicas con el fin de recomendar la variedad que más se adapte a las condiciones agroclimáticas de la zona en estudio como una contribución en el conocimiento del potencial productivo y de manejo del cultivo de café para usuarios, investigadores y agricultores, lo que permitiría una optimización de recursos y una ayuda en la toma de decisiones sobre al manejo del cultivo.

Materiales y métodos

Localización del estudio

El ensayo se realizó en el distrito cafetalero de Huambo, Provincia de Rodríguez de Mendoza, en el Departamento de Amazonas, norte del Perú. A 1650 m.s.n.m., con un promedio de 19 °C. y una precipitación de 1387 mm/año.

Características agronómicas de las variedades

Con el fin de evitar errores en la toma de datos, durante la etapa de establecimiento se realizó la siembra de las plantas faltantes en los tratamientos del estudio (Arcila et al., 2007). Las observaciones de las características agronómicas fueron realizadas cada 30 días hasta el día 150 después del establecimiento del cultivo, para un total de cinco observaciones.

Las variables agronómicas evaluadas fueron: altura de planta, altura hasta la primera hoja, número de hojas/planta, estado general de la planta y diámetro del tallo, en cinco plantas por unidad experimental en cada uno de los nueve tratamientos y en los tres bloques, para un total de 135 plantas estudiadas. Es importante anotar que en cada medición se tomaron las mismas plantas, lo que indica la generación de datos longitudinales.

Las variables medidas fueron las siguientes: (1) Altura de planta (A) desde el nivel del suelo hasta el brote apical, empleando una escala decimal. Para esta variable se tomaron en cuenta las plantas con altura uniforme para evitar errores en el promedio general entre evaluaciones; (2) Altura de planta hasta la primera hoja (APH) se midió desde el nivel del suelo hasta la inserción de la primera hoja; (3) Número de hojas (NH) por planta; y (4) Diámetro de tallo (DT) utilizando un calibrador de Vernier a 10 cm sobre el nivel del suelo hasta 180 días después del establecimiento, y a 20 cm después de esta edad.

Estado general de la planta (EP)

Esta característica fue evaluada utilizando una calificación visual sobre desarrollo y vigor de las plantas (Tabla 1).

Tabla 1. Escala para el estado general de la planta.

Escala	Estado
1	Plantas raquíticas, con poco vigor vegetal
2	Plantas con buen vigor vegetal
3	Plantas sanas de excelente vigor vegetal sin deficiencias nutricionales.

Diseño experimental

Los tratamientos (Tabla 2) fueron dispuestos en un diseño de bloques completos al azar, colocados en forma perpendicular a la gradiente del suelo. Para las observaciones, en cada unidad experimental se tomaron cinco plantas al azar.

Tabla 2. Tratamientos evaluados en el ensayo. Departamento de Amazonas, norte del Perú

Tratamientos	Descripción (especie arbórea/var. café)
T ₁	<i>Eucalyptus torrelliana</i> + Catimor
T ₂	<i>Eucalyptus torrelliana</i> + Maragogipe
T ₃	<i>Eucalyptus torrelliana</i> + Castillo
T ₄	<i>Colubrina glandulosa</i> + Catimor
T ₅	<i>Colubrina glandulosa</i> + Maragogipe
T ₆	<i>Colubrina glandulosa</i> + Castillo
T ₇	<i>Pinus tecunumanii</i> + Catimor
T ₈	<i>Pinus tecunumanii</i> + Maragogipe
T ₉	<i>Pinus tecunumanii</i> + Castillo

Análisis de datos

Los datos fueron procesados usando el paquete estadístico Minitab V-18 y analizados como longitudinales, por tanto, se realizó un análisis en el tiempo para un mismo espacio, de acuerdo con el procedimiento de prueba que se detalla a continuación (Greenhouse y Geisser, 1959):

Análisis individual de los experimentos.

Utilizando un Diseño en Bloques Completos al Azar (DBCA), donde: y_{ij} = observaciones; μ = media poblacional; τ_i = efecto de tratamiento; β_j = efecto de bloque; ϵ_{ij} = error experimental

Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene's).

Mediante análisis combinado en el tiempo con el modelo lineal aditivo (diseño en bloques completos al azar/tiempo como factor): $y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \lambda_k + \tau_i * \lambda_k + \epsilon_{ijk}$, donde: y_{ijk} = observaciones; μ = media poblacional; τ_i = efecto de tratamiento; β_j = efecto de bloque; λ_k = efecto de tiempo (evaluación); $\tau_i * \lambda_k$ = efecto de interacción; ϵ_{ijk} = error experimental.

Resultados

Análisis individual de datos

Los resultados obtenidos una vez aplicado al análisis de varianza (Tablas 3 y 4), para el caso de las variables medidas en escala de razón o proporción (A, APH y DT) con prueba F, y para las variables medidas en escala ordinal (NH y EP) con prueba de Friedman, además de la prueba de comparaciones múltiples por mínima diferencia significativa (DMS) en aquellos casos que se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) o altamente significativas entre los tratamientos ($P < 0.01$) mostraron que, la variedad Castillo tanto con sombra de *E. torrelliana* como de *P. tecunumanii* presentó los mejores resultados en A y DT, no obstante el mejor resultado para APH se observó en esta misma variedad Castillo bajo sombra de *C. glandulosa* (Figura 1). Los mayores valores de NH (Figura 2) y de EP (Figura 3) se observaron en los sistemas variedad Castillo con sombra de *P. tecunumanii* seguido por el sistema de esta variedad con sombra de *E. torrelliana*.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Para esta prueba, en el caso de las variables continuas se utilizó el criterio de la varianza como medida de dispersión, mientras que en el caso de variables discretas el criterio utilizado fue el rango intercuartílico de la medida de dispersión considerada (Tabla 5).

Tabla 3. Resultados análisis de varianza para altura de planta, altura hasta la primera hoja y diámetro de tallo.

Variable	Evaluación (días)	Análisis de varianza		Comparaciones Múltiples	
		Estadístico	Probabilidad	Tratamiento (> valor)	Tratamiento (< valor)
A	30	F: 6.20 **	0.0000	9	5
	60	F: 8.40 **	0.0000	9	5
	90	F: 11.28 **	0.0000	9, 6, 3	5, 2
	120	F: 10.48 **	0.0000	9	5, 2
	150	F: 10.20 **	0.0000	9	5, 2
APH	30	F: 2.70 *	0.0127	6, 2	1, 4, 3, 9, 7
	60	F: 2.10 *	0.0492	6	1, 3, 4, 7
	90	F: 1.21 ns	0.3049	6	4, 3, 5
	120	F: 2.88 **	0.0084	6	1
	150	F: 3.15 **	0.0045	6	5, 2
DT	30	F: 4.49 **	0.0002	6	2
	60	F: 5.07 **	0.0001	6	2, 7, 5
	90	F: 7.85 **	0.0000	9, 6	2
	120	F: 9.21 **	0.0000	9	2
	150	F: 7.18 **	0.0000	9	2

ns: no significativo (P > 0.05); *: significativo (P < 0.05); **: altamente significativo (P < 0.01)

Tabla 4. Resultados análisis de varianza para número de hojas por planta y estado general de la planta.

Variable	Evaluación (días)	Análisis de varianza		Comparaciones Múltiples	
		Estadístico	Probabilidad	Tratamiento (> valor)	Tratamiento (< valor)
NH	30	F: 14.27 **	0.0000	6	5, 2
	60	F: 8.70 **	0.0000	9, 3, 6, 4	5, 2
	90	F: 6.49 **	0.0000	9, 3, 1, 4	5, 2
	120	F: 6.73 **	0.0000	9	2, 5
	150	F: 5.85 **	0.0000	9	5, 2
EP	30	χ^2 : 11.95**	0.0000	6	5, 2
	60	χ^2 : 12.47**	0.0000	9, 3, 4, 6, 1, 7, 8	5, 2
	90	χ^2 : 11.67**	0.0000	3, 9	2
	120	χ^2 : 12.70**	0.0000	3, 9	2, 5
	150	χ^2 : 10.39**	0.0000	3, 9	2

ns: no significativo (P > 0.05); *: significativo (P < 0.05); **: altamente significativo (P < 0.01)

Análisis combinado en el tiempo

En la Tabla 6 se incluyen los resultados obtenidos en el análisis de varianza conjunto incorporando el tiempo (evaluación) como factor y midiendo el efecto de la interacción tratamiento x tiempo para las variables que presentaron homogeneidad de varianzas entre las cinco evaluaciones en el tiempo; específicamente, altura de planta hasta la primera hoja (APH) y estado general de la planta (EP).

Discusión

El estudio demuestra el potencial de las especies forestales usadas como sombra de los sistemas agroforestales con café. En los resultados se encontró variación significativa (P < 0.01) en la interacción entre las especies maderables y su efecto sobre las distintas variedades de café. Cuyo análisis de las variables altura de planta, número de hojas por planta, estado general de la planta y diámetro de tallo muestra que la variedad Castillo

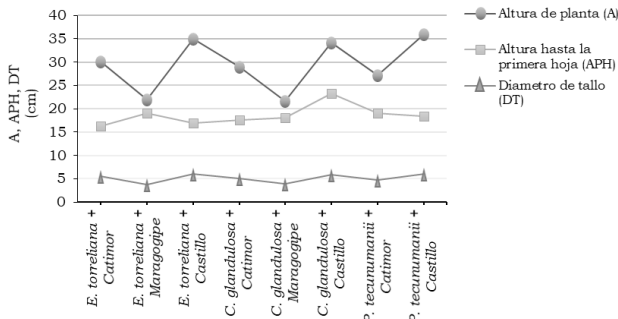


Figura 1. Resultados comparativos de las variables altura de planta, altura hasta la primera hoja y diámetro de tallo para los distintos tratamientos.

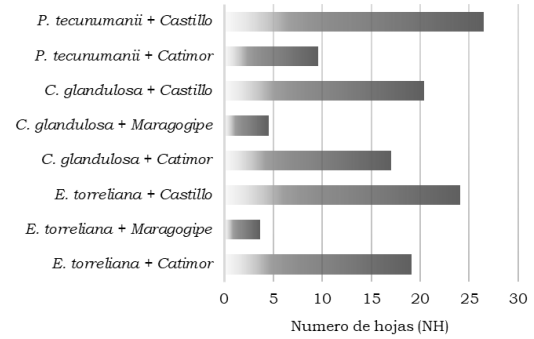


Figura 2. Resultados comparativos del número de hojas para los distintos tratamientos

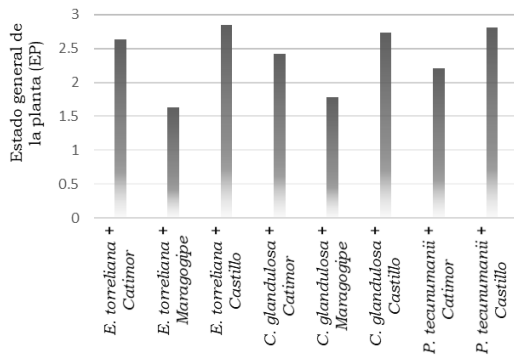


Figura 3. Resultados comparativos del estado general de la planta para los distintos tratamientos

Tabla 5. Resultados prueba de homogeneidad de varianzas.

Variable	Prueba de homogeneidad (Levene's)	
	Estadístico	P
Altura de planta (A)	6.84 **	0.0000
Altura de planta hasta la primera hoja (APH)	1.71 ns	0.1460
Número de hojas (NH) por planta	15.28 **	0.0000
Estado general de la planta (EP)	1.77 ns	0.1340
Diámetro de tallo (DT)	34.53 **	0.0000

ns: no significativo (P > 0.05); * : significativo (P < 0.05); **: altamente significativo (P < 0.01)

Tabla 6. Resultados análisis de varianza conjunto.

Variable	Fuente de Variación	Análisis de Varianza		Comparaciones Múltiple	
		Estadístico	probabilidad	Tratamiento (> valor)	Tratamiento (< valor)
APH	T	F: 6.50 **	0.0000	6	2, 7, 9, 5, 3, 4, 1
	E	F: 81.70 **	0.0000	5	1
	T*E	F: 1.30 ns	0.1430	Independientes	
EP	T	F: 54.99 **	0.0006	3	5, 2
	E	F: 3.94 **	0.0036	2	4, 3, 1
	T*E	F: 1.06 ns	0.3867	Independientes	

ns: no significativo (P > 0.05); * : significativo (P < 0.05); **: altamente significativo (P < 0.01); T: tratamiento; E: tiempo (evaluación); T*E: interacción

cultivada bajo el dosel arbóreo de *P. tecunumanii* y *C. glandulosa* logra un mejor desempeño frente a los demás tratamientos.

Una posible razón de esta diferencia puede deberse a la competencia por nutrientes y agua, y también porque cada cultivo (variedad o especie) requiere distintas condiciones de radiación solar

para su crecimiento (Farfán y Urrego, 2004; Loreto et al., 2017). Dicho efecto puede tomar mayor notoriedad con los eventos climáticos extremos actuales, que sugieren perturbaciones en el equilibrio entre los factores del clima y la vegetación que coexiste en un determinado agroecosistema, y que eventualmente pueden afectar la producción de café (Lin, 2007).

Esto también habla de la necesidad de ajustar la tecnología agroforestal, para favorecer la influencia recíproca entre genotipos y/o especies dentro de los agroecosistemas (Aguilar et al., 2001; Farfán y Mestre, 2004). Dado que, la adecuada selección de árboles puede atenuar los efectos de déficit hídrico y mantener la fertilidad del suelo, asimismo controlar la erosión del suelo (Haggar et al., 2011; Pérez et al., 2012) permitiendo un mejor desarrollo del café.

Por otro lado, establecer plantaciones de café bajo sombra de especies arbóreas, para nuestro análisis favorece a la economía de los caficultores; pues se ha reportado que influyen sobre la calidad física y sensorial del grano (Bosselmann et al., 2009) e incrementa la diversidad de organismos de control biológico que contribuyen en la reducción de la incidencia de plagas (Suatunce et al., 2020; Mouen Bedimo et al., 2012); no obstante, un deficiente manejo de la cobertura aérea puede favorecer la infestación por ciertas plagas (Jezeer et al., 2015). Además, es posible que los productores de café puedan complementar sus ingresos a través de la venta de los productos obtenidos de los árboles usados como sombra. En términos generales, el efecto de la sombra sobre la productividad y calidad del café está estrechamente relacionado con el manejo de sombra y la adecuada combinación de árboles para fortalecer el equilibrio natural (Haggar et al., 2011).

Conclusiones

En este estudio se demuestra que el comportamiento agronómico del café medido en altura de planta (A), número de hojas (NH), diámetro del tallo (DT) y estado general de la planta (EP), esta relacionado con la forma en la que interactúan sus componentes (especie de sombra y variedad de café). Tal es el caso de la variedad Castillo que bajo la sombra de *P. tecunumanii* y *C. glandulosa* mostró un mejor desarrollo, mientras, la variedad Maragogipe tanto con sombra de *E. torreliana* como con sombra de *C. glandulosa* muestra un deficiente comportamiento agronómico. En líneas generales, los resultados reflejan el potencial de las especies forestales usadas como sombrío de los cafetales, sin embargo, es fundamental ampliar el estudio de sus bondades.

Referencias

- Aguilar, A.; Beer, J.; Vaast, P.; Jimenez, F.; Staver, CH.; y Kleinn, CH. 2001. Desarrollo del café asociado con *Eucalyptus deglupta* o *Terminalia ivorensis* en la etapa de establecimiento. *Agroforesteria en las Americas* 8(30): 28-31. URL: <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/6026>
- Arcila, J.; Farfan, F.; Moreno, A.; Salazar, L.; y Hincapié, E. 2007. Sistemas de producción de café en Colombia. *Revista Cenicafe*, Colombia. 309 p. URL: <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/720>
- Bhagwat, S.A.; Willis, K.J.; Birks, H.J.B.; and Whittaker, R.J. 2008. Agroforestry: a refuge for tropical biodiversity? *Trends Ecol. Evol.* 23: 261-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.01.005>
- Bosselmann, A.S.; Dons, K.; Oberthur, T.; Olsen, C.S.; Ræbild, A.; and Usma, H. 2009. The influence of shade trees on coffee quality in small holder coffee agroforestry systems in Southern Colombia. *Agric. Ecosyst. Environ.* 129: 253-260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.09.004>
- Caswell, M.; Méndez, V.E.; and Bacon, C.M. 2012. Food security and smallholder coffee production: current issues and future directions. ARLG Policy Brief # 1. University of Vermont: Burlington, VT. URL: <https://scholarcommons.scu.edu/ess/2/>
- Chiquillo, K.; Gaitán, N.; y Vargas, L. 2013. Descripción de la dinámica agroproductiva-comercial del subsector café en El Salvador y aproximación al análisis de equidistribución del ingreso generado 1990-2011. *Revista Realidad*. 137: 417-455. URL: http://www.uca.edu.sv/upload_w/8/archivo/1391120570-52ead0baa15b9.pdf
- Farfán, F.; y Mestre, A. 2004. Respuesta del café cultivado en un sistema agroforestal a la aplicación de fertilizantes. *Cenicafé* 55(2):161-174. URL: <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc055%2802%29161-174.pdf>
- Farfán, F.; y Urrego, J.B. 2004. Comportamiento de las especies forestales *Cordia alliodora*, *Pinus oocarpa* y *Eucalyptus grandis* como sombrío e influencia en la productividad del café. *Cenicafé* 55(4):317-329. URL: [https://www.cenicafe.org/es/publications/arc055\(04\)317-329.pdf](https://www.cenicafe.org/es/publications/arc055(04)317-329.pdf)
- Greenhouse, S.; and Geisser, S. 1959. An extension of Box's results on the use of the F distribution in multivariate analysis. *The Annals of Mathematical Statistics*, 29.
- Haggar, J.; Barrios, M.; Bolaños, M.; Merlo, M.; Moraga, P.; Munguia, R.; Ponce, A.; Romero, S.; Soto, G.; and Staver, C. 2011. Coffee agroecosystem performance under full sun, shade, conventional and organic management regimes in Central America. *Agroforestry Systems* (3): 285-301. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10457-011-9392-5>
- Jezeer, R.E.; y Verweij, P.A. 2015. Café en Sistema Agroforestal - doble dividendo para la biodiversidad y los pequeños agricultores en Perú. Hivos, The Hague, Holanda. URL: https://www.researchgate.net/publication/301694184_Cafe_en_sistemas_Agroforestales_Doble_dividendo_para_la_biodiversidad_y_los_pequenos_agricultores_en_Peru
- Lin, B.B. 2007. Agroforestry management as an adaptive strategy against potential microclimate extremes in coffee agriculture. *Agric. For. Meteorol.* 144: 85-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2006.12.009>

- Loreto, D.; Esperón-Rodríguez, M.; and Barradas, V.L. 2017. The climatic-environmental significance, status and socioeconomic perspective of the grown-shade coffee agroecosystems in the central mountain region of Veracruz, Mexico. *Investigaciones Geográficas* 92: 87-100. DOI: <https://doi.org/10.14350/rig.51876>
- Mouen Bedimo, J.A.; Dufour, B.P.; Cilas, C.; and Avelino, J. 2012. Effets des arbres d'ombrage sur les bioagresseurs de *Coffea arabica*. *Cahiers Agricultures* 21(2-3): 89-97. DOI: <https://doi.org/10.1684/agr.2012.0550>
- Pérez, J.; Valdés, E.; y Ordaz, V.M. 2012. Cobertura vegetal y erosión del suelo en sistemas agroforestales de café bajo sombra. *Terra Latinoamericana*, 30(3): 249-259. URL: <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v30n3/2395-8030-tl-30-03-00249.pdf>
- Suatunce, P.; Díaz, G.; y García, L. 2009. Evaluación de cuatro especies forestales asociadas con café (*Coffea arabica* L.) y en monocultivo en el litoral ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología* 2(2): 29-34. URL: http://www.utec.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C1_articulo_520092.pdf
- Thornley, J.; and France, J. 2007. Growth functions. En: *Mathematical Models in Agriculture. Quantitative methods for the plant, animal and ecological sciences*. 2nd Ed. Cromwell Press, Trowbridge. Pp. 136-171.

Efecto de hongos formadores de micorrizas arbusculares en clones de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra

Effect of arbuscular mycorrhizae in clones of *Coffea arabica*, Caturra variety

Geomar Vallejos-Torres^{1,3*}, Tito Sánchez^{1,2}, Marco A. García¹, Marcial Trigoso¹ y Luis A. Arévalo¹

1. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Jr. Belén Torres de Tello 135, San Martín - Perú. 2. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Calle Higos Urco N° 342 - 350 - 356, Amazonas-Perú. 3. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Martín, Jr. Maynas N° 177, Tarapoto, San Martín, Perú. *Autor para correspondencia: gvallejost@gmail.com

Rec: 2018-05-11 Acep: 2019-12-26

Resumen

Se evaluó el efecto de la inoculación de hongos micorrícicos arbusculares en las características morfológicas de plantas clonales de café (*Coffea arabica* L.) variedad Caturra en ambientes de invernadero. El estudio fue realizado en la provincia de Rodríguez de Mendoza, región Amazonas, Perú, utilizando un diseño completamente al azar con tres repeticiones y trece tratamientos. Los hongos micorrícicos fueron aislados de fincas cafetaleras y multiplicados con plantas trampas de maíz (*Zea mays*). Los clones de café fueron enraizados en sustrato esterilizado y posteriormente inoculados con 1500 esporas del hongo. Los mejores resultados se encontraron con los hongos provenientes de San Nicolás-1 inoculados en la variedad Típica, inóculos provenientes de Omia V en esta misma variedad y de Omia VI en la variedad Caturra. Con estos inóculos se encontraron diferencias ($P < 0.005$) en altura de planta, producción de MS de la parte aérea y radicular en relación con el testigo sin inocular. La colonización radicular y la población de micelio extra-radicular fueron afectados por la procedencia de los HMA. Este estudio confirma que el cultivo de café es dependiente de la asociación simbiótica con hongos micorrícicos arbusculares nativos (HMA-N), ayudando en la absorción de nutrientes y agua necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Palabras clave: *Café, frecuencia micorrícica, inóculo, intensidad micorrícica, micelio.*

Abstract

The effect of inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi on the morphological characteristics of coffee clonal plants (*Coffea arabica* L.) Caturra variety in greenhouse environments was evaluated. The study was conducted in the province of Rodríguez de Mendoza, Amazonas region, Peru, using a completely randomized design with three repetitions and thirteen treatments. Mycorrhizal fungi were isolated from coffee farms and multiplied with corn trap plants (*Zea mays*). The coffee clones were rooted in sterilized substrate and subsequently inoculated with 1500 spores of the fungus. The best results were found with fungi from San Nicolás-1 inoculated in the Typical variety, inocula from Omia V in this same variety and from Omia VI in the Caturra variety. With these inoculums, differences were found ($P < 0.005$) in plant height, production of DM of the aerial and root part in relation to the uninoculated control. Root colonization and the population of extra-root mycelium were affected by the origin of the AMF. This study confirms that coffee cultivation is dependent on the symbiotic association with native arbuscular mycorrhizal fungi (HMA-N), aiding in the absorption of nutrients and water necessary for plant growth and development.

Keywords: *Coffee, mycorrhizal frequency, inoculum, mycorrhizal intensity, mycelium.*

Introducción

La relación simbiótica que se establece entre los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y las raíces promueve un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas. Los hongos se benefician con el suministro de carbohidratos provenientes de la planta y ésta, a su vez, desarrolla una mayor capacidad de absorción de nutrientes del suelo a través de las raíces. lo que promueve su crecimiento y desarrollo (Martín et al., 2010). Los HMA constituyen vías alternativas para la nutrición de las plantas con efectos positivos sobre los rendimientos de los cultivos (Terry et al., 2006). Estos hongos forman simbiosis con las raíces de las plantas de manera natural y se encuentran en 95% de las especies vegetales (Miransari, Baharami, Rejali y Malakouti, 2009).

El micelio de los HMA funciona como un sistema radicular complementario de las plantas (Hernández et al., 2008) que se extiende más allá de la zona de reserva de nutrientes cercana a la raíz (Bucher, 2006), además cumplen funciones en la búsqueda, absorción y transporte de nutrientes para la planta, especialmente aquellos de lenta difusión en la solución del suelo como fósforo, zinc, cobre y amonio, con capacidad para absorber hasta 40 veces más que un pelo radicular gracias a su amplia exploración extraradicular (Peña-Venegas y Cardona, 2010).

El café es considerado como un cultivo micótrofo obligatorio, con una alta dependencia micorrícica según la especie y la etapa de crecimiento (Fernández et al., 2005), siendo la etapa de vivero la más adecuada para la inoculación con hongos micorrícicos (Trejo et al., 1998).

Según Morton y Benny (1990) y Del Águila et al., (2018) el sistema de hifas que se desarrolla fuera de la raíz permite una mayor exploración de los suelos incrementando, de esta manera, la captura y absorción por la planta de nutrientes de baja disponibilidad como el fósforo, cobre y zinc.

En la provincia de Rodríguez de Mendoza, Amazonas, Perú, el cultivo de café es un renglón importante dentro de la actividad agrícola y económica, alcanzando en 2015 una producción de 6914 t de café pergamino. Según el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI, 2015), en 2014 las provincias con mayor producción de café en la región de Amazonas fueron Utcubamba, Luya y Rodríguez de Mendoza.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivo evaluar la efectividad de 12 fuentes de inóculos de HMA-Nativos sobre la altura de planta, la producción de MS radicular y

la parte aérea y el área foliar en plantas clonadas de café variedad Caturra en los ambientes del invernadero en la provincia Rodríguez de Mendoza, Región Amazonas-Perú.

Materiales y métodos

Área de estudio y localización de las fincas

El estudio se realizó en la provincia Rodríguez de Mendoza, región Amazonas-Perú, entre las coordenadas 6°18'57"S y 77°32'17"O, a 1295 m.s.n.m. El clima es cálido y húmedo y la región corresponde al ecosistema Ceja de Selva. La época más lluviosa ocurre entre noviembre y marzo, y la temperatura es variable entre 12 y 30 °C. Para el estudio fueron seleccionadas 12 fincas cafetaleras (Tabla 1) de las variedades Típica y Caturra, localizadas en los distritos Cochamal, Huambo, Mariscal Benavides, Omia y San Nicolás, cultivados con una tecnología intermedia tradicional en la región.

Tabla 1. Procedencia de consorcios de hongos micorrícicos arbusculares nativos en cultivo de café. Amazonas, Perú.

Tratamiento (no.)	Procedencia	Variedad
T0	Testigo (suelo estéril)	
T1	San Nicolás - I	Típica
T2	Huambo - I	Típica
T3	Cochamal	Caturra
T4	Omia - I	Caturra
T5	Omia - II	Típica
T6	Omia - III	Caturra
T7	San Nicolás - I	Típica
T8	Mariscal Benavides	Caturra
T9	Omia - IV	Típica
T10	Omia - V	Típica
T11	Omia - VI	Caturra
T12	Huambo - II	Caturra

Diseño experimental

Los tratamientos fueron dispuestos en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), con 13 tratamientos (12 consorcios de HMA-Nativos más un testigo), con tres repeticiones y cuatro plantas por repetición, para un total de 39 unidades experimentales.

Recolección y multiplicación de HMA-Nativos

La recolección se hizo en suelo rizosférico en 12 fincas cafetaleras a 30 cm a partir de la base del tallo principal de la planta de café y 30 cm de profundidad, de acuerdo con la recomendación de Montilla et al., (2005). Las muestras fueron llevada a laboratorio, donde se dividieron en dos submuestras, una de ellas para realizar el conteo inicial de esporas y la otra fue llevada a los ambientes del invernadero para multiplicar las esporas, utilizando maíz (*Zea mays* L.) como planta nodriza (Sieverding, 1991). Después de 60 días, se suspendió la aplicación de riego a estas plantas y 20 días más tarde fueron cosechadas a ras de suelo (Del Águila et al., 2018).

Se preparó una mezcla de suelo esterilizado en horno a 200 °C y arena de río desinfectado en agua hervida 100 °C, en proporción (2:1 v/v). El contenido de P en la mezcla fue de 13 mg/kg considerado como medio. Los clones de café variedad Caturra enraizados en micro túneles fueron inoculados individualmente con 1500 esporas de cada consorcio micorrícico obtenido en las plantas nodriza.

Clonación de plantas de café

Se seleccionaron 60 plantas de café de la variedad Caturra con alta productividad y tolerancia a roya, con un promedio de edad entre 6 y 8 años. Entre 60 y 90 días después de la inducción, proceso que consiste en agobiar las plantas de café con dirección al suelo formando un ángulo de 45° y poda de ramas laterales para la activación de auxinas en las yemas axilares, generando brotes ortotrópicos. Estos brotes fueron cosechados y conducidos a laboratorio para su acondicionamiento, estandarizando el tamaño a 5 cm, con dos hojas y 50% de área foliar. Con el fin de prevenir la presencia de hongos, los brotes fueron desinfectados con Antracol 70% PM a una concentración de 3 g/l de agua durante 10 min. A continuación, la parte basal del brote fue introducida en una solución de hormona de ácido indol-butírico (AIB) a 2000 ppm aplicado a cada brote mediante el método de inmersión rápida, posteriormente fueron establecidos en cámara húmeda. Para mantener la humedad relativa en rangos mayores que 80%, cada hora durante 3 min se aplicó riego nebulizado en el interior del microtúnel durante el proceso de propagación clonal. Las plántulas de café clonadas fueron colocadas en un vivero con sombra al 80% por un periodo de 15 días y después fueron transferidos a otro vivero que tenía sombra al 50% por 15 días más completando así el proceso de aclimatación (Vallejos-Torres et al., 2019).

Parámetros evaluados

Los efectos de los consorcios micorrícicos (tratamientos) aplicados fueron evaluados tanto en las características morfológicas de las plántulas de café como en las variables fúngicas. Entre las características de la planta se incluyeron:

Altura de plántula (H)

La medición se realizó con una regla métrica desde la base del tallo hasta el ápice de la planta. Después de cada medición, el material utilizado fue desinfectado con alcohol al 96%, para evitar la contaminación entre los consorcios en estudio (Del Águila et al., 2018).

Área foliar (AF)

Para esta medición, se colocaron todas las hojas de las plantas de café en una superficie oscura y fueron fotografiadas claramente para determinar el área foliar. La medición se hizo con el software ASSES, que permite calcular el área foliar mediante colores de contraste tomando como referencia un objeto calibrador con área conocida (Del Águila et al., 2018).

Materia seca radicular (MSR)

La determinación de materia seca radicular se hizo por secado de las raíces lavadas de las plantas de café, en estufa a 60 °C por 72 h y el pesaje en una balanza analítica (Del Águila et al., 2018). Como características fúngicas se determinaron:

Porcentaje de colonización (PC).

Para esta determinación se hizo tinción de raíces siguiendo la metodología de Phillips y Hayman (1970) con azul de Trypano, vinagre y agua oxigenada antes de colocarlas en baño maría. Luego de la tinción fueron cortadas en trozos de 1 cm para obtener en total 30 fragmentos que fueron colocados en láminas portaobjetos y observadas en microscopio compuesto con aumento de los objetivos a 100X. Para el cálculo del porcentaje de colonización de hifas interna o frecuencia micorrícica (F.M.) se utilizó la fórmula de Sieverding (1983) (Ecuación 1) y para la evaluación de la intensidad micorrícica (I.M.) se aplicó fórmula de Trouvelot y Kough (1986) (Ecuación 2).

$$F.M. (\%) = \frac{N^{\circ} \text{ Campos infectados}}{N^{\circ} \text{ Campos observados}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

$$I.M. (\%) = \frac{(n1 + 5(n2) + 30(n3) + 70(n4) + 95(n5))}{N} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde, N : Número total de raíces evaluadas y n : Número de fragmentos clasificados.

Longitud de micelio extra-radicular (LMER)

Para esta medición se pesó una muestra de 1 g de suelo la cual fue sometida al proceso de tinción de micelio extra-radicular propuesta por Robles (2009), antes de ser colocada en placas Petri con cuadrantes de 0.5 cm² en la base. Para la evaluación se utilizó un estereoscopio con aumentos de 3x y 4.5x, contando la intersección hifa/línea (Robles, 2009). El número de intersecciones obtenidas se reemplazó en la fórmula de determinación de longitud de micelio extra-radicular (cm) propuesta por Newman (1966).

Análisis estadísticos

Los datos de altura, materia seca, área foliar y longitud de micelio fueron transformados por $\sqrt{x+1}$ (Padrón, 1996); mientras que para los datos de intensidad y frecuencia micorrícica se utilizó la transformación angular $\arcsen \sqrt{x\%}$ (Box y Hunter, 1988). Con los datos obtenidos se realizó el análisis de variancia y para la comparación de las medias se utilizó la prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Resultados y discusión

Efecto de fuentes de inóculos de HMA nativos

El análisis de varianza (Tabla 2) para los diferentes tratamientos mostró diferencias ($P < 0.05$) para altura de planta-H, materia seca radicular-MSR, área foliar AF, intensidad micorrícica-IM, frecuencia micorrícica-FM, longitud de micelio-

LM, sugiriendo que las variables evaluadas dependen, entre otras condiciones, de las fuentes de inóculos de HMA nativos.

La prueba de Tukey (Tabla 3) para los diferentes tratamientos mostró que los consorcios más eficientes en las variables morfológicas y fúngicas fueron el consorcio procedente de las fincas Omia-V (T10), San Nicolás-I (T1) y Omia-VI (T11), mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al testigo sin inoculación micorrícica.

El testigo presentó la menor tasa de crecimiento (altura) con 6.15 cm; mientras que la mayor altura se observó con el T10 Omia-V en la variedad Tipica. Entre los tratamientos con inoculación micorrícica se encontraron valores desde 6.83 hasta 8.09 cm, con una tasa de incremento desde 6% a 25% respecto al testigo; resultado similar encontraron Del Águila et al.,

Tabla 2. Cuadrados medios para el efecto del porcentaje de colonización de HMA nativos en características de planta de café (*Coffea arabica*), 120 días después del comienzo de la evaluación. Amazonas, Perú.

Fuente de variación	H (cm)	MSR (g)	AF (cm ²)	IM (%)	FM (%)	LM (cm)
SCM	3.072 *	0.223 *	12188.225 *	91.189 *	1063.77 *	6240.119 *
C.V. (%)	4.3	14.57	6.33	20.48	22.24	13.47
R ² (%)	72.87	71.06	87.44	88.43	81.97	98.37

* = Significativo ($P < 0.05$). H: altura; MSR: materia seca radicular; AF: área foliar; IM: intensidad micorrícica; FM: frecuencia micorrícica; LM: longitud de micelio; SCM: suma de cuadrados medios, C.V.: coeficiente de variación; R²: coeficiente de determinación

Tabla 3. Efecto de los HMA nativos en el porcentaje de inoculación y características de plantas de café (*Coffea arabica*). Amazonas, Perú.

Tratamientos (fuente de inóculo)	Características de planta			HMA		
	H (cm)	MSR (g)	AF (cm ²)	IM (%)	FM (%)	LM (cm)
T0	6.15 d	0.36 g	132.43 h	0	0	0
T1	8.02 a	0.73 b	235.16 ab	1.46 b	23.33 b	65.23 b
T2	7.35 b	0.65 bcd	179.42 def	0.65 cdef	7.60 ef	11.22 e
T3	6.83 cd	0.53 ef	172.49 fg	0.54 defg	12.14 cde	13.61 de
T4	6.86 cd	0.57 cdef	191.52 d	0.56 defg	10.56 de	17.33 d
T5	6.86 cd	0.62 bcdef	191.77 d	0.22 fg	5.87 ef	4.49 g
T6	6.84 cd	0.64 bcde	190.63 de	0.36 efg	5.83 ef	10.45 ef
T7	7.19 bc	0.54 def	183.60 def	0.97 bcde	19.72 bc	12.57 e
T8	7.05 bc	0.50 f	156.27 g	0.32 fg	4.17 ef	6.74 fg
T9	7.25 bc	0.64 bcde	209.73 c	1.06 bcd	20.00 bc	25.69 c
T10	8.09 a	0.95 a	247.42 a	4.28 a	36.94 a	75.59 a
T11	7.89 a	0.67 bc	226.52 b	1.24 bc	19.72 bc	24.68 c
T12	7.06 bc	0.57 cdef	174.32 ef	0.85 bcdef	16.11 bcd	17.17 d

H: altura; MSR: materia seca radicular; AF: área foliar; IM: intensidad micorrícica; FM: frecuencia micorrícica; LM: longitud de micelio. * $P < 0.05$.

(2018) en condiciones de vivero encontrando incrementos entre 35% y 40% respecto al testigo. Mientras que Trejo et al., (2011) en estudios realizados con inoculaciones de HMA a nivel de invernadero encontraron incrementos de altura de plantas de cafeto de 91% en comparación con el testigo siendo estos incrementos mayores que los encontrados en la presente investigación.

Para el área foliar se encontró una tendencia similar a la de la altura de planta; siendo nuevamente mayor con el T10, seguido de los tratamientos T1 y T11, consorcios micorrícicos procedentes de Omia-V, San Nicolás-I y Omia-VI. Al respecto Augé (2001) indica que la asociación de hongo-planta genera incrementos de las tasas fotosintéticas, por tanto, lo que favorece el crecimiento y desarrollo de la planta.

La intensidad (4.28%) y frecuencia de colonización (36.94%) micorrícica por HMA-N fueron más altas en el T10 (Tabla 3). Las diferencias en condiciones ambientales y el tipo de suelo influyen en los resultados de la baja colonización, así, los HMA de un suelo se comportan diferente a los de otros suelos (Hart y Reader, 2002). Por su parte, Sieverding (1991) encontró que la presencia de sombra en la simbiosis hongo-planta igualmente reduce la colonización micorrícica y la propagación de las esporas, lo que inhibe la colonización.

En la Figura 1 y 2 aparecen las correlaciones entre altura de planta con frecuencia e intensidad micorrícica en la variedad Caturra. Los resultados indican que el crecimiento y desarrollo de las plantas clonales de cafeto dependen de la

Tabla 4. Análisis de correlación lineal de Pearson entre variables morfológicas de clones de café y longitud de micelio extra-radicular (LMER). Amazonas, Perú.

Variables	Longitud
Altura de planta (cm)	0.72
Área foliar (cm ²)	0.78
Materia seca radicular (g)	0.70

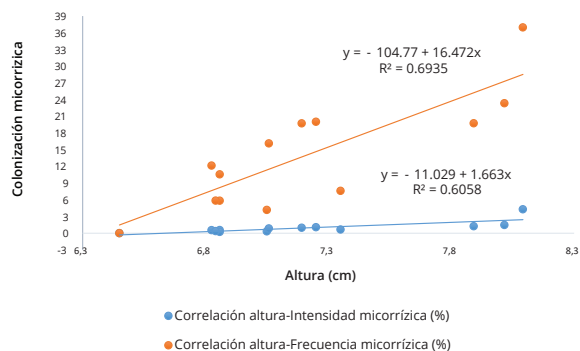


Figura 1. Correlación entre la frecuencia e intensidad Micorrízica y la altura de plantón de café variedad Caturra. Amazonas, Perú.

longitud de micelio extra-radicular, siendo todos los consorcios de HMA-N efectivos en todos los tratamientos inoculados, en comparación con el testigo sin inóculo de HMA-N. En la Tabla 4 se observa que las correlaciones entre la longitud de micelio extra-radicular con las variables morfológicas de planta clonal fueron siempre altas y positivas, con valores entre 0.70 y 0.78, lo que concuerda con los resultados de Evans y Miller (1988).

Los mejores consorcios de HMA-N con mayor longitud de micelio extra-radicular fueron aquellos procedentes de las localidades Omia-V, San Nicolás-I, Omia-IV y Omia-VI los cuales, a su vez, presentaron los mayores valores de altura de planta, área foliar y materia seca radicular, con valores promedios de micelio extra-radicular de 75.59 cm, 65.23 cm, 25.69 cm y 24.68 cm. Estos valores que el valor de 148.72 cm encontrado por del Águila et al., (2018). Esta diferencia es debida, entre otras causas, a la procedencia de los consorcios micorrícicos y a las condiciones particulares de los suelos (Hart y Reader, 2002). Las especies HMA encontradas en este estudio fueron: *Acaulospora rugosa*, *A. foveata*, *A. mellea*, *A. tuberculata*, *A. rhemii*, *Acaulospora* sp., *Glomus geosporum*, *G. sinuosum*, *Glomus* sp1., *Glomus* sp2. y *Ambispora appendicula*.

Conclusiones

El estudio demostró la importancia que tienen los consorcios de hongos HMA-N debido a su efecto positivo sobre el crecimiento en altura, área foliar y materia seca radicular de clones de café variedad Caturra, así mismo una buena capacidad colonizadora y longitud de micelio extra-radicular. La efectividad varió según la proveniencia de los consorcios micorrícicos, siendo los más eficientes aquellos recolectados en las localidades Omia-V, San Nicolás-I y Omia-VI, situados en dos distritos de Omia y San Nicolás, de la provincia de Rodríguez de Mendoza.

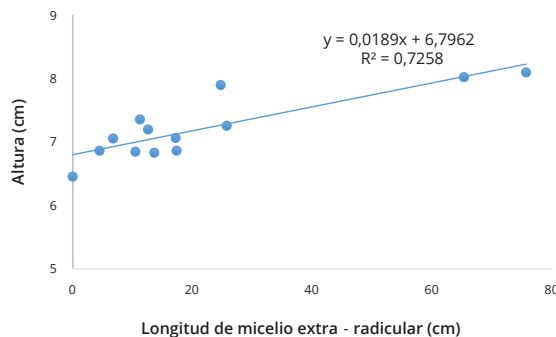


Figura 2. Correlación lineal entre la altura de planta de café y la longitud de micelio extra-radicular (LMER). Amazonas, Perú.

Agradecimientos

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad PNICP – INNOVATE PERÚ por financiar el presente trabajo de investigación en el marco de las actividades del proyecto Aplicación de Técnicas Innovadoras en la Propagación Clonal e Inoculación Micorrízica de Plantas Matrices de Café (*Coffea arabica* L.) con Alta Productividad en la Región Amazonas, CONVENIO N° 141 – PNICP – PIAP – 2015. A la Ing. Mirella Tejerina Caisan, Unidad de Monitoreo (INNOVATE PERÚ) y a los Ings. Lizette Méndez Fasabi, Jheiner Vásquez García y Hugo Frías Torres (UNTRM).

Referencias

- Augé, R. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42. DOI:10.1007/s005720100097
- Box, G. y W. Hunter. 1988. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de los datos y construcción de modelos. Ed. Reverté S.A., 675, Barcelona, España. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=245726>
- Bucher, M. 2006. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173:11-26. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x>
- Del Águila Parrillo, K. M; Vallejos Torres, G; Arévalo, L. A. y Becerra, A. B. 2018. Inoculación de Consorcios Micorrízicos Arbusculares en *Coffea arabica*, Variedad Caturra en la Región San Martín. *Información Tecnológica* 29(1):137-146. URL: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000100137>
- Evans, D., y Miller, M. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizas and the soil disturbance induced reduction of nutrient absorption in maize. I. Casual relations. *New Phytologist* 110(1), 67-74. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb00238.x
- Fernández-Martín, F; Rivera-Espinosa, R. A; Hernández-Jiménez, A; Herrera-Peraza, R. A. y Fernández-Suárez, K. 2005. Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares y diferentes relaciones suelo: humus de lombriz sobre el crecimiento del café (*Coffea arabica* L.) cv. Catuai bajo la etapa de vivero. *Revista Chapingo serie horticultura*. 11(1):175-184. URL: <https://www.redalyc.org/pdf/609/60912502025.pdf>
- Hart M, M. y Reader R, J. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153:335-334. DOI: 10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x
- Martín, G; Arias, L. y Rivera, R. 2010. Selección de las cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) más efectivas para la Canavalia ensiformis cultivada en suelo Ferralítico Rojo. *Cultivos Tropicales* 31(1):27-31. URL: <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v31n1/ctr04110.pdf>
- MINAGRI. 2015. Síntesis agro-económica del café. Dirección de estudios económicos e información agraria. Perú.
- Miransari, M., Bahrami, H. A., Rejali, F., & Malakouti, M. J. 2009. Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. *Soil and Tillage Research* 103(2):282-290. <https://doi.org/10.1016/j.still.2008.10.015>
- Montilla, E; R. Rivera; R. Herrera. y F. Fernández. 2005. Caracterización Espacial-Temporal de la Micorriza Nativa de dos plantaciones de café en Cuba. *Cultivos Tropicales* 26(4):5-12. URL: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193216160001.pdf>
- Morton J. B. y G. L. Beny (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes). A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491. URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=5784394&pid=S0187-7380201500020000500018&lng=es
- Newman, E. I. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology* 3:139-145. URL: <http://dx.doi.org/10.2307/2401670>
- Padrón, E. 1996. Diseños Experimentales con Aplicaciones a la Agricultura y la Ganadería. Editorial Trillas, México. URL: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=AGRISUM.xismethod=postformato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000158>
- Phillips, J. M. y Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-161. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Robles, C. 2009. Variación temporal de la diversidad de hongos de micorriza arbuscular y el potencial micorrízico en especies silvestres de Agave en Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional (IPN). 80. URL: <https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream>
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal in Tropical Agroecosystems. *Federal Republic of Germany: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (Gtz) GMBH*, 371. URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000093&pid=S0304-2847200400010000500027&lng=pt
- Temis, P. A; López, M. A; y Sosa, M. M. 2011. Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 5(2), 54-74. URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S2007-0934201600080201100034&lng=en
- Terry, E; Leyva, A. y Díaz, M. 2006. Biofertilizante y productos bioactivos, alternativas para la asociación maíz-tomate, en el periodo temprano de siembra. *Cultivos Tropicales* 27(2):5-11. URL: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/art%C3%ADculo_redalyc_193215872001.pdf
- Trejo, D; Hernández, E. y Ferrera-Cerrato, R. 1998. Ecología y comportamiento de la endomicorriza

arbuscular en el cultivo del café (*Coffea arabica* L.) Avances de la investigación micorrízica en México. R. Zulueta, M. A. Escalona, y Trejo, Edits.) Universidad Veracruzana, 283. URL: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.formato=2&cantidad=1&expresion=mn=047998>

Trejo D; Ferrera-Cerrato R; García R; Varela L; Lara, L. y Alarcón A. 2011. Efectividad de siete consorcios nativos de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de café en condiciones de invernadero y campo. *Revista Chilena de Historia Natural* 84:23-31. URL: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2011000100002>

Trouvelot, A; Kough, J.L. y Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. *Recherche de methodes*

d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En: Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. Eds.), *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae = Aspects physiologiques et genetiques des mycorrhizes: proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985.* Institut National de la Recherche Agronomique Press, Paris. DOI: 10.4236/jcc.2013.16005 4,507.

Vallejos-Torres, Geomar, Arévalo, Luis, Iliquin, Ingrid, y Solis, Reynaldo. (2019). Respuesta en Campo de Clones de Café a la Inoculación con Consorcios de Hongos Micorrízicos Arbusculares en la Región Amazonas, Perú. *Información tecnológica*, 30(6), 73-84. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000600073>

Induction of resistance and chemical management of mildew and Asian rust in soybean cultivation

Inducción de resistencia y manejo químico del mildew y la roya asiática en el cultivo de soya

Daniel Claudio Grigolo¹, Jean Carlo Possenti², Sergio Miguel Mazaro², Marcieli da Silva³, Karina Guollo^{4*}

1. Master in Agroecosystems – Federal Technological University of Parana – UTFPR, Dois Vizinhos – Brazil. danielgrigolo@gmail.com. 2. Agronomist. Doctor Teacher Federal Technological University of Paraná - UTFPR – Dois Vizinhos – Brazil. jpossenti@utfpr.edu.br; sergio@utfpr.edu.br. 3. Doctoral student - Federal Technological University of Parana – UTFPR, Pato Branco – Brazil. *Author for correspondence: marcelidasilva@hotmail.com. 4. Doctor - Federal Technological University of Parana – UTFPR, Pato Branco – Brazil. engkarinaguollo@hotmail.com

Rec: 2019-03-15 Acep: 2020-03-17

Abstract

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most cultivated in Brazil and has lost productivity due to the attack of disease pests. Thus, it is necessary to develop new technologies capable of reducing damages caused by such biological agents. The aim of this work was to evaluate whether the chemical management of ‘eyespot’ and the induction of resistance through the use of phosphites and acibenzolar-s-methyl (ASM), in association with commercial fungicides, affect the quality of soybean seeds. The study was conducted in the field, during two consecutive harvests in Dois Vizinhos, Paraná, Brazil, and a randomized blocks experimental designs was used. The response-variables evaluated were yield components, disease severity through specific diagrammatic scales, and seed quality attributes. The use of phosphite and ASM, with and without the combination of fungicides Glifosato, Azoxistrobina + Benzovindiflupir, Azoxistrobina + Ciproconazol and Picoxistrobina + Ciproconazol did not reduce the severity of the mildew and asian soybean rust. The use of combinations of different fungicides was sufficient to mitigate the severity effects of the mildew and asian rust on soybean crop.

Keywords: Acibenzolar-S-methyl; *Glycine max*; Phosphites.

Resumen

El cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), uno de los más extensos en Brasil, ha perdido productividad debido al ataque de enfermedades. Esto ha creado la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías con el fin de reducir los daños causados por agentes biológicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el manejo químico de la mancha ocular producida por *Peronospora manshurica* y la roya asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) mediante la inducción de resistencia a la enfermedad a través del uso de fosfitos y acibenzolar-s-metilo (ASM) en asociación con fungicidas comerciales y determinar su efecto sobre la calidad de las semillas de este cultivo. El estudio se realizó en campos de Dois Vizinhos, Paraná (Brasil) durante dos cosechas consecutivas, y para el efecto se utilizó un diseño de bloques aleatorizados. Las variables de respuesta fueron los componentes del rendimiento, la severidad de la enfermedad a través de escalas esquemáticas específicas y los atributos de calidad de la semilla. El uso de fosfitos y ASM asociados con fungicidas Glifosato, Azoxistrobina + Benzovindiflupir, Azoxistrobina + Ciproconazol y Picoxistrobina + Ciproconazol no presentó resultados superiores en los parámetros evaluados, cuando se comparó con la aplicación de estos últimos de manera aislada. La aplicación de fungicidas fue suficiente para mitigar los efectos de la gravedad de la roya y el mildew asiático de la soja.

Palabras clave: Acibenzolar-S-metilo; *Glycine max*; fosfitos.

Introduction

Glycine max (L.) Merrill has unquestionable importance in the global agricultural sector and Brazil is one of the largest producers and grain exporters. In Brazil, soybean is in a position to expand its production in order to supply much of the world demand. However, the quality of grain and productivity need to be high, in order to increase the competitiveness of Brazilian producers across the international market. This increase, in turn, is associated with scientific advances and the availability of technologies to the productive sector (Freitas, 2011).

Some aspects hinder the increase in soybean yield, highlighting the occurrence of pests and diseases. The diseases caused by fungus are of the greatest importance, both for damage to grain yield and the quality of the seed produced. Moreover, many of these organisms have in the seed which its primary vehicle for spreading and introduction into new areas of cultivation may cause damage to the crop in favorable environmental conditions (Henning, 2004).

The induction of pathogens resistance in plants is characterized by the activation of their defense mechanisms inherent in expression to morphological, physiological and biochemical responses that limit pathogen activity in their tissues. Inducing substances, of biotic and abiotic origin, have been distinguished by their efficiency in different cultures, as alternatives of use a consortium, substitution to the pulverization of traditional xenobiotics and conventional seed treatment (Rodrigues et al., 2012).

A variety of substances have been used for this purpose. Among them, the phosphites stand out, which, like inductors, stimulate the formation of substances, protecting the plant against the attack of fungi by its self-defense. Its activity on the control of plant diseases can occur directly, inhibiting the development of the pathogen, or indirectly, when they induce the production of substances such as enzymes and phytoalexins and these will act on the pathogen, inducing plant resistance. As the fungicide effect can act directly on the fungus and applied either alone or in combination with fungicides, with additive or synergistic result which assists in reducing the intensity of diseases (Carmona and Sautua, 2011; Silva et al., 2013).

There are several studies confirming this property in ASM in many agronomic plants (Santos et al., 2011; Silva et al., 2013). The aim of the study was to evaluate the chemical management of 'eyespot' and the induction of resistance by the use of phosphites and acibenzolar-S-methyl (ASM), in association with commercial fungicides affect the quality of soybean seeds.

Material and methods

The experiments were conducted in the municipality of Dois Vizinhos, state of Paraná (Brasil), divided into two field trials during the 2015/16 and 2016/17 seasons. Both trials were seeded with C2 seeds of cultivar NIDERA NA 5909 RG produced in the previous harvest. The tests were implemented in a no-tillage system on the straw. The basic fertilization followed the recommendations of soil analysis for the culture and applied 350 kg.ha⁻¹ NPK fertilizers 02-24-18.

The experimental design was randomized blocks. In the 2015/16 crop, 12 treatments, resulting from commercial product mixtures with the inductors studied in three replicates, were tested, totaling 36 experimental units (EU). In the 2016/17 crop, we chose to test 10 treatments, with four replicates, totaling 40 EU. For both tests, the EU consisted of five lines, 2.25 m wide and 5 m long, spaced at 0.45 m, completing a total area of 11.25 m². The observation units (UO) went to the three central lines of the EU, discarding each end 0.5 m, totaling 5.4 m². The spraying corresponded to combinations of glyphosate herbicide, commercial fungicides, phosphite based products, and plant activator ASM, and a control without any treatment for disease control, with only applying the herbicide described for weed control. Table 1 shows the combinations and sequences of the products applied.

In both crops, the concentrations of active products and applied doses were: Glyphosate 480 g/l (2 L ha⁻¹); acibenzolar-s-metil (ASM) 500g/kg (0.05 L ha⁻¹); the manganese phosphite - FMn 9% Mn, 2.5% Mo, 24% phosphite (0.5 L ha⁻¹); of Potassium - FK 40% P₂O₅, 10% K₂O, 25% phosphite (0.4 L ha⁻¹); and Copper and Boron - FCuB 4% Cu, 2% B, 24% phosphite (0.4 L ha⁻¹). Only the fungicides and the applied doses varied according to the crop. In the 2015/16 crop, the fungicides Fg1: Azoxystrobin + Benzovindiflopi 300 g/l+150g/l (0.3 L ha⁻¹); and Fg2: Azoxystrobin + Ciproconazole 200 g/l + 80 g/l (0.2 L ha⁻¹). During the 2016/17, the fungicides used were Fg1: Azoxystrobin + Benzovindiflupir (0.2 L ha⁻¹) and Fg3: Picoxystrobin + Ciproconazole (0.3 L ha⁻¹).

The efficiency of applications on the control of pathogens was measured by the severity of the disease and this was used to calculate the area under the disease progress curve (AACPD), observing four marked plants, chosen at random in each EU. These were labeled randomly and evaluated nine leaflets, three in each third (bottom, middle and top) of the plant. To estimate severity, diagrammatic scales were used for mildew (*Peronospora manshurica*) (Kowata et al., 2008) and asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) (Godoy et al., 2006). Five severity evaluations were

performed for asian soybean rust and three for mildew, an interval of 7 and 14 days, respectively, from the V4 stage. The average values of severity of each plot were used to calculate the AACPD (Campbell and Madden, 1990).

In both trials, the crop performed manually, occurred in the R7.3 stage (more than 76% of leaves and yellow pod) (Ritchie et al., 1982), wherein seeds with mean levels ranging water between 14.5 and 17%. For the trail, a motorized plotter with track and cleaning function was used. The harvested seeds were advantaged in an air screen cleaner for cleaning and standardization.

These samples were placed in cotton packaging and put to dry in a stationary dryer sample with forced air at 35 °C, in order to homogenize

the water content until the seeds reached the equilibrium moisture content at 13%. It determined the moisture content of the seeds by the oven method at 105±3 °C, according to the methodology prescribed by the Rules for Seed Analysis - RAS (Brasil, 2009). Further, by weighing the sample on a precision scale, it calculated the seed productivity - Prod (kg. ha⁻¹). The samples were homogenized and still quartered to obtain working samples according to RAS (Brasil, 2009), which evaluated the quality attributes of the seeds. Were measured: weight of one thousand seeds - WTS (g); germination - G (%) and length of seedlings - LS (cm) (Brasil, 2009; Marcos-Filho, 2015).

The data set was subjected to Lilliefors test of normality and homogeneity of variance of Bartlett, and the data of AUDPC-M and AUDPC-F variables processed by chi-square (X² + K), the means presented are unique and discriminatory letters referring to adjusted averages. Met the assumptions of the statistical model, the level of significance of the treatments was tested by F test at 5% probability of error. Where significant treatments, were analyzed by means of Scott-Knott test, 5% level of probability. Statistical analyses were performed using the Assisat[®] statistical software.

Results and discussion

The response variables influenced differently for each crop depending on the treatments. In the experiment 1, conducted in the harvest of 2015/16, treatments were significant on the variables PMS, PROD, G, CP and AACPD for asian soybean rust and mildew (Table 2).

Table 2. Thousand seed weight (TSW), productivity (Prod), germination (G), seedling length (SL), area under the disease progress curve of asian soybean rust (AUDPC-A) and mildew (AUDPC-M), in an experiment conducted in the 2015/16 crop.

Treat.	TSW (g)	Prod (kg ha ⁻¹)	G (%)	SL (cm)	AUDPC-A	AUDPC-M
1	153.33b*	3268b	30b	17.52b	1530.85a	153.97a
2	165.66a	3888a	71a	22.71a	416.58b	47.64c
3	175.33a	3842a	64a	23.17a	297.40b	35.23c
4	148.00b	3168b	25b	16.63b	1365.11a	88.38b
5	142.00b	3116b	26b	19.20b	1487.48a	80.71b
6	165.00a	3956a	40b	21.30a	421.85b	41.60c
7	169.33a	3780a	61a	17.44b	356.41b	19.97d
8	167.66a	3693a	49b	15.25b	273.16b	48.41c
9	168.00a	4118a	79a	22.28a	366.22b	21.42d
10	176.33a	4231a	82a	22.52a	305.85b	14.04d
11	152.66b	3318b	62a	25.68a	1348.51a	80.92b
12	167.00a	4032a	87a	21.10a	343.60b	17.19d

*Data not followed by the same letter in a column are statistically different from each other by Scott-Knott, at 5% level of probability. Trat = treatment.

Table 1. The sequence of the application of the products used in the crop of 2015/16 and 2016/17.

Treat.	Crop 2015/16	Applied doses (L ha ⁻¹)
1	Control	Control
2	GI/Fg2+Ad/Fg1+Ad/Fg2+Ad	2 /0.2 / 0.3 / 0.2
3	GI+FMn/Fg2+Ad/Fg1+Ad/Fg2+Ad	2 +0.4 / 0.2 /0.3 / 0.2
4	GI/FCuB/FCuB/FCuB	2 /0.4 / 0.4 / 0.4
5	GI/FK/FK/FK	2 /0.4 /0.4 / 0.4
6	GI/Fg2+Ad+FCuB/Fg1+Ad/Fg2+Ad	2 /0.2 +0.4 / 0.3 / 0.2
7	GI/Fg2+Ad+FCuB/Fg1+Ad+FCuB/Fg2+Ad	2 /0.2 +0.4 /0.3 +0.4 / 0.2
8	GI/Fg2+Ad+FK/Fg1+Ad/Fg2+Ad	2 /0.2 +0.4 / 0.4 / 0.2
9	GI/Fg2+Ad+FK/Fg1+Ad+FK/Fg2+Ad	2 /0.2 +0.4 /0.3 +0.4 / 0.2
10	GI+FMn/Fg2+Ad + FCuB/Fg1+Ad+FK/Fg2+Ad	2 +0.4 /0.2 +0.4 /0.3 +0.4 / 0.2
11	GI/ASM/ASM/ASM	2 /0.05 /0.05 / 0.05
12	GI/Fg2+Ad+ASM/Fg1+Ad+ASM/Fg2+Ad	2 /0.2 +0.05 /0.3 +0.05 / 0.2

Treat.	Crop 2016/17	Applied doses (L ha ⁻¹)
1	Control	Control
2	GI/Fg3+Ad/Fg1+Ad/Fg3+Ad	2 /0.3 /0.2 / 0.3
3	GI+FMn/Fg3+Ad/Fg1+Ad/Fg3+Ad	2 +0.5 /0.3 /0.2 / 0.3
4	GI/FCuB/FCuB/FCuB	2 /0.4 /0.4 / 0.4
5	GI/Fg3+FCuB/Fg1+Ad/Fg3+Ad	2 /0.3 +0.4 /0.2 / 0.3
6	GI/Fg3+FCuB/Fg1+FCuB/Fg3+Ad	2 /0.3 +0.4 /0.2 +0.4 / 0.3
7	GI+FMn/Fg3+FCuB/Fg1+FK/Fg3+Ad	2 +0.5 /0.3 +0.4 /0.2 +0.4 / 0.3
8	GI/Fg3+Ad+FK/Fg1+Ad/Fg3+Ad	2 /0.3 +0.4 /0.2 / 0.3
9	GI/Fg3+Ad+FK/Fg1 + Ad+FK/Fg3+Ad	2 /0.3 +0.4 /0.2 +0.4 / 0.3
10	GI/Fg3+Ad+ASM/Fg1+Ad+ASM/Fg3+Ad	2 /0.3 +0.05 /0.2 +0.05 / 0.3.1

* Glyphosate. Fg.: fungicide. Ad: Adjuvant. ASM: Acibenzolar-S-methyl.

The treatments Copper and Boron (FCuB) (T4), FK (T5), acibenzolar-s-metil (ASM) (T11) and control (T1) had lower mean WTS and Prod, differing from the others (Table 2). In all these treatments did not apply fungicides. It can be inferred that they do not efficiently controlled pathogens as the other treatments, or, as suggested Peruch and Bruna (2008), had occurred phytotoxic effect on metabolic processes in soybean plants, negatively interfering in the evaluated parameters.

The Table 2 shows that the treatments comprise fungicides or not associated phosphites were more productive, probably due to the control of diseases by culture fungicides. Even triazole fungicides commonly used in agriculture can cause a bio-stimulant effect on plants.

For the germination (G) (Table 2) the T2, T3, T7, T9, T10, T11, and T12 treatments presented the highest averages (61 - 82%). However, taking into account that the minimum germination standard for soybean seed marketing is 80%, it is possible to distinguish only T10 and T12 with satisfactory physiological quality. During the development of culture, before and after physiological maturity in the season 2015/16, there were successive rains that delayed the harvest. It could be observed in Figure 1 that during the month of February, when the harvest was carried out, the average precipitation was 191.2 mm distributed in 24 days. Probably there have been successive hydrations and dehydration and consequently, the deterioration of the seeds still in the field, compromising their quality.

The excess moisture in the period following the physiological maturity and mature field compromised the physiological seed quality (Silva et al., 2013; Marcos Filho, 2015). On the length of seedlings (LS) (Table 2), treatments T2, T3, T6, T9, T10, T11, and T12 differed from the others. It is noted, however, that the lowest averages occurred in the treatments containing Potassium (FK) and Copper and Boron (FCuB) and when the

applications were repeated three times. Possibly it may have been cause toxic effects in the mother plant, coming to affect the length of seedlings produced in the seeds. Thus, from the point of view of the quality of the seeds in the first year of conducting the test, the use of phosphites and in isolation ASM was not efficient on the variables analyzed. Also, the use of fungicides with or without the phosphite and the ASM promoted satisfactory results.

About AACPD-F, treatments corresponding to the use of Copper and Boron (FCuB) (T4) and Potassium (FK) (T5) and ASM (T11) alone did not differ from control (T1) did not reduce disease severity in the culture. However, other associations between treatments corresponding phosphites, fungicides and plant activator ASM differed (Table 2). A similar result obtained by Neves and Blum (2014) on the severity of asian soybean rust in crop shows that the use of phosphites isolated or associated with fungicides is efficient, but they do not differ significantly from one another. Other studies have demonstrated a significant increase in severity reduction when using phosphites and ASMs associated with the fungicide cyproconazole + azoxystrobin (Silva et al., 2013).

Regarding AACPD -M, all treatments differed from the control, and T7, T9, T10, and T12 showed a greater reduction of disease severity. In T7 and T9, the Cu and K phosphites were applied twice, which was more efficient than applying the once only (T6 and T8). The association of FK with fungicides (T9) promoted 21.42 AACPD-M, compared to using FK alone (T5) with 80.71 and only with the application of fungicides (T2) with 47. Thus, T9 reduced about 75% of AACPD-M in relation to T5 and 45% in relation to T2. For Silva et al. (2011), the application of FK in soybean is efficient both in reducing the severity of mildew and in asian soybean rust.

In T10 was tested implementation of the three phosphites (Cu, K, and Mn). In this case, there was probably a synergistic effect between phosphites and fungicides, which potentiates the action of the molecules of fungicides, resulting in toxic effects on the pathogen. The acidity of the phosphite directly interferes with the development of the fungi, decreasing their growth (Araújo et al., 2010) and significantly reducing the mildew severity (Silva et al., 2011).

The fungicide application associated with ASM (T12) showed more efficient results when compared to the same application isolation. Silva et al. (2013) found that ASM when associated with the pyraclostrobin + epoxiconazole fungicide also reduced the severity of mildew in soybean cultivation and, when applied in isolation, had no effects on disease control.

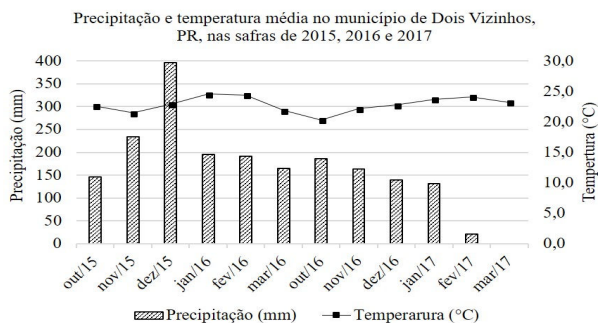


Figure 1. Precipitation and an average temperature in the municipality of Dois Vizinhos, PR, Brazil.

In experiment 2, season 2016/2017, treatments were significant variables on the weight of one thousand seeds (WTS), Prod and length of seedlings (SL), AUDPC asian soybean rust and mildew (Table 3).

Regarding the variables WTS and Prod, all the treatments differed from the control, being superior to this one. Effective in controlling the severity of rust and mildew, the treatments employed provided a loss in grain filling and number of pods per plant smaller than in the control, which showed yellowing and defoliation (Neves and Blum 2014). This favored the greatest mass of a thousand grains and productivity. Another factor to be taken into account is that foliar nutrient application results in increased productivity and seed formation with higher physiological quality (Fageria et al., 2009). Therefore, this must occur when the nutritional requirements are higher at the start of grain filling, characterized in that the transition at the end of stage R4 and R5 (Taiz and Zeiger, 2013). This was the time in which the latest treatments application, ensuring greater grain quality and productivity compared to the control (Table 3).

For the variable SL (Table 3) the highest averages were obtained with the application of T2, T5, T8, T9, and T10 treatments. The control of diseases in the soybean crop had been carried out with two to three applications of fungicides, starting from the flowering and yet, damages caused by diseases, are verified annually (Yorinori et al., 2005). This practice has a high cost and, as can be seen in the results obtained for the SL, this cost can be reduced by using alternative sources, such as resistance inducers combined with fungicides, without compromising the plant's development.

Table 3. Thousand seed weight (TSW), productivity (Prod), seedling length (SL), area under the disease progress curve of asian rust (AUDPC-A) and mildew (AUDPC-M), in an experiment conducted in 2016/17 crop.

Treat.	TSW (g)	Prod (kg/ha ⁻¹)	SL (cm)	AACPD- F	AACPD-M
1	147.73b	3719b	23.00c	154.17a	105.42a
2	162.73a	4171a	25.50a	82.95c	58.34b
3	159.70a	4489a	24.75b	84.52c	63.66b
4	154.47a	4271a	24.00c	166.42a	101.32a
5	159.67a	4382a	25.75a	48.47d	55.07b
6	158.06a	4469a	25.00b	34.30d	48.54b
7	162.51a	4366a	24.75b	123.55b	87.36a
8	163.35a	4711a	25.50a	86.62c	83.79a
9	162.86a	4440a	25.25a	103.42c	68.81b
10	162.98a	4568a	27.00a	77.00c	47.67b

*Data not followed by the same letter in column are statistically different from each other by Scott-Knott at 5% level of probability. Trtat = Treatment

About AACPD asian soybean rust (Table 3) increased efficiency was observed with the use of FCuB (T5 and T6) associated with fungicides, which differed significantly from other treatments. Analogous results obtained by Neves and Blum (2014) and Silva et al. (2011) about the severity of asian rust on soybean show that the use of phosphites associated with fungicides is efficient, being superior to the control treatment. The control of asian soybean rust is also efficient with the use of fungicide only, or of that associated with ASM (Carvalho et al., 2013).

For asian soybean rust, treatments based on FCuB associated with fungicides presented better results in the control of the disease, possibly having a synergistic effect between them. The acid phosphite interferes directly on the development of fungi and combined use with fungicides, enhancing the action of the molecules, causing direct toxic effects on the pathogen and decreasing their growth (Araujo et al., 2010). It may also be related to the possible activation of the defense mechanisms of the plant against the pathogen, since the phosphites present the potential to intensify the synthesis of ascorbic acid, phytoalexins, phenolic compounds and lignin, which indirectly interfere with the incidence and development of pathogens in plants (Moor et al., 2009).

The use of the different sources of phosphites (Mn, K and Cu) and ASM on the AACPD of mildew (Table 3) showed significant results on the control of mildew in relation to the (T1), which proves with the other results obtained in the control of the same pathogen in the soybean crop (Silva et al., 2011; Silva et al., 2013). However, the same effect of the isolated use of the different phosphite and ASM sources was also observed using the combination of different fungicides (T2 - fungicidal standard).

In general, greater development of mildew and asian soybean rust occurred in the plants where FCuB was applied without association with fungicides (T4) and the combination of three phosphites (Mn, K, and Cu) combined with fungicides (T7). Thus, it is possible to infer that there were cause toxic effects or incompatibility when phosphite was applied jointly. However, when using only one type of phosphite associated with fungicides, the effect was satisfactory but using only the like fungicides. These results can be viewed mainly in the final crop cycles, depending on the physiological responses of plant defense after treatment application.

Conclusions

The use of phosphite and ASM, with and without the combination of fungicides Azoxystrobin + Benzovinindiflopi, Azoxystrobin + Ciproconazole

e Picoxystrobin + Ciproconazole, did not reduce the severity of the mildew and asian soybean rust;

Three applications of the same phosphorized phytotoxic effect on soybean crop, compromising yield and seed quality;

The use of combinations of different fungicides was sufficient to mitigate the severity effects of the mildew and asian rust on soybean crop.

References

- Araújo, L.; Valdebenito-Sanhueza, R. M.; and Stadnik, M. J. 2010. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. *Tropical Plant Pathology* 35(1):54-59. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/tpp/v35n1/a10v35n1> Fev. 2010.
- Campbell, C. L.; Madden, L. V. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York NY. John Wiley e Sons. 532 pp.
- Carmona, M. and Sautua, F. 2011. Os fosfitos no manejo de doenças nas culturas extensivas. *Revista Plantio Direto*, 126(1), 19-22. Retrieved from <https://wp.ufpel.edu.br/consagro/files/2012/02/Os-fosfitos-no-manejo-de-doen%C3%A7as-nas-culturas-extensivas.pdf> Nov.-Dez. 2011
- Carvalho, B. O.; Oliveira, J. A.; Carvalho, E. R.; Andrade, V. D.; Ferreira, T. F.; and Reis, L. V. 2013. Action of defense activator and foliar fungicide on the control of Asiatic rust and on yield and quality of soybean seeds. *Journal of Seed Science* 35(2):198-206. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S2317-15372013000200009>
- Fageria, N. K.; Barbosa Filho, M. P.; Moreira, A.; and Guimarães, C. M. 2009. Foliar fertilization of crop plants. *Journal of Plant Nutrition* 32(),1044-1064. doi: <https://doi.org/10.1080/01904160902872826>
- Freitas, M. C. M. 2011. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. *Enciclopédia Biosfera* 7(12):1-12. Retrieved from <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/a%20cultura%20da%20soja.pdf>
- Godoy, C. V.; Koga, L. J.; and Canteri, M. G. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, 31(1), 63-68. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000100011>
- Henning, A. A. 2004. *Patologia e tratamento de sementes: Noções Gerais*. Londrina: Embrapa Soja. Retrieved from <https://www.embrapa.br/soja/busca-de-publicacoes/-/publicacao/469530/patologia-e-tratamento-de-sementes-nocoes-gerais>
- Kowata, L. S.; May-de-Mio, L. L.; Dalla-Pria, M.; and Do Santos, H. A. A. 2008. Escala Diagramática para avaliar severidade de mildio na soja. *Scientia Agraria* 9(1):105-110. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v9i1.10145>
- Marcos-Filho, J. 2015. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. 2. ed., Londrina: ABRATES.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [PDF]. Brasil. 2009. Regras para análise de sementes. Brasília. Retrieved from http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf
- Moor, U.; Pöldma, P.; Tõnutare, T.; Karp, K.; Starast, M.; and Vool, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Scientia Horticulturae* 119(3):264-269. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.005>
- Neves, J. S.; and Blum, L. E. B. 2014. Influência de fungicidas e fosfito de potássio no controle da ferrugem asiática e na produtividade da soja. *Revista Caatinga* 27(1):75-82. Retrieved from https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/2720/pdf_88 Jan.-Mar., 2014.
- Peruch, L. A. M.; and Bruna, E. D. 2008. Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do mildio e na produtividade da videira cv. 'Goethe'. *Ciência Rural* 38(9):2413-2418. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000900001>
- Ritchie, S. 1982. *How a soybean plant develops*. Ames: Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service.
- Rodrigues, F. A.; Fortunato, A. A.; and Resende, R. S. 2012. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. Viçosa: UFV.
- Santos, H. A. A. D.; Dalla Pria, M.; Silva, O. C. D.; De Mio, L. L. 2011. Controle de doenças do trigo com fosfitos e acibenzolar-s-metil isoladamente ou associados a piraclostrobina + epoxiconazole. *Semina. Ciências Agrárias* 32():433-442, 2011. doi:10.5433/1679-0359.2011v32n2p433
- Silva, O. C.; Santos, H. A. A.; Dalla Pria, M.; May-De Mio, L. L. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. *Crop. Protection* 30.598-604. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.02.015>.
- Silva, O. C.; Santos, H. A.; Deschamps, C.; Dalla Pria, M.; and May de Mio, L. L. 2013. Fontes de fosfito e acibenzolar-S-metilico associados a fungicidas para o controle de doenças foliares na cultura da soja. *Tropical Plant Pathology* 38(1):72-77. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013000100012>
- Taiz, L.; and Zeiger, E. 2013. *Fisiologia vegetal*. 5. ed., Artmed.
- Yorinori J. T. 2005. Epidemics of soybean rust (Phakopsora pachyrhizi) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease* 89:675-677. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0675>

Nutritional contents in *Myrciaria dubia* plants in function of in Potassium doses applied through fertigation

Contenido de nutrientes en plantas de *Myrciaria dubia* en función de dosis de potasio aplicadas por fertirrigación

Carlos Abanto-Rodríguez^{1,5,*}, Edvan Alves Chagas², Wellington Farias Araújo³, Matheus Gonçalves Paulichi³, João Vitor García de Lima³, Eduardo Medeiros de Oliveira³, João Luiz Lopes Monteiro Neto³, Sonicley da Silva Maia³, José Sanchez-Choy⁴, Nadia Masaya Panduro Tenazoa⁴

1. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana-IIAP, Perú. 2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Roraima-Brasil. 3. Universidade Federal de Roraima, UFRR, Brasil. 4. Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía, UNIA, Perú. 5. Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (REDE BIONORTE), Roraima, Brasil. *Author for correspondence: carforestal24@gmail.com

Rec: 2018-12-17 Acep: 2019-12-17

Abstract

The objective in this study was to determine the nutrient contents in *Myrciaria dubia* plants in function of five K₂O doses (0, 40, 80, 120 and 160 kg ha⁻¹) applied through fertigation. Leaf dry matter (LDM), total dry matter (TDM), and leaf nutrient contents were evaluated. The LDM and TDM were higher in plants subjected to the dose of 160 kg ha⁻¹ of K₂O, with 52.44 g and 302.69 g, respectively. Leaf N and K contents were 22.15 and 9.48 g kg⁻¹ in response to 160 kg ha⁻¹ of K₂O. The mean P, Ca and S contents were 1.6, 17.89 and 1.61 g kg⁻¹, respectively, and the content of Mg²⁺ decreased from 5.62 to 2.74 g kg⁻¹ at the dose of 0 and 160 kg ha⁻¹ of K₂O, respectively. The B, Mn and Fe contents decreased from 136.5 to 100.0, 346.24 to 248, and from 142.06 to 97.35 mg kg⁻¹ at the dose of 0 and 160 kg ha⁻¹ of K₂O, respectively. The mean Cu and Zn contents were 3.81 and 40.54 mg kg⁻¹, respectively, at the K₂O doses. The nutrient content determined in the leaves of *M. dubia* were adequate for the development of the species in the first year of cultivation, presenting the following decreasing order: N > Ca > K > Mg > P = S > Mn > B > Fe > Zn > Cu.

Key words: Agronomic management; camu-camu; caçari; leaf analysis; mineral nutrition.

Resumen

El objetivo en este estudio fue determinar el contenido de nutrientes en plantas de *Myrciaria dubia* como respuesta a la aplicación de cinco dosis de K₂O (0; 40; 80; 120 e 160 kg ha⁻¹) aplicadas por fertirrigación. Se evaluaron los contenidos de materia seca de hoja (MSH), materia seca total (MST) y el contenido de nutrientes en las hojas. La MSH y la MST fueron mayores en plantas fertilizadas con la dosis de 160 kg ha⁻¹ de K₂O, con 52.44 g y 302.69 g, respectivamente. Los contenidos de N y K fueron de 22.15 y 9.48 g kg⁻¹ en respuesta a la dosis de 160 kg ha⁻¹ de K₂O. Los contenidos medios de P, Ca y S fueron de 1.6, 17.89 y 1.61 g kg⁻¹, respectivamente, y el contenido de Mg²⁺ disminuyó desde 5.62 hasta 2.74 g kg⁻¹ en la dosis de 0 y 160 kg ha⁻¹ de K₂O, respectivamente. Los contenidos de B, Mn y Fe disminuyeron de 136.5 a 100.0, de 346.24 a 248, y de 142.06 a 97.35 mg kg⁻¹ en la dosis de 0 y 160 kg ha⁻¹ de K₂O, respectivamente. Los contenidos medios de Cu y Zn fueron 3.81 y 40.54 mg kg⁻¹, respectivamente, en todas las dosis de K₂O. El contenido de nutrientes determinado en las hojas de *M. dubia* fueron adecuados para el desarrollo de la especie en el primer año de cultivo, presentando el siguiente orden decreciente: N > Ca > K > Mg > P = S > Mn > B > Fe > Zn > Cu.

Palabras clave: Análisis foliar; camu camu; caçari; manejo agronómico; nutrición mineral.

Introduction

Brazil is the second largest center of origin of tropical fruit trees in the world, accounting for 500 native species, from which 44% are in the Amazon (Santos-Serejo et al., 2009). Among the native fruit trees found in this region, *Myrciaria dubia* stands out for its high content of ascorbic acid (vitamin C) and phenolic compounds.

The habitat of this species comprises flooded soils on the banks of rivers, igarapés (small streams) and lakes (Yuyama and Valente, 2011). However, in Brazil, there has been an attempt to domesticate the *M. dubia* culture in solid soils. The first studies were conducted from the 1980s by the National Institute of Amazonian Research (INPA), followed by studies performed at the Citrus Experiment Station of the Agronomic Institute of São Paulo – SP (1994), and by those carried out by producers in the Vale do Ribeira region in Mirandópolis, São Paulo State, Brazil. In the same year, the Embrapa Amazônia Oriental implemented the Active Germplasm Bank (AGB) of ‘Camucamuzeiro’ plants, and in the last eight years, the Embrapa-RR has been developing genetic improvement and fertilization research in experimental orchards.

Fertilization management is one of the most important aspects since the determination of the plant nutritional requirements and responses is essential to obtain adequate vegetative and reproductive development (Laviola et al., 2008). Potassium (K) is one of the essential nutrients to cultures and plays an important role in the metabolic activity of plants, such as in photosynthesis, starch production, enzyme activity, and plant tolerance to drought and frost. However, in excess, it may affect the levels of calcium and magnesium in the plants, in addition to causing burns on the margins and apex of old leaves (Faquin, 2005). This fact justifies the need for an efficient crop fertilization program.

In this sense, production of dry matter is one of the indicators used to measure the plant nutrient absorption intensity and is directly related and influenced by the nutrient content in the leaves, fruit and other organs (Magolbo et al., 2015). Thus, studies aimed to quantify nutrient concentration in plant tissues are essential to know the nutritional requirements of plants (Laviola et al., 2008).

In the literature, important contributions were found regarding fertilization in the seedling production phase and in the establishment of *M. dubia* plants in definitive areas (Panduro et al., 2016 and Abanto-Rodríguez et al., 2019); however, there are few studies quantifying plant nutrient absorption in different types of

management. In this context, the aim of this study was to determine the nutritional content in *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh as a function of different doses of potassium applied through fertigation.

Material and methods

The research was conducted in the Água Boa Experimental Field of the Embrapa-RR, Roraima State, Brazil, located at the geographic coordinates 02° 39' 48.94" north latitude and 60° 50' 30,39" west longitude, at 90 m of altitude. According to Köppen, the climate in the region is Aw, tropical rainy, with an annual rainfall average of 1678 mm, 70% of relative humidity and temperature of 27.4°C (Araújo et al., 2001).

The soil in the region was classified as Yellow Latosol of medium and clay texture, with low pH (4.4) and P (3 g dm⁻³), Ca²⁺ (2 mmol_c dm⁻³), and Mg²⁺ (1 mmol_c dm⁻³) contents, high saturation by Al³⁺ (72%) and low saturation by bases (11%), being corrected with 1500 kg ha⁻¹ of dolomitic limestone. To meet the needs for P and N, 400 kg ha⁻¹ of Simple Superphosphate (SS) and 40 kg ha⁻¹ of urea were applied, respectively. In the preparation of pits, both with 0.40 m x 0.40 m x 0.40 m, 150 g of limestone and 50 g of SS/pit were also applied, as recommended by Yuyama and Valente (2011). In addition, 10 g of FTE-BR12 (9.0 to 9.2% Zn, 1.8 to 2.17% B, 0.80% Cu, 3.82% Fe, 2.0 to 3.4% Mn and 0.132% Mo) were also used.

Seedlings from the ‘Candeias’ population of the INPA germplasm bank were transplanted at seven months of age, with 4 branches, 35.6 cm of height and 4.4 mm of base stem diameter, on average; spaced 4 m between rows and 0.5 m between plants.

Irrigation was performed by a self-compensating drip system, automatically activated by RAIN BIRD® programmer (timer). The system was supplied by a flow rate of 6.8 lt h⁻¹ (3.4 lt h⁻¹ per dripper spaced every 50 cm). For the injection of fertilizers, a 0.75-inch Venturi injector was used, operating at an injection rate of 150 lt/hour. The amount of water used was determined based on the reference evapotranspiration estimated by the Class A tank.

The experiment was carried out in a randomized block design, with five treatments, consisting of K₂O doses (0, 40, 80, 120 and 160 kg ha⁻¹), and eight replications, using seven plants per experimental unit. The doses were applied through fertigation for 40 weeks, divided every 10 weeks, making up 10%; 20%; 30% and 40% of the total of the corresponding treatment.

At 270 days after transplantation (DAT), the plants were collected and taken to the sample preparation laboratory of the Embrapa-RR; and then they were sectioned (roots, branches, and leaves) to be placed in a forced circulation oven at 60 °C until reaching a constant weight. Subsequently, the dry matter of the samples was evaluated and total dry matter (TDM) was obtained. Afterward, the samples were ground and milled in a Wiley mill and sent to the Plant Nutrition Laboratory of the Federal University of Lavras, where the nutrient contents were analyzed according to the methodology of Embrapa-1998.

The data were subjected to analysis of variance and, when there was a significant effect, the polynomial regression analysis ($P \leq 0.05$) was performed, using the SISVAR software (Ferreira, 2014).

Results and discussion

Leaf dry matter (LDM) and total dry matter (TDM)

The F-test indicated significant effects ($P \leq 0.05$) of the application of K_2O through fertigation on the variable TDM (roots, branches, and leaves), in which increasing doses of K_2O generated a significant increasing linear trend (Figure 1). The application of 160 kg ha^{-1} of K_2O resulted in a maximum value of 302.69 g of TDM. Results similar to those of Figure 1 were found by Ferreira (2014), who observed a linear behavior in the dry matter in response to potassium fertilization in acerola (*Malpighia emarginata*) seedlings. Therefore, it can be stated that the development of *M. dubia* plants was not limited by the increasing doses of K_2O .

The results of this research were satisfactory, since, according to Mendonça et al. (2009), TDM is an efficient indicator to demonstrate the fertilizer effect on plant growth. Thus, it is evidenced that

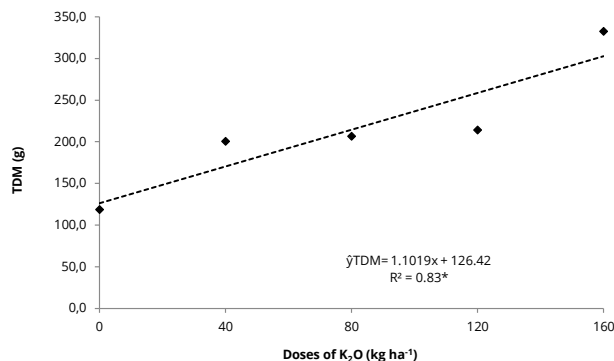


Figure 1. Total dry matter (TDM) (g) in *M. dubia* plants as a function of K_2O doses applied through fertigation. Embrapa-RR, Roraima State, Brazil.

*significant, according to the Tukey test at 5% probability.

K_2O is indispensable to plants because, according to Faquin (2005), it acts on the activation of more than 50 osymes, besides acting on the regulation of cell osmotic potential and participating in the cell expansion process and in the opening and closure of stomata. In addition, this author mentions that K_2O is the second most required nutrient by plants, especially by those producing starch, sugar, and fibers.

Macronutrient contents

The leaf N, P, and S contents varied with the increasing doses of K_2O and showed significant linear behavior ($P \leq 0.05$) for N and non-significant behavior ($P > 0.05$) for P and S (Figure 2) after 270 DAT. A maximum value of 22.15 g kg^{-1} of N content was recorded, in response to the dose of 160 kg ha^{-1} of K_2O (Figure 2a), and the increasing doses of K_2O had no negative effect on the N absorption by plants. In this sense, according to Marschner (2012) and Ortega and Malavolta (2012), this may have occurred because the urea in the soil was possibly in a higher proportion in the form of NO_3^- (nitrate), considering that, if it was in higher concentrations of NH_4^+ , there would have been an antagonistic interaction between these nutrients, affecting thus their absorption due to the equality of loads.

Costa et al. (2011) studying the potassium fertilization of mango tree (*Mangifera indica*) found similar results of N content. However, the N leaf content observed in the present study (18 g kg^{-1} of N) was higher than those reported by Esashika et al. (2011). The mean leaf P and S contents were 1.6 and 1.61 g kg^{-1} , respectively, in response to all doses of K_2O , (Figure 2b-2f). The P contents found in this study was higher than those reported by Viégas et al. (2004) (1.45 g kg^{-1}) and Esashika et al. (2011), who obtained contents ranging from 1.43 to 2.57 g kg^{-1} of P in *M. dubia* plants.

On the other hand, it can be stated that leaf P content was adequate for the plants, since, according to Araújo and Machado (2006) inadequate P supply may decrease the absorption and translocation of NO_3^- absorbed to the aerial part, which did not occur in this study, since the N contents were adequate. With regards to the interaction between K_2O and P, Ortega and Malavolta (2012) explain that these nutrients have no synergism and antagonism neither in the soil nor in the plant.

The mean concentration of S obtained in this study is lower than those (2.4 to 2.8 g kg^{-1}) reported by Viégas et al. (2004); however, it is within the standard values since, according to Faquin (2005), the S contents in plants range from 0.2 to 0.5% of the dry matter. The K and

S had no interaction either in the soil or in the plant because the S is mainly absorbed in the oxidized form of SO_4^{2-} (Faquin, 2005; Ortega and Malavolta, 2012). However, the use of concentrated fertilizers with high P and/or N contents can lead to S deficiency when its content in the soil is low (Alvarez et al., 2007).

There was no luxury consumption of N, P, and S since the plants continued to absorb nutrients and develop. Different results were reported by Abanto-Rodriguez et al. (2018) who evaluated increasing doses of N and observed that the plants absorbed the nutrients but had no response regarding the development. The different

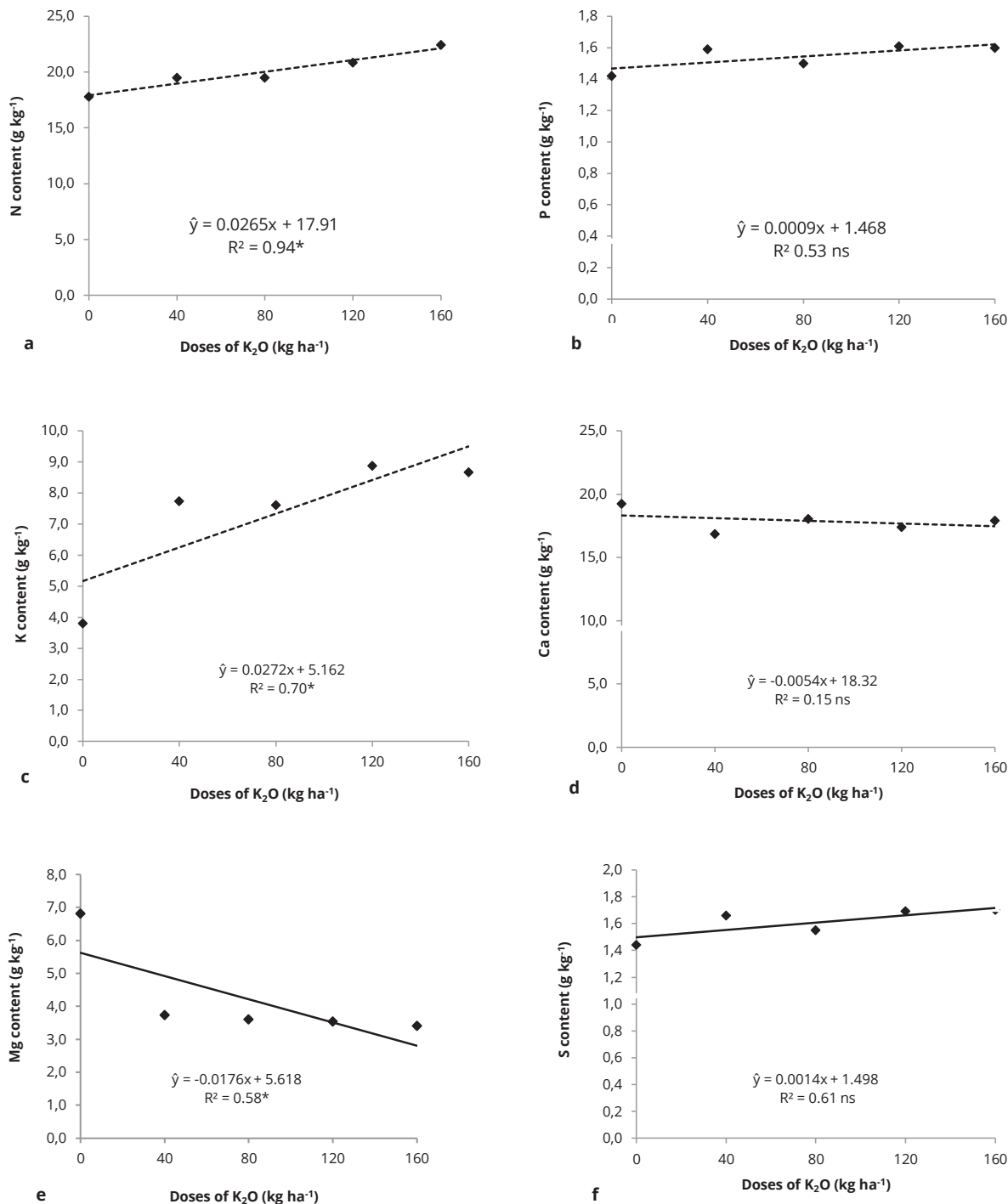


Figure 2. Effect of K₂O doses, applied through fertigation, on the contents of N (a), P (b), K (c), Ca (d), Mg (e) and S (f) in leaves of camu-camu. Embrapa-RR, Roraima State, Brazil. *, ns-significant and not significant, according to the Tukey test at 5% probability.

doses of K_2O led to a significant increasing linear adjustment ($P \leq 0.05$) in the K and Mg contents and a non-significant ($P > 0.05$) in the Ca content, in *M. dubia* leaves at 270 DAT (Figure 2). Thus, the lowest and highest leaf K contents were 5.16 and 9.48 $g\ kg^{-1}$ in response to the doses of 0 and 160 $kg\ ha^{-1}$ of K_2O , respectively (Figure 1c).

The Mg content in the studied plants had a decreasing linear behavior in response to the increasing doses of K_2O (Figure 2e). Thus, a maximum content of 5.62 and a minimum of 2.74 $g\ kg^{-1}$ of Mg were recorded, in response to the doses of 0 and 160 $kg\ ha^{-1}$ of K_2O , respectively, and the mean leaf Ca content was 17.89 $g\ kg^{-1}$ at the doses of K_2O (Figure 2d).

Regarding the minimum and maximum mean leaf K content, the values found in this study are adequate for the *M. dubia* culture since, according to Faquin (2005), K contents should correspond to 2 to 5% of the dry matter for the satisfactory growth of the plants, and may range according to the species and organ analyzed. Similar results were found by Ferreira (2014) when evaluating the growth of acerola (*Malpighia glabra*) seedlings at different doses of N and K. From the decreasing linear behavior in the Mg content in the *M. dubia* plants (Figure 2e), it was verified that the increasing level of K^+ in the soil solution promoted a reduction in the Mg content, which could be caused by the dilution effect, which, according to Faquin (2005), is understood as the decrease in the content of a certain nutrient in the dry matter as a function of plant growth in response to the application of another nutrient deficient in the environment.

In addition, the decrease in the Mg content with the increasing doses of K_2O also resulted from the competitive inhibition interaction existing between these two nutrients (Marschner, 2012). According to Ortega and Malavolta (2012), competitive inhibition generally occurs with similar valence ions because they compete for the same absorption canal, reducing the absorption of those in a lower concentration in the soil solution. On the contrary, Ortega and Malavolta (2012) emphasize that the high Mg contents do not have the same effect on K. This is because K, due to its lower load, crosses the plasma membrane rapidly, reducing the absorption of the other cations.

Concerning the mean leaf Mg content, similar results were found by Amorim et al. (2015), who studied the nitrogen and potassium fertilization in guava trees (*Psidium guajava* L.) and observed that leaf Mg contents decreased from 2.2 to 1.9 $g\ kg^{-1}$. Despite the decrease in the Mg contents in our research, they remained within the range suitable for *M. dubia* plants because they were higher than

those reported by Esashika et al. (2011), who found a value of 1.42 $g\ kg^{-1}$ studying the complete mineral fertilization in the same species.

Regarding the Ca content, the results found in this study were higher than those determined by Viégas et al. (2004) and Esashika et al. (2011), who obtained mean contents of 7.1 $g\ kg^{-1}$ in *M. dubia* plants. The K had no competitive interaction with Ca probably because the plants received a balanced fertilization of these nutrients. Normally, high concentrations of K induce the reduction of Ca absorption (Faquin, 2005). In this sense, Ortega and Malavolta (2012) state that the increase in the K^+ content in the soil solution causes a decrease in the Ca contents in the plants, which can be caused by the dilution effect, also considering that the increase in the K and Ca doses induces the Mg deficiency in the plants, since their binding forces together are stronger than those of the Mg, surpassing it at the cation exchange sites (Ranade-Malvi, 2011). This fact was evidenced in the present study.

Micronutrient contents

The B and Mn contents in leaves of *M. dubia* had a significant quadratic adjustment ($P \leq 0.05$) (Figure 3a and 3b) in relation to the increase in the K doses. The maximum B content (Figure 3a) was 136.50 $mg\ kg^{-1}$ in plants without potassium fertilization, decreasing up to 100.01 $mg\ kg^{-1}$ at the dose of 160 $kg\ ha^{-1}$ of K_2O . The leaf Mn content in the studied plants (Figure 3b) had a significant variation in response to the increasing doses of K_2O , reaching values of 346.24 and 248.00 $mg\ kg^{-1}$ at the doses 0 and 160 $kg\ ha^{-1}$, respectively.

It can be inferred that the B and Mn contents in the leaves of *M. dubia* promoted a decrease in their respective contents due to a higher dilution of these nutrients in the plant tissue as a result of the increase in biomass production (Faquin, 2005). Viégas et al. (2004) state that adequate leaf B contents in the *M. dubia* range from 8.4 to 9.5 $mg\ kg^{-1}$. The contents determined in our study were much higher, probably due to the application of 180 mg of B per plant from FTE-BR12.

Moreover, according to Marschner (2012), the B content adequate for the development of the cultures is quite variable, since the differences in the requirement of this nutrient are attributed to the chemical composition variation of the cell membranes in each species. In this sense, Dechen and Nachtigall (2006) report that leaf concentrations lower than 15 $mg\ kg^{-1}$ indicate a deficiency of this nutrient. Thus, the contents found in our research are above those previously cited, which demonstrates that the *M. dubia* is demanding in terms of B.

On the other hand, the K_2O doses had no influence on the leaf B content. According to Ranade-Malvi (2011), B and K have overlapping roles in plant physiology and therefore they are synergistic because it has been shown that an optimal level of B increases the cell membrane permeability to potassium.

Regarding the Mn, Dechen and Nachtigall (2006) state that the concentrations of this nutrient in the plants vary from 5 to 1500 $mg\ kg^{-1}$ of dry matter, depending on the species, besides considering that leaf concentrations between

20 and 500 $mg\ kg^{-1}$ are suitable for normal plant development. For *M. dubia*, Esashika et al. (2011) reported adequate leaf Mn contents (131 $mg\ kg^{-1}$) in seedlings lower than those determined in this research.

About the interaction between these nutrients, Ranade-Malvi (2011) points out that K has direct synergistic relationships with Mn because it is an important component for photosynthesis, metabolism, N assimilation, and activity of decarboxylase, dehydrogenase and oxidase enzymes. The amounts of fertilizer

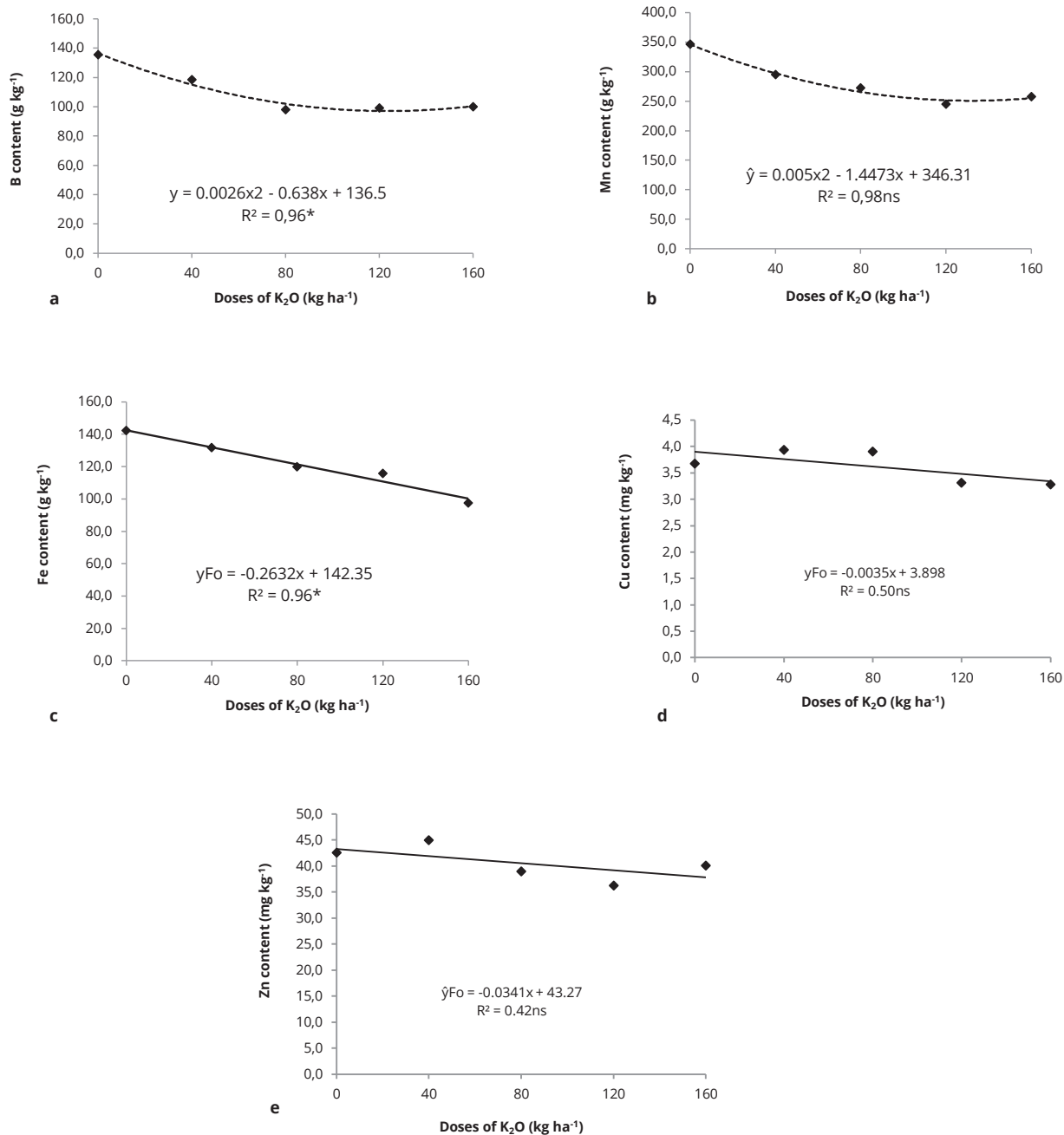


Figure 3. Effect of K_2O doses, applied through fertigation, on the contents of B (a), Mn (b), Fe (c), Cu (d) and Zn (e) in leaves of camu-camu plants. Embrapa-RR, Roraima State, Brazil. *, ns-significant and not significant, according to the Tukey test at 5% probability.

used in this study were probably in equilibrium because B and Mn contents were not negatively affected. Thus, Ortega and Malavolta (2012) explain that excess K and Ca deficiency causes Mn deficiency, and the high B contents reduce the leaf Mn contents.

Significant linear responses ($P \leq 0.05$) were found for the leaf Fe content and non-significant ($P > 0.05$) for the leaf Cu and Zn contents (Figures 3c, 3d, and 3e). Thus, the maximum and minimum Fe contents were 142.06 and 97.35 mg kg⁻¹ in response to the doses of 0 and 160 kg ha⁻¹ of K₂O, respectively. The mean leaf Cu and Zn contents were 3.81 and 40.54 mg kg⁻¹, respectively, in response to the different doses of K₂O, (Figure 3d and 3e). The value found for Fe is possibly related to the nutrient dilution effect, because, at higher doses of K₂O plant growth was higher, whereas, at lower doses plants had a reduced development, remaining with a higher nutrient concentration in the leaves. Despite the decrease in Fe content, the obtained values were higher than those reported by Esashika et al. (2011) (66 mg kg⁻¹) in *M. dubia* seedlings subjected to mineral fertilization.

For Dechen and Nachtigall (2006), Fe contents in plants can range from 10 and 1500 mg kg⁻¹ of the dry matter and the doses considered suitable for the good development of plants are between 50 and 100 mg kg⁻¹, and those doses characterized as deficient for plants correspond to levels below 10 mg kg⁻¹ of Fe. Therefore, the values found in this research are in agreement with those reported in the literature.

Regarding the interaction between these nutrients, Ortega and Malavolta (2012) found no interaction; however, Ranade-Malvi (2011) mentions that K has direct synergic relationships with Fe because it plays an important role in the formation of chlorophyll. In this case, it is noteworthy that the Cu and Mn concentrations were within the adequate range, otherwise, Fe deficiencies would be evidenced (Ortega and Malavolta, 2012). Concerning Cu, Dechen and Nachtigall (2006) state that leaf concentrations lower than 4 mg kg⁻¹ indicate a deficiency of this nutrient in plants, and doses above 20 mg kg⁻¹ may result in toxic effects on plants.

It is important to note that, regardless of the range considered adequate by some researchers, no Cu deficiency symptoms were observed in the *M. dubia* plants analyzed. However, the low Cu content in the leaves was probably due to the high Mg and Ca contents, because, according to Faquin (2005) these nutrients tend to reduce and immobilize Cu causing its deficiency, since Cu is absorbed from soil solution as Cu²⁺, which causes competitive inhibition.

As for Zn, the leaf content found here were higher than those reported by Esashika et al. (2011) (24 mg kg⁻¹ of Zn) in a study on complete fertilization of *M. dubia* seedlings. According to Faquin (2005) the adequate Zn concentration may range from 20 to 120 ppm in the dry matter, depending on the species studied. The deficiency of this nutrient is associated with contents lower than 20 mg kg⁻¹ and toxicity levels above 400 ppm.

From the results of this study, it can be observed that Zn content was not affected by the P content, since it was within the adequate values. In this sense, Faquin (2005) explains that Zn absorption can be inhibited by the presence of cations at high concentrations, such as P applied in superfluous fertilizations. In this relationship between Zn and P, factors such as the noncompetitive inhibition in the absorption process and less transport of Zn from the roots to the aerial parts of the plant may occur. It can be assured that Zn concentrations were in equilibrium, otherwise, this element would have inhibited the metabolism of Fe, making the leaves chlorotic and later whitish, which could have affected plant growth. This interaction can be explained by the similarity of the ionic radius, that is, by the size of the molecules of these nutrients (Faquin, 2005).

Acknowledgments

The authors express their thanks to the Coordination of the improvement of personnel of higher level- CAPES, to National Council for Scientific and Technological Development-CNPq and the Brazilian Agricultural Research Corporation-Embrapa-Roraima, by economic funding for the research development and also to Universidade Federal de Roraima-Brazil, by the valuable support in the academic formation of the first author.

Conclusions

The contents of macro and micronutrients found in leaves of *M. dubia* corresponded to the following decreasing order: N > Ca > K > Mg > S = P > Mn > B > Fe > Zn > Cu; all of which are within the levels suitable for the satisfactory development of plants produced in the first year of cultivation under potassium fertilization through fertigation.

References

- Abanto-Rodríguez, C.; Soregui, G.M.M.; Panduro, M.H.P.; Velazco, E.V.C.; Paredes, E.J.D. and Oliveira, E.M. 2019. Uso de biofertilizantes en el desarrollo vegetativo y productivo de plantas de camu-camu en Ucayali, Perú. *Revista Ceres* 66(2):108-116. <https://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201966020005>.

- Abanto-Rodríguez, C.; Chagas, E.A.; Siqueira, R.S.; Araújo, W.S.; Zborowski, L.C.; Souza, P.C.; Sakasaki, R.T.; Monteiro-Neto, J. L. and Sánchez-Choy, J. 2018. Nutrient contents and fertirrigation in camu camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) crop with different nitrogen doses. *Acta Agronômica* 67(1):79-85. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v67n1.64667>
- Alvarez, V.V.H.; Roscoe, R.; Kurihara, C.H. and Pereira, N.F. 2007. Enxofre. In R.F. Novais, V.V.H. Alvarez, N.F. Barros, R.L.F. Fontes, R.B. Cantarutti, J.C.L. Neves. (eds.). *Fertilidade do solo*. pp. 595-644. Viçosa, Brazil: SBCS. Retrieved from: <https://www.editoraufv.com.br/produto/fertilidade-do-solo/1109451>.
- Amorim, A.D.; de Souza, A. H.; Rozane, E.D., Montes, M.R. and Natale, W. 2015. Adubação nitrogenada e potássica em goiabeiras 'paluma':ii. Efeito no estado nutricional das plantas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 37(1):210-219. Retrieved from: <http://www.rbf.org.br/wp-content/uploads/pdfs/files/rbf-37-1.pdf>.
- Araújo, A.P. and Machado, C.T.T. 2006. Fósforo. In M.S. Fernandes (ed. *Nutrição mineral de plantas*. pp. 253-280. Viçosa, Brazil: SBCS. Retrieved from: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=898576&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22FERNANDES,%20.%20S.%22&qFacets=autoria:%22FERNANDES,%20M.%20S.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>.
- Araújo, F.W.; Andrade Junior, A.S.; Medeiros, R. D. and Sampaio, R. A. 2001. Precipitação pluviométrica mensal provável em Boa Vista, Estado de Roraima, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 5(3):563-567. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662001000300032>.
- Costa, M.E.; Caldas, A.V.C.; Souza, W.C.M.; Gurgel, M.T. and Silva, R.M. 2011. Caracterização nutricional da mangueira 'Tommy Atkins' sob adubação potássica. *Revista Verde* 6(2):125-130. Retrieved from: <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/viewFile/690/606>.
- Dechen A.R. and Nachtigall, G.R. 2006. Micronutrientes. In M.S. Fernandes. *Nutrição mineral de plantas*. pp. 327-354. Viçosa, Brazil: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Retrieved from: <https://repositorio.usp.br/item/001637183>.
- Esashika, T.; Oliveira, L.A. and Moreira, F.W. 2011. Teores foliares de nutrientes em plantas de camucamuzeiro (*Myrciaria dubia* HBK Mc Vaugh) submetidas a adubações orgânica, mineral e foliar. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 6(3):391-400. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v6i3a820>.
- Faquin, V. 2005. *Nutrição mineral de plantas*. pp. 183. Lavras, Brazil: UFLA/FAEPE. Retrieved from: http://www.dcs.ufla.br/site/_adm/upload/file/pdf/Prof_Faquin/Nutricao%20mineral%20de%20plantas.pdf.
- Ferreira, D.F. 2014. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* 38(2):109-112. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.
- Ferreira, K.S. 2014. Crescimento e acúmulo de nutrientes em mudas de aceloreira adubadas com nitrogênio e potássio. Dissertação de mestrado em Ciências Agrárias. Universidade Federal de São João Del Rei. BR, 50 p. Retrieved from: [https://ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/ppgca/Dissertacao%20Karine%20Ferreira\(1\).pdf](https://ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/ppgca/Dissertacao%20Karine%20Ferreira(1).pdf).
- Laviola, G.B. and Dias, A.L. 2008. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de Pinhão-Manso. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32:1969-1975. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832008000500018>.
- Magolbo, A.L.; Carmo, L.E.; Garcia, L.E.; Fernandes, M.A. and Leonel, M. 2015. Dry matter accumulation and mineral nutrition of arracacha in response to nitrogen fertilization. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50(8):669-680. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000800005>.
- Marschner, H. 2012. *Mineral nutrition of higher plants*. 3rd Edition, Adelaide, Australia: Elsevier. 672 p. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>.
- Mendonça, V.; Ramos, J.D.; Abreu, N.A.A.; Teixeira, G.A.; Souza, H.A.; Gurgel, R.L.S. and Orbes, M.Y. 2009. Adubação nitrogenada em cobertura na formação e substratos na formação de mudas de mamoeiro 'Formosa'. *Lavras. Revista Ciência e Agrotecnologia* 33(3):668-675. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000300002>
- Ortega, A.E. and Malavolta, E. 2012. Los más recientes micronutrientes vegetales. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica, Georgia* 7(1):16-25. Retrieved from: [http://www.ipni.net/publication/ialacs.nsf/232B901BB70122F985257A80005228D7/\\$FILE/16.pdf](http://www.ipni.net/publication/ialacs.nsf/232B901BB70122F985257A80005228D7/$FILE/16.pdf).
- Panduro, N.M.T.; Huamani, H.Y.; Sánchez, E.M. 2016. Concentración y extracción de nutrientes y metales pesados en la biomasa estacional y en la cosecha de *Myrciaria dubia* (HBK), en un Entisols de Yarinacocha. *Infinitum* 6(1):2-10. Retrieved from: <http://revistas.unjfc.edu.pe/index.php/INFINITUM/article/view/2>.
- Ranade-Malvi, U. 2011. Interaction of micronutrients with major nutrients with special reference to potassium. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 24(1):106-109. Retrieved from: <http://ring.ciard.net/es/karnataka-journal-agricultural-sciences>
- Santos-Serejo, A.J.; Dantas, L.L.J.; Sampaio, V.C. and Coelho, S.Y. 2009. *Fruticultura Tropical*. pp. 509. Brasília, Brazil: Embrapa Informação Tecnológica. Retrieved from: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/biblioteca=CPATSA&busca=autoria:%22SAMPAIO,%20C.%22&qFacets=autoria:%22SAMPAIO,%20C.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>
- Viégas, M.I.; Thomaz, A.A.M.; da Silva, F.J.; Conceição, O.E.H. and Naiff, M.P.A. 2004. Efeito da omissão de macronutrientes e boro no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral de plantas de camucamuzeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura* 26(2):315-319. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452004000200032>.
- Yuyama, K. and Valente, J.P. 2011. *Camu-camu, Myrciaria dubia* HBK McVaugh. 216 p. Curitiba, Brazil: INPA.

Genome size and ploidy variations in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and napier grass (*Pennisetum purpureum*) genotypes

Tamaño de genoma y variaciones de ploidía en genotipos de *Pennisetum glaucum* y *Pennisetum purpureum*

David Adedayo Animasaun^{1,2*}, Joseph Akintade Morakinyo¹, Oba Toyin Mustapha¹ and Rama Krishnamurthy^{1,2}

1.Department of Plant Biology, University of Ilorin, Ilorin, Kwara State, Nigeria. 2.C. G. Bhakta Institute of Biotechnology, Uka Tarsadia University, Bardoli, Gujarat, India. *Author for correspondence: animasaun.ad@unilorin.edu.ng
 biostanleydayor@yahoo.com.au

Rec.: 2018-11-02 Acep.:2019-09-10

Abstract

Pennisetum glaucum (Pearl millet) and *P. purpureum* (Napier grass) are economically important members of the genus *Pennisetum*. The knowledge of variability in chromosome number, size and genomic content of the species could provide clues on the mechanisms responsible for decrease or increase in genomic content in the evolutionary pathway. In the present study, twenty nine genotypes consisting of 24 pearl millet and 5 Napier grass were assessed for inter- and intra-variations in chromosome number, ploidy status and genome content. Conventional cytogenetic was used for chromosome counting and flow cytometry technique for assessing genomic contents of the genotypes. Pearl millet genotypes were diploid ($2n = 14$) while Napier grass were mainly polyploid ($2n = 28$). Despite differences in the ploidy levels, the basic chromosome number was 7. The average 2C values was 4.86 pg and 4.58 pg for pearl millet and Napier grass genotypes respectively. The DNA content per haploid cell was higher among pearl millet genotypes and the genomic size were negatively related to chromosome number and ploidy levels, meanwhile, the GC richness was directly proportional to genomic size of the genotype. The mean channel values showed that the genotypes were nuclear haploid. The present study suggests that evolution and development of polyploidy was accompanied with loss in genomic content in Napier grass. It was also discovered that pearl millet with less number of chromosome, had higher genome size than Napier grass.

Key words: Genome size; flow cytometry; Napier grass; pearl millet; *Pennisetum*; ploidy analysis.

Resumen

Pennisetum glaucum y *P. purpureum* son miembros económicamente importantes del género *Pennisetum*. El conocimiento de la variabilidad en el número de cromosomas, el tamaño y el contenido genómico de la especie podría proporcionar pistas sobre los mecanismos responsables de la disminución o el aumento del contenido genómico en la vía evolutiva. En el presente estudio se evaluaron veintinueve genotipos que constaban de 24 *P. glaucum* y 5 *P. purpureum* para determinar las variaciones inter e intra del número de cromosomas, el estado de la ploidía y el contenido del genoma. Se usó la citogenética convencional para el conteo de cromosomas y la técnica de citometría de flujo para evaluar el contenido genómico de los genotipos. Los genotipos de *P. glaucum* fueron diploides ($2n = 14$) mientras que el pasto *P. purpureum* fue principalmente poliploide ($2n = 28$). A pesar de las diferencias en los niveles de ploidía, el número básico de cromosomas fue 7. Los valores promedio de 2C fueron 4.86 pg y 4.58 pg para los genotipos de *P. glaucum* y *P. purpureum*, respectivamente. El contenido de ADN por célula haploide fue mayor entre los genotipos de *P. glaucum* y el tamaño genómico se relacionó negativamente con el número de cromosomas y los niveles de ploidía, mientras que la riqueza de GC fue directamente proporcional al tamaño genómico del genotipo. Los valores medios del canal mostraron que los genotipos eran haploides nucleares. El presente estudio sugiere que la evolución y el desarrollo de la poliploidía se acompañó con una pérdida en el contenido genómico en *P. purpureum*. También se descubrió que el *P. glaucum* con un menor número de cromosomas tenía un mayor tamaño del genoma que *P. purpureum*.

Palabras clave: Tamaño del genoma; citometría de flujo; *Pennisetum glaucum*; y *Pennisetum purpureum*; *Pennisetum*; análisis de ploidía

Introduction

The genome size and ploidy level varies extensively among organisms and various species. Among the flowering plants for instance, there are intra- and inter-species variation in genomic size and ploidy status among the members of a family, genus and species (Dolezel et al., 1992). This has given rise to speculations regarding the ancestral genome size of these plants and trends in their genome evolution. The genome size and genomic ploidy level, chromosome number and size variation between and within a species may be of great importance in the study of evolution and development of a breeding programme (Bennett and Leitch, 1995). In addition, the knowledge of genomic size and ploidy status of a plant could provide clues on the mechanisms responsible for decrease or increase in genomic content in the evolutionary pathway (Bennetzen and Kellogg, 1997).

Variation in chromosome number among the members of a genus of flowering plants are variously documented (Martel et al., 1997; Techio et al., 2006; Ogra et al., 2009). Also, intraspecific variations in genome size have been reported in maize (Rayburn et al., 1989) and pea (Arumuganathan and Earle, 1991; Beranyi and Greilhuber, 1995). A comprehensive study on angiosperm genome size variation was conducted by Soltis et al. (2003) and Walker et al. (2005) on nuclear DNA content and ploidy status of *Atriplex halimus*. Genome size in angiosperms varied from small values (0.05 pg) in *Cardamine amara* (Bennett and Smith, 1991) to huge (127.4 pg) in *Fritillaria assyriaca* (Bennett and Smith, 1976). Despite this huge range in DNA contents, the basic complement of genes required for normal growth and development appears to be essentially the same. Meanwhile, chromosomal aberrations could create structural and sequence composition differences between genomes of closely related species. Such changes often affect chromosome behaviors at meiosis resulting into divergence and evolution of species (Rees et al., 1982).

Pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and Napier grass (*P. purpureum*) are the most economically important members of the genus *Pennisetum*, which consists of heterogeneous assemblage of species with varying reproductive behaviors. The basic chromosome numbers are $x = 5, 7, 8,$ and 9 while ploidy levels ranges from diploid to octaploid (Martel et al., 1997; Techio et al., 2006). The primary pool consists of cultivated and wild diploids, the secondary pool has solely Napier grass and the tertiary pool includes many distantly related species of various ploidy levels which do not naturally interbreed with the primary pool.

Considering differences in chromosome number and ploidy status of pearl millet and napier grass, the higher ploidy level of napier

grass over pearl millet has raised the question ¿which of the species has higher genome content? ¿Could higher ploidy status be linked to smaller chromosome and less genome size? To this end, using conventional cytogenetics and flow cytometry techniques we assessed the ploidy status and genomic content of the species. The aim was to determine the intra- and inter-specific variations in chromosome number and genome size of pearl millet and Napier grass accessions with the view of increasing the understanding of the relationship between chromosome number, ploidy status and nuclear DNA content as it affects species complexity and evolution.

Material and methods

Plant material

Twenty-four genotypes of pearl millet collected from farmer's field and research institutes in India and Nigeria were used for the study. Also, clones of five Napier grass genotypes; two wild and three cultivated were collected from different sources as shown in Table 1.

Plant germination and growth

The genotypes were grown in the green house at C. G Bhakta Institute of Biotechnology, Uka Tarsadia University, Bardoli, India. Two millet seedlings were raised in a planting bag while stem cutting of about two nodes were used to propagate the Napier grass genotypes. For each of the genotypes, five replicates were provided. Observations were made on reproductive behaviors and life cycle.

Chromosome number and ploidy determination

Seeds of the pearl millet genotypes were harvested from the grown plants. The seeds were germinated on moist filter paper in placed in petri dish in the Biotechnology Laboratory at CGBIBT. Root tips (0.3 - 0.5 cm) were harvested and pretreated with 8-hydroxyquinoline (2 mM) for 4 hours at 4 °C. The pretreated roots were fixed in ethanol acetic acid (3:1). Feulgen staining and squashing methods were carried out as described by Khalfallah et al. (1993). Chromosome number and ploidy level were determined by viewing the slides under light microscope (Labophot, Nikon Corp., Japan) mounted with digital camera (Nikon DXM1200, Nikon Corp, Japan).

Flow Cytometry Analysis

Flow Cytometry determination of the nuclear DNA and genomic ploidy status was carried out using fresh young leaf tissues. About 20 mg of the leaf

Table 1. Name and source of genotypes of pearl millet and Napier grass used for genomic size and ploidy analysis.

SN	Genotype	Common name	Source of collection
1	IP3616	Pearl millet	ICRISAT
2	IP3495	Pearl millet	"
3	NGB00463	Pearl millet	NACGRAB
4	BALKUVE	Pearl millet	Gujarat, India [†]
5	BAJARA	Pearl millet	Gujarat, India [†]
6	NGB00616	Pearl millet	NACGRAB
7	IP4133	Pearl millet	ICRISAT
8	NGB01263	Pearl millet	NACGRAB
9	IP22281	Pearl millet	ICRISAT
10	IP12556	Pearl millet	"
11	NGB00458	Pearl millet	NACGRAB
12	NGB00531	Pearl millet	"
13	IP22271	Pearl millet	ICRISAT
14	NGB00476	Pearl millet	NACGRAB
15	IP22268	Pearl millet	ICRISAT
16	TAYABI	Pearl millet	Gujarat, India [†]
17	JALGONE	Pearl millet	"
18	NGB00551	Pearl millet	NACGRAB
19	IP17862	Pearl millet	ICRISAT
20	IP3122	Pearl millet	"
21	NGB00528	Pearl millet	NACGRAB
22	IP22269	Pearl millet	ICRISAT
23	NGB00528	Pearl millet	NACGRAB
24	NGB00537	Pearl millet	"
25	OMUO-GREEN	Napier grass	Ekiti-State, Nigeria ^{††}
26	OMUO-PURPLE	Napier grass	"
27	COMBUS-CO2	Napier grass	Tamil-Nadu, India ^{†††}
28	COMBUS-CO3	Napier grass	"
29	COMBUS-CO4	Napier grass	"

NACGRAB: National Centre for Genetic Resources and Biotechnology, Ibadan, Nigeria. ICRISAT: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patanchera, Andhra Pradesh, India. [†] Collected from farmers' field, in Surat District of Gujarat State, India. ^{††} Omuo-Ekiti, Ekiti State, Nigeria. ^{†††} Department of Forage Crop, Tamil Nadu University of Agriculture, Coimbatore, India.

tissues were taken from expanding leaves for each of the genotypes of pearl millet and Napier grass. *Pisum sativum* (2C DNA = 8.76 pg and DNA diploid) grown under greenhouse conditions was used as an internal standard (Dolezel et al., 1998; Godelle et al., 1993). We used intercalating Propidium iodide (PI) as fluorescence stain for the genomic size determination and base specific mithramycin (MI) dye for GC % determination (Dolezel et al., 1992; Crissman and Steinkamp, 1993). The leaf tissues of each genotype were chopped and finely diced with a razor blade in a petri dish containing 0.5 ml of nuclei extraction buffer. The extraction process followed the method described by Rounsaville and Ranney (2010). The resultant mixture was filtered

into a small test tube. A solution consisting 2 ml staining buffer, 6 μ l RNase A and 12 μ l PI (Cystain PI Absolute P Nuclei Extraction Buffer; Partec GMBH, Munster, Germany) was added to the filtrate to give the final PI and RNase concentrations of 50 μ g μ l⁻¹ and 17.5 μ g μ l⁻¹, respectively. The sample solutions were stored at 4 °C for 1 hour.

FACS Calibur (Becton and Dicknson, San Jose USA) Flow Cytometer was used for the analysis. A minimum of 2000 counts was carried out for each sample to estimate the nuclei DNA by internal standard method (Dolezel, 1997). Analysis were conducted in five replicates. The DNA was estimated by using the ratio of the pearl millet/*Pisum sativum* and Napier grass/*Pisum G1* positions, respectively, and the coefficients of variation observed for the peak within each histogram were recorded. Haploid, 2C genome size was calculated as: 2C = genome size of standard multiply by mean fluorescence value of sample in relation to mean fluorescence of the standard. The mean DNA content per chromosome was estimated as: DNA content in 2C nucleus (pg)/total chromosome number to compare the genome size at chromosome level for the genotypes. The two complementary estimates of base-composition of each of the genotype relative to a standard of known genome size and base composition (*Pisum sativum*; 40.5 GC %) was determined by the method of Godelle et al. (1993). The nuclear DNA was analyzed using Cell Quest Pro Software and the result compared and validated by FloJo, a third party software.

Results

Cytological results showed that pearl millet genotypes were diploid with 14 chromosomes ($2n = 2x = 14$). All the Napier grass genotypes were tetraploid with 28 chromosomes ($2n = 28$) except COM-CO-3 ($2n = 21$) (Figure 1). Observations on the reproductive behavior of the genotypes showed that all pearl millet were sexual, flower and fruit bearing. Napier grass genotypes Omuo green, COM-CO-3 and COM-CO-4 flowered while Omuo purple, and COM-CO-3 Napier grass did not flower during the period of the experiment. All pearl millet genotypes were annual with a life cycle of 2-3 months. The Napier grass on the other hand were perennial (Table 2).

The DNA content per nucleus ranged from 2.96-4.86 pg and 2.70-4.58 pg for pearl millet and Napier grass genotypes, respectively. The highest amount of DNA (4.86 pg) was found in pearl millet NGB01263 genotype and the least value (2.96 pg) was recorded in IP3616 which is an ICRISAT genotype (Table 2). Among the Napier grass, the highest DNA content was found in

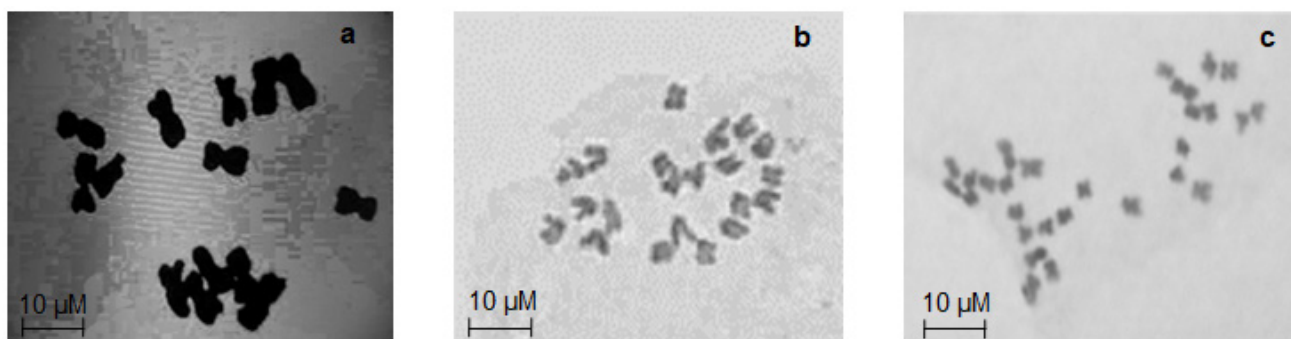


Figure 1. (a): $2n = 14$ chromosome numbers of all genotypes of pearl millet; (b): $2n = 21$ chromosome numbers of Napier grass COM-CO3 genotype; (c): $2n = 28$ chromosome numbers of Napier grass genotypes Omuo-green, Omuo-purple, COM-CO-2 and COM-CO-4.

COM-CO-2, while COM-CO-3 contained the least amount of DNA (2.70 pg) per nucleus. The mean DNA content per haploid set of genome varied, genotypes with higher ploidy levels (triploid and tetraploid) had less amount of DNA per haploid set. Similarly, the higher the ploidy status, the less the amount of DNA per chromosome.

The base composition (%GC) for the genotypes ranged from 40.01 to 44.44% (Table 2), the genomic size was directly proportional to the %GC composition. With respect to DNA ploidy level, all the studied genotypes had mean channel values less than 300 in comparison with the internal standard (*Pisum sativum*) which had ≥ 400 as against 156.99 - 248.66 among the pearl millet and Napier grass genotypes. Histograms of fluorescence intensities and peaks associated with nuclei isolated from leaves of pearl millet and Napier grass genotypes by flow cytometry analysis is shown in Figure 2. The peaks of the histograms marked the properties and sorting of events associated with nuclei counts of the cells from leaves of pearl millet and Napier grass in the determination of the genomic ploidy analysis by the flow cytometry procedure.

Discussion

In the present study, we observed a consistent chromosome number of $2n = 14$ among the pearl millet genotypes irrespective of their sources while Napier grass had 28 chromosomes with the exception of COM-CO-3 ($2n = 21$). However, despite variations in the chromosome number, basic chromosome number of $x = 7$ was maintained for the species. Earlier reports have indicated that basic chromosome number in *Pennisetum* varied from $x = 5$, $x = 7$, $x = 8$ and $x = 9$ (Harlan and de Wet, 1971, Morakinyo and Adebola, 1991; Techio et al., 2006). Pearl millet and Napier grass belong to the group of $x=7$, thus our findings agreed with the earlier reports. Cytological observation showed fewer chromosome number in pearl millet, but the chromosome sizes are larger than those of Napier

Table 2. DNA amount and base composition of pearl millet and Napier grass genotypes determined by flow cytometry.

Genotype	Life cycle	2C DNA (pg)*	Mean Channel (No)	DNA/ haploid (pg)*	DNA / chromosome (pg)*	GC (%)
IP3616	Annual	2.96	149.33	1.48	0.211	40.21
IP3495	Annual	4.82	243.41	2.41	0.344	44.11
NGB00463	Annual	4.52	228.50	2.26	0.322	41.60
BALKUVE	Annual	4.56	230.32	2.28	0.325	42.15
BAJARA	Annual	4.82	243.41	2.41	0.344	44.09
NGB00616	Annual	4.52	218.10	2.26	0.322	40.75
IP4133	Annual	4.66	235.20	2.33	0.332	41.32
NGB01263	Annual	4.86	256.15	2.43	0.347	42.21
IP22281	Annual	4.80	242.55	2.40	0.342	42.15
IP12556	Annual	4.84	244.33	2.42	0.346	41.98
NGB00458	Annual	4.61	232.98	2.30	0.329	42.70
NGB00531	Annual	4.82	243.56	2.41	0.344	42.91
IP22271	Annual	4.82	243.56	2.41	0.344	42.12
NGB00476	Annual	4.62	233.22	2.31	0.330	41.58
IP22268	Annual	4.53	228.85	2.26	0.323	40.56
TAYABI	Annual	4.57	230.91	2.28	0.326	41.25
JALGONE	Annual	4.73	238.74	2.36	0.338	43.23
NGB00551	Annual	4.73	238.74	2.36	0.338	44.18
IP17862	Annual	4.68	236.22	2.34	0.334	41.45
IP3122	Annual	4.56	230.07	2.28	0.325	41.34
NGB00528	Annual	4.30	233.99	2.15	0.307	40.85
IP22269	Annual	4.63	188.03	2.31	0.330	41.78
NGB00528	Annual	4.72	197.42	1.86	0.266	44.44
NGB00537	Annual	3.96	181.10	1.98	0.282	40.96
O M U O - GREEN	Perennial	4.54	231.11	0.89	0.128	40.01
O M U O - PURPLE	Perennial	4.38	136.19	1.02	0.145	40.33
C O M - BUS-CO2	Perennial	4.58	215.96	1.14	0.164	42.61
C O M - BUS-CO3	Perennial	2.70	454.55	0.90	0.129	40.18
C O M - BUS-CO4	Perennial	4.28	149.33	1.07	0.153	42.26

$2n$ = number of chromosomes, $2x$ = diploid, $3x$ = triploid, $4x$ = tetraploid, 2C is the total genome in the accessions and %GC stands for percentage richness of Guanine and Cytosine base in the genome. *1 pg = 987 Mbp

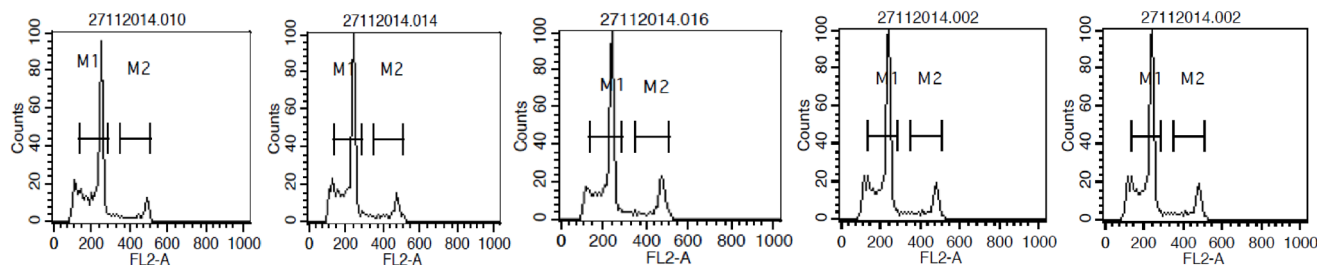


Figure 2. Representative histograms of fluorescence intensities, markers properties and events associated with nuclei isolated from leaves of pearl millet and Napier grass genotypes by Flow Cytometry technique

grass. The fairly large chromosomes of the studied genotypes is in tandem with Jauhar (1981), who noted that generally the $x = 7$ members of the genus *Pennisetum* have larger chromosome sizes compared with other groups.

Ployploidization is a significant phenomenon that can play a role in genome rearrangement, adaptation, reproductive isolation and ultimately speciation. It is important in plant breeding because it can influence hybridization, fertility and gene expression (Adam and Wendel, 2005). The triploid Napier grass genotype is most likely a product of hybridization between pearl millet and Napier grass as elucidated by Dowling et al. (2014). According to Martel et al. (1997), although strong reproductive barriers exist between pearl millet and Napier grass, triploid hybrids that are partially sterile do occur in nature. Due to their allogamy nature, hybridization between the species produced $AA'B$ genome during meiosis in such hybrids, i.e. the A' and A genomes of Napier grass and pearl millet associate (Jauhar and Hanna, 1998; Dowling et al., 2014). Partial sterility of the resultant hybrid could therefore be attributed to reduction in pairing of smaller A' chromosomes of Napier grass with the larger A chromosomes of pearl millet. Since members of A and B genomes do not pair with one another, the B genome members remained univalent lagging behind the other chromosomes during anaphase I and II and may not be included in the developing nuclei, thus resulting in sterility (Jauhar, 1968).

Although the genomic size varied among the genotypes, the DNA contents of the pearl millet genotypes were close. Martel et al. (1997) reported DNA content of 4.71 and 4.59 pg for pearl millet and Napier grass, respectively, which is congruent to our present findings. Whereas the previous report was exclusively based on representative genotypes of the genus, a larger number of genotypes of pearl millet and Napier grass were sampled in our study. Our observations lend credence to hypotheses of genome constitution of Napier grass propounded by Jauhar (1981) and reinforced the allotetraploid

origin of Napier grass by amphiploid mechanism through unreduced gamete and consequently decrease in chromosome size. Such decreases in chromosome size in our view, undoubtedly led to reduced genome per chromosome. Averagely, the amount of DNA in the Napier grass is similar, despite the difference in chromosome number and ploidy levels. Apparently, the genotypes of pearl millet which are cultivated species must have evolved from a common ancestor but ecologically isolated by domestication and human agricultural activities which invariably accounts for different genomic contents observed.

Alternatively, in the opinion of Martel et al. (1997), Napier grass likely evolved from the fragmentation of large chromosomes of a diploid hypothetical ancestor ($2n = 14$). The variation in nuclear DNA among the polyploid Napier grass may reflect their independent evolution from diploid species of primary gene pool via auto- or allopolyploidization as opined by Soltis and Soltis (2000). Different ' B ' chromosome number may contribute to variations in DNA content and compromise fertility of interspecific hybrids due to chromosomal sterility. Earlier, difference in nuclear DNA content was suggested to confer adaptation to different environmental conditions (Walbot and Cullies, 1985). In contrast, Walker et al. (2005), noted no significant differences in nuclear DNA content of *Atriplex halimus* grown under different temperatures and humidity. According to Price et al. (2000), the presence of secondary compounds in the plant tissues can affect nuclear DNA content directly or interfere with the staining and/or the fluorescence during analysis procedure.

The amount of DNA per chromosome was reduced among the Napier grass genotypes. This is likely due to decrease in chromosome size although chromosome number and ploidy level increase, without corresponding increase in the genome content. Thus, reduction in chromosome size could lead to reduced DNA content per haploid set of genome, this statement may be relative and true for the genotypes evaluated.

Sometimes, genomic size may vary independent of chromosome number. For instance, Walker et al. (2005) observed that some tetraploid populations of *Atriplex halimus* have more than double the diploid amount of DNA which may be due to amplification of retrotransposons, accumulation of retro-elements (Bennetzen and Kellogg, 1997) or gain of restriction fragments (Song et al., 1995). The existence of different ploidy levels in Napier grass could confer a greater genetic heterozygosity at both individual and population levels and this may enhance selective advantage in unsuitable environments. As demonstrated by Walker et al. (2005), remarkable environmental tolerance in polyploid members of the *Artiplex halimus* was due to their greater heterozygosity.

Among flowering plants, chromosome number and genome size varies tremendously and there is a considerable speculation regarding both the original genome size and base chromosome number of the angiosperms (Arumuganathan and Earle, 1991). It was proposed that the original base chromosome number and genome size for monocot was small (Soltis et al., 2003). From the histograms of C-values for about 2802 species constructed by Leitch et al. (1998), species with C-values of 1.4 pg and 3.5 pg were designated as very small and small genomes, respectively. Consequently, since the pearl millet genotypes in the present study had less than 3.5 pg C-values and therefore belong to the category of small genome plants while the Napier grass (C-value < 1.4 pg) has very small genome per haploid chromosome. The small C-values we obtained for Napier grass genotypes suggest an evolutionary lineage that have experienced decrease in genome size over the years.

Genome size and base composition are directly proportional and genotypes with higher genome size are also richer in the %GC. The %GC obtained here was relatively similar and concurred with the report of Martel et al. (1997). Meanwhile, the base composition between 40.21-43.23% we reported for pearl millet genotypes is less than the values documented for its wild relatives *P. mollissium* (46.5%) and *P. viola* (47.2%) by Martel et al. (1997). Variation in base composition have been noted in some plant species (Cerbah et al., 1995; Godelle et al., 1993). It is important to mention that variation in base composition did not provide concise information of genome sequence that could have changed in the evolutionary process. In addition, the relationship between base composition richness and genomic size may not always be linear with respect to other species. There is a correlation between mean channel number of the nuclei analysis and DNA ploidy status. The channel number obtained in this study for all the assessed genotypes was less than 300, thus indicated that

all the genotypes are nuclear haploid because, channel number approximately 400 and above signifies diploid species as obtained in the internal standard *Pisum sativum*.

Conclusion

The understanding of nuclear genome and its components could provide clues to the mechanisms that could be responsible for genome increase or decrease in the evolutionary pathway. In the present study, the difference in C-values of genotypes of pearl millet was not remarkable, but genome size of pearl millet was slightly larger than Napier grass despite the higher chromosome number and ploidy levels of the latter. The bigger chromosome size in pearl millet possibly accounts for its higher DNA content per haploid set even though the chromosomes are fewer than in Napier grass. It was possible that in the course of polyploidy evolution of the Napier grass from its hypothetical ancestor, genomic materials are lost and the evolved smaller chromosome size had reduced genome content. The information provided by the genomic and ploidy analysis of these two most economically important members of *Pennisetum* will enrich the existing knowledge of their genetics and enhance development of improved cultivars.

Conflict of Interests

We declare there are no conflicts of interest in whatsoever form between the authors in research design, execution, manuscript preparation and choice of journal.

Acknowledgments

The authors are thankful to Management of Central Imaging and Flow Cytometry Facility Centre for Cellular and Molecular Platforms, National Centre for Biological Sciences, Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore India for permission to use their facilities and the technical support provided.

References

- Adams, K. L.; Wendel, J. 2005. Novel patterns of gene expression in polyploidy plants. *Trends in Genetics* 21:539-543.
- Arumuganathan, K.; Earle, E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Research* 9:208-218.
- Bennett, M. D.; Leitch, U. 1995. Nuclear DNA amount in angiosperms. *Annals of Botany* 76:113-176.
- Bennett, M. D.; Smith, J. B. 1976. Nuclear DNA amount in angiosperms. *Philosophical Transactions*

- of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences 274:227-274.
- Bennett, M. D.; Smith J. B. 1991. Nuclear DNA amount in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences 334:309-345.
- Bennett, M. D.; Bhandol, P.; Leitch, I. J. 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperm and their modern uses -807 new estimates. Annals of Botany 86:859-909
- Bennett, M. D.; Leitch, I. J.; Hanson, L. 1998. DNA amounts in two samples of angiosperm weed. Annals Botany 82(Supplement A) 121-134
- Bennetzen, J. L.; Kellogg, E. A. 1997. Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? Plant Cell 9:1509-1514
- Beranyi, M.; Greilhuber, J. 1995. Flow cytometric analysis of genome size variations in cultivated and wild *Pisum sativum* (Fabaceae). Plant Systematics and Evolution 194:231-239.
- Cerbah, M.; Couleau, J.; Godelle, B.; Slljak-Yakoviev, S. 1995. Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. Genome, 38:689-695.
- Crissman, J.; Steinkamp, J. A.; 1993. Cell cycle-related changes in chromatin structure detected by flow cytometry using multiple DNA fluorochromes. European Journal of Histochemistry 37(2):129-38.
- Dolezel, J. 1997. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38:285-302
- Dolezel, J.; Sgorbati, S.; Lacretti, S.; 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85:625-631.
- Dolezel, J.; Greilhuber, J.; Lucretti, S.; Lysak, M. A.; Nardi, L.; Obermayer, R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* 82:17-26
- Dowling, C. D.; Burson, B. L.; Jessup, R. W. 2014. Marker-assisted verification of Kinggrass (*Pennisetum purpureum* Schumch. X *Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.). *Plant Omics Journal* 7(2):72-79
- Godelle, B.; Cartler, D.; Marie, D.; Brown, S.; Slljak-Yakoviev, S. 1993. Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base-composition. *Cytometry* 14:618-626.
- Harlan, J. R.; de Wet, J. M. J. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20:509-517.
- Jauhar, P. P. 1968. Inter- and Intra-genomal chromosome pairing in an Inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. *Genetica* 39:360-370.
- Jauhar, P. P. 1981. Cytogenetic and breeding of pearl millet and related species. Alan R. Uss. New York
- Jauhar, P. P.; Hanna, W. W. 1998. Cytogenetic and genetics of pearl millet. *Advances in Agronomy* 64:1-26.
- Khalfallah, N.; Sarr, A.; Siljak-Yakovlev, S. 1993. Karyological study of some cultivated and wild stocks of pearl millet from Africa (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb. and *P. violaceum* (Lam.) L. Rich. *Caryologia* 46:127-138.
- Leitch, I. J.; Chase, M. W.; Bennett, M. D. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence of small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany* 82, 85-94
- Martel, E.; De Nay, D.; Siljak-Yakovlev, S.; Brown, S.; Sarr, A. 1997. Genome size variation of basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. *Journal of Heredity* 88:139-143.
- Morakinyo, J. A.; Adebola, P. O. 1991. Karyotype analysis and meiotic chromosome behaviour in *Pennisetum americanum*, *P. purpureum* and *P. pedicellatum*. *Nigerian Journal of Botany* 4:127-134
- Ogar, R. K.; Mohanpuria, P.; Sharma, U. K.; Sharma, M.; Siha, A. K.; Ahuja, P. S. 2009. India calamus (*Acorus calamus* L.): not a tetraploid. *Current Sciences* 97:1644-1647
- Price, H. J. 1976. Evolution of DNA content in higher plants. *Botanical Review* 42:27-52.
- Price, H. J.; Hodnett, G.; Johnston, J. S. 2000. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Annals of Botany*, 86 929-934
- Rayburn, A. L.; Auger, J. A.; Benzlnger, E. A.; Hepburn, A. G. 1989. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. *Journal of Experimental Botany* 40:1179- 1183.
- Rees, H.; Jenkins, G.; Seal, A. G.; Hutchinson, J. 1982. Assays of the phenotypic effects of changes in DNA amounts. In: Dover D. A., and Flavell R. B. (eds.) *Genome evolution*. Academic Press, London. pp. 287-297.
- Rounsaville, T. J.; Ranney, T. G. 2010. Ploidy levels and genomic sizes of *Berberis* L. and *Mahonia* Nutt. species, hybrids and cultivars. *HortScience* 47(7):1029-1033
- Song, K.; Lu, P.; Tang, K.; Osborn, T. C. 1995. Rapid genome changes in synthetic polyploids of *Brassica* and its implication for polyploidy evolution. *Proceedings of National Academy of Science, USA*. 92:7719-7723.
- Soltis, P. E.; Soltis, D. E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 97:7051-7057
- Soltis, D. E.; Soltis, P. S.; Bennett, M. D.; Leitch, I. 2003. Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany* 90(11):1595-1603
- Techio, V. H.; Davide, L. C.; Pereira, A. V. 2006. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology* 29(2):415-423
- Walbot, V.; Cullis, C. A. 1985. Rapid genomic change in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 36:367-396
- Walker D. J.; Monino, I.; Gonzalez, E.; Frayssinet, N.; Correal, E. 2005. Determination of ploidy and nuclear DNA content in populations of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Botanica Journal of Linnaean Society* 147:441-448.

Pre-treatments effect on the tetrazolium test on *Epidendrum barbaricum* Hágsater & Dodson seeds

Efecto de pretatamientos en la prueba de tetrazolio en semillas de *Epidendrum barbaricum* Hágsater & Dodson

Seir Antonio Salazar Mercado^{1*}; Edison Alexander Botello Delgado²; y Jesús David Quintero Caleño²

1.Universidad Francisco de Paula Santander, Departamento de Biología. Avenue Gran Colombia # 12E-96B Colsag. San José de Cúcuta, Colombia. Postal Code: 540003., 2.Universidad Francisco de Paula Santander, Departamento de Ciencias Agrarias. Avenue Gran Colombia # 12E-96B Colsag. San José de Cúcuta, Colombia. Postal Code: 540003. *Author for correspondence: salazar663@hotmail.com

Rec.: 2019-05-10 Acep.:2020-01-10

Abstract

Orchids are affected by several factors that impair their spreading, which is necessary to know the viability of their seeds. The aim of this research was to determine the most suitable preconditioning treatment to potentiate the tetrazolium test in *Epidendrum barbaricum* seeds. Initially, the mature capsules were collected near the city of Pasto in the Department of Nariño (Colombia), and seeds were obtained. Subsequently, the seeds were submitted to four pretreatments: immersion in distilled water, 1% hypochlorite, 10% alcohol and 10% sucrose. Seeds were then rinsed with distilled water and exposed to two concentrations of 2,3,5-trifenyil tetrazolium chloride (0.25%, 1%) and different exposure times (6, 12, 24, and 48 hours). To perform the tests, the 5 ml syringe with cloth filter method was used. The viability test results were corroborated with the *in vitro* germination test, using the MS (Murashige and Skoog) culture medium. The most reliable viability findings (93%) were obtained by using preconditioning with sodium hypochlorite, a value that has a high correlation with the percentage of germination (93%), independent of the tetrazolium concentration at an exposure time of 24 hours.

Key words: Capsules, Germinative capacity, Orchids, Seeds quality, Sodium hypochlorite.

Resumen

Las orquídeas son afectadas por varios factores que perjudican su propagación. En este estudio se evaluaron diferentes métodos de pre-acondicionamiento para potenciar la prueba de tetrazolio en semillas de *Epidendrum barbaricum*. Inicialmente las cápsulas maduras fueron recolectadas en la ciudad de Pasto, departamento de Nariño (Colombia), las cuales fueron sometidas a los pretratamientos: inmersión en agua destilada, hipoclorito al 1%, alcohol al 10% y sacarosa al 10%, antes de ser lavadas con agua destilada y tratadas con concentraciones de 2,3,5- cloruro trifeníil tetrazolio (0.25%, y 1%) durante tiempos de exposición de 6, 12, 24 y 48 horas. Para las aplicaciones fueron utilizadas jeringas de 5 ml con filtro de tela. Los resultados del test de viabilidad fueron validados con la prueba de germinación *in vitro*, utilizando el medio de cultivo MS (Murashige and Skoog). Los mejores porcentajes de viabilidad (93%) se encontraron con la aplicación de hipoclorito de sodio, con una alta correlación con el porcentaje de germinación (93%), independiente de la concentración de tetrazolio y un tiempo de exposición de 24 horas.

Palabras claves: Capacidad germinativa; Calidad de semillas; hipoclorito de sodio; Orquídeas; pre-acondicionamiento.

Introduction

Epidendrum barbaricum Hágsater & Dodson is an epiphytic plant belonging to the Orchidaceae family. This group of plants has a wide variety and has more than 28,000 accepted species with 763 genus (Zhang et al., 2018), representing about 10% of the diversity of the plant kingdom. Orchids are very successful regarding the adaptation mechanisms to a wide variety of environments (Alghamdi 2017), occupying almost all the habitats on the Earth (Ramya et al., 2017) between tropical and subtropical forests, where they are found mainly as epiphytes plants (Srivastava et al., 2018), which represents 70% of the species of this family and approximately 30% of the known species are terrestrial (Fracchia et al., 2016). The commercial production of orchids is one of the most important and profitable economic activities in the nursery industry worldwide as they are very popular plants because of their beautiful flowers, their long floral longevity, their medicinal and horticultural importance (Deka et al., 2017).

Orchids are highly vulnerable to habitat disturbance compared to other plants (Salazar and Gelvez 2015), and they are being threatened due to several factors such as intensive collection, forest fragmentation, overexploitation and also due to the fact that they largely depend on biotic interactions such as pollinators and mycorrhizae (Segovia-Rivas et al., 2018). In addition, they produce small seeds, which lack of endosperm so that under natural conditions they depend on mycorrhizal fungi for symbiotic germination which are necessary until adulthood for their survival (Chaves et al., 2015), accomplishing an important role in the nutrition of orchids. Moreover, The seeds present relative low germination rates of 5% (Vudala et al., 2019). The complicated propagation of the seeds plus the threats of extinction harms diverse species of orchids, in such a way that they tend to decline their population, for which; generating information about the quality of the seed is important both for conservation in germplasm banks and for crop production (Ramya et al., 2017). Due to the value of this parameter, several tests have been developed to know the germinative capacity of seeds, such as germination test and tetrazolium staining (Salazar et al., 2018; Salazar et al., 2020a). The last one stands out for offering a fast and reliable alternative for the determination of the seeds viability (Carvalho et al., 2017), and in comparison with the in vitro germination test, it is not affected by microorganisms (Schultz et al., 2014). Likewise, it has been proven to be effective in determining the germinative capacity of several orchid species (Salazar et al., 2013; Salazar and Gelvez 2015; Salazar and Vega, 2017), based on the activity of the dehydrogenated enzymes involved in the respiration process, especially malic acid

dehydrogenase, which reduces the tetrazolium salt upon contact with living tissues, forming triphenyl formazan, a stable, non-diffusible red colored compound (Salazar and Botello 2018), which it is possible to indicate the viability of the seeds based on the embryo staining.

The tetrazolium test effectiveness is mediated by the development of preconditioning procedures, which facilitate the entry of the tetrazolium solution to the seed (Hosomi et al., 2017). It has been shown that pre-treatment with 10% sucrose in species of the *Cattleya* genus increases the accuracy of the tetrazolium test when compared with the in vitro germination rate (Hosomi et al., 2011). On the other hand, some orchid seeds have a strong coat that difficult wetting (Duarte 2017). According to Salazar (2012) the use of 1% sodium hypochlorite scarifies the tegument facilitating the entry of the tetrazolium salt into *Cattleya mendelli* seeds. According to the above, it is important to look for different pretreatments that optimize the seeds viability and germination. This study aims to evaluate the influence of preconditioning on the tetrazolium test effectiveness to determine the viability in *E. barbaricum* seeds.

Materials and methods

Vegetal material

Epidendrum barbaricum Hágsater & Dodson seeds were obtained from mature, naturally pollinated, indehiscent capsules that were collected near the city of Pasto (1° 10' 07" N and 77° 09' 09" W) at 2800 m.a.s.l. in the department of Nariño, Colombia. Afterwards, the capsules were stored at room temperature in Kraft paper envelopes (Salazar and Gelvez 2015) in a glass bottle with silica gel, in order to dehydrate them and avoid deterioration due to excess of moisture, during a period of 48 hours until the natural dehiscence of the capsules. The study was carried out at the Biology Laboratory, located in the Faculty of Basic Sciences, at the Francisco de Paula Santander University.

Pre-conditioning and seeds Viability

In order to increase the effectiveness of the tetrazolium test when determining the seeds viability, four pretreatments were evaluated, such as: 10 minutes immersion in distilled water (Duarte et al., 2017), 10% sucrose solution (Hosomi et al., 2011), 1% sodium hypochlorite (Salazar 2012), and 10% alcohol. By using a 5 ml syringe, which consisted on placing a small portion of seeds in a sterile 5 ml syringe with a cloth filter. Subsequently, pretreatments were carried out (Salazar 2012). The seeds without previous

conditioning were taken as control. Once the immersion time had elapsed, the solutions were extracted and the surpluses were eliminated with three rinses, using distilled water. Subsequently, for the determination of viability, 5 ml of the tetrazolium solution (2, 3, 5 triphenyl tetrazolium) was suctioned, exposing the seeds to different concentrations (0.25% and 1%) and exposure times (6, 12, 24 and 48 hour), under conditions of darkness at 25 °C. The seeds viability was classified according to the coloration of the embryo with the help of a LEICA EZ4 stereomicroscope. Viable seeds showed red staining in the embryo, due to the reduction of tetrazolium by cellular respiration, whereas dead tissues maintained their original color (Iossi et al., 2016).

Seeds disinfection and germination test

The disinfection and sowing of the seeds was carried out by implementing the syringe method (Salazar, 2012). Seeds were superficially disinfected with 70% ethanol for one minute, then immersed in sodium hypochlorite (NaOCl) at 0.75% plus 0.1% Tween-20, for a period of 5 minutes in constant agitation. At the end of the immersion time, 5 rinses were done with sterile deionized water (Vudala et al., 2019), then the filter was removed from the syringe and 100 seeds were planted in Petri dishes containing 25 ml of basal MS medium with a composition of 100% macro and micronutrients (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 3000 mg/L of sucrose, 8000 mg/L of agar, and 1000 mg/L of activated carbon. The pH was adjusted to 5.8 using NaOH, before autoclaving at 15 pounds of pressure (Psi) at 121 °C for 25 minutes. The cultures were kept in a growth room at 18 ± 2 °C (night/ day) and 64% relative humidity, under a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness, provided by fluorescent tubes with $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intensity, for a period of 70 days. In order to determine the germination percentage, 100 seeds were examined per treatment with a LEICA EZ4 stereomicroscope, the germinated seed was considered to be the seed that presented a rupture of the seed coat due to the enlargement of the embryo according.

Statistical analysis

In the tetrazolium test and germination test, the data were randomly distributed with 5 repetitions and 100 seeds per repetition. The data were analyzed by means of a variance analysis (ANOVA), followed by Tukey's multiple range HSD test (Honest Significant Difference), in order to compare the averages and to determine the significant differences at a level of $P \leq 0.05$ using statistical software Statgrafic Centurion XVII version.

Results and discussion

The results obtained (Table 1 and 2) show that the coloration in the seeds tissues responds differently to the pre-conditioning treatment, the concentration and exposure time to tetrazolium (TZ). The staining in the *E. barbaricum* seeds after using a pre-conditioning treatment with both sodium hypochlorite (NaOCl) and 10% sucrose obtained the highest viability percentages, when compared with the other pre-treatments, although they are statistically heterogeneous with each other.

However, when the concentration of TZ increased to 1%, the viability percentages tended to be statistically homogeneous (Table 2), using pre-conditioning treatments with sodium hypochlorite (1%) and sucrose (10%). This proves that by increasing the TZ salt concentration, the detection of the seeds viability optimized due to the greater interaction of the solution with the living tissues, which increases the intensity of the coloration (Espitia et al. 2017), taking control group as reference. On the other hand, the 24 hours of exposure time, using immersion in sodium hypochlorite (1%), both for the 0.25% and 1% TZ concentrations gave the most optimal viability results (93%) compared with the germinated seeds percentage (93%). The data are in agreement with Hosomi et al. (2017) where they found good results, when using the 1% tetrazolium solution during 24 hours of exposure.

Table 1. *Epidendrum barbaricum* seeds viability subjected to five pretreatments and evaluated by the tetrazolium test (0.25%) at different exposure times.

Pre-treatments	6h	12h	24h	48h
Control	72a*	71a	73a	75a
Chlorine 1%	82a	91b	93b	95b
Sucrose	80a	88b	91b,c	92b
Alcohol 10%	57b	69a	72a	80a
H ₂ O _d	72a	80a,b	77a,c	79a

*The values of the averages with different letter of each column indicate statistically significant differences, according to the Tukey HSD test ($P \leq 0.05$).

Table 2. *Epidendrum barbaricum* seeds viability subjected to five pretreatments and evaluated by the tetrazolium test (1%) at different exposure times.

Pre-treatments	6h	12h	24h	48h
Control	81a*	87a	84a,b	84a
Chlorine 1%	83a	88a	93b	91a
Sucrose	80a	83a,b	80a,b	85a
Alcohol 10%	57b	72b	75a	80a,b
H ₂ O _d	72a	80a,b	73a	69b

*The values of the averages with different letter of each column indicate statistically significant differences, according to the Tukey HSD test ($P \leq 0.05$).

The seeds viability was determined by the ability to reduce the TZ to formazan, so the presence of the red color indicated that the seed was viable and the absence of this, the embryo's death (Figure 1). The TZ biochemical test has been used in various species of orchids, such as: *Dendrobium bigibbum* var. *Compactum*, *Dendrobium formosum* (Kananont et al., 2010), *Cymbidium pendulum* (Sw.) Roxb (Aggarwal and Nirmala 2012), *Cypripedium lentiginosum* PJCribb and SCChen (Jiang et al., 2017), *Elleanthus arautiacum*, *Epidendrum* sp., *Maxillaria* sp., *Odontoglossum lindenii*, *Prosthechea* sp., *Telipogon dubios*, *Stelis* sp., *Elleanthus* sp., *Epidendrum elongatum*, *Cyrtochilum aemulun* (Salazar et al., 2020b; Salazar and Cancino, 2012; Salazar and Gélvez 2015), *Cattleya mendelii* (Salazar, 2012), *Phalaenopsis* (Carmela's Wild Thing x Taipei Pearl) (Salazar et al., 2013), among others.

Germination percentage

In the in vitro germination test, a 93% of the seeds from *E. barbaricum* germinated at in vitro conditions, breaking the seed coat by the expansion of the embryo (Figure 2). This value correlates directly with the viability percentage obtained by exposing the seeds to a scarification with 1% NaOCl which is statistically homogeneous with the 10% sucrose pretreatment, independent of the concentration (0.25% and 1%) at 24-hour exposure time (Table 1).

When comparing the Viability results from the TZ concentrations applied (0.25% and 1% W/V) demonstrate the pretreatment with NaOCl (1% W/V, 10 min) positively influenced effectively the seeds germination capacity, providing a profitable alternative to evaluate the seeds germinative capacity since, viable results are obtained independent of the concentration, in this way, the concentration to be used could be reduced by 0.75%, using an exposure time of 24 hours. Being these viability results (93%) those of greater correlation with the in vitro germination percentage (93%). The present observation

would imply to improve the application of the laboratories financial resources and likewise a larger number of samples could be evaluated with a lower cost (Carvalho et al., 2017).

Although, orchid seeds present a simple structure, to moist them is complicated, due to the fact that the cell walls of the outer tegument are lignified and covered with a lipid cuticle (Jevšnik and Luthar 2015), the presence of these compounds of hydrophobic nature contribute to the impermeability of the seed. However, this characteristic depends on the seed state of development, since it is at immature state, the testa may not be lignified so it would be more permeable, when compared to a mature seed which has a fully formed testa, some pretreatments made on seeds such as immersion in NaOCl solutions can improve their permeability (Zhang et al., 2013). The NaOCl is usually used to degrade the wood pulp lignin, as it is a strongly oxidizing agent (Jiang et al., 2017), therefore, the importance of this chemical compound relies mainly in the scarification of the seed (Bae et al., 2014) thus improving the effectiveness of the TZ test. It is most likely to degrade some hydrophobic compounds of the testa, such as lignin, thus breaking the obstacle from the seed coat cell walls increasing its hydrophilic character, allowing the entry of TZ salt in a uniform way and generating a stronger stain. Previous treatment with NaOCl also stimulates seed germination by degrading the seed coat and facilitating the absorption of water and oxygen (Vasudevan and Staden, 2010) and accelerating the inhibitors washing, such as endogenous abscisic acid (ABA) from seeds (Jiang et al. al., 2017, Bae et al., 2014). However, chlorine causes a cytotoxic effect by generating chromosomal anomalies (Salazar and Maldonado; 2020; Salazar et al., 2019).

Preconditioning with 10% sucrose improved the coloration proving to be adequate for a better identification of viable seeds. These results are similar to those obtained in *Cattleya* species by Hosomi et al. (2011, 2017). This is due to the

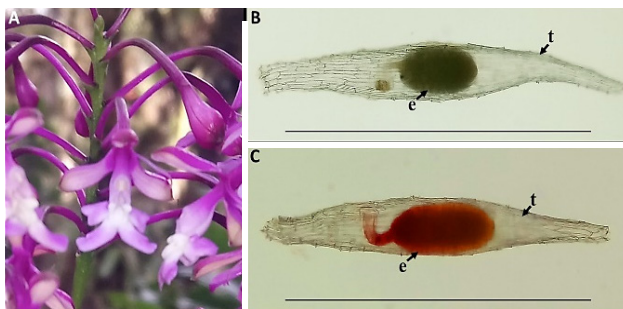


Figure 1. *Epidendrum barbaricum* flower and seeds. (A) *E. barbaricum* flower. (B) *E. barbaricum* not viable seeds. (C) *E. barbaricum* viable seeds. Bar scale = 1mm. t: seed coat; e: embryo.

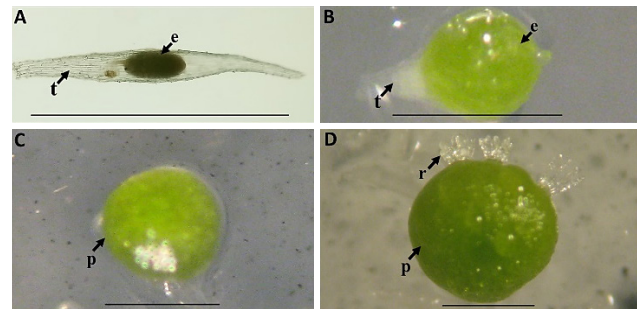


Figure 2. *Epidendrum barbaricum* asymbiotic germination in MS culture medium. (A) No germinated seed (B) Expanded embryo. (C) Protocorms formation. (D) Rhizoids production. (D) Bar scale= 1mm. e: embryo; p: protocorm; r: rhizoid; ra: root; t: testa/seed coat.

fact that the sucrose solution offers a benefit by maintaining a balance between the seeds and their external environment, thus avoiding an imbibitional injury, which could cause damage to the embryo cells when immersed in the TZ solution, also sucrose immersion may be important to activate the embryo's metabolism, mainly the dehydrogenase enzymes (Hosomi et al., 2011), ensuring a sharper coloration and more reliable results.

Hydration facilitates the TZ absorption and provides the enzymatic metabolite's activation (Carvalho et al., 2017). The results obtained with the control group and direct imbibition in water, were statistically homogeneous with each other for the two TZ concentrations evaluated, except for exposure to a concentration of 1% TZ for 48 hours where it was surpassed by the control group, with significant differences (Table 2). One of the reasons is that the water absorption by the seed is limited by the presence and permeability of the seed coat, on the other hand, submerging the seeds directly in water can cause damage by imbibition, thus affecting the effectiveness of the test and influencing the differences comparing with the germination test.

Conclusion

The pre-treatment with 1% sodium hypochlorite for 10 minutes allows to enhance the viability reading using the tetrazolium test in *E. barbaricum* seeds, when using a concentration of 0.25 or 1% during 24 hours of exposure. This preconditioning treatment not only improves embryo staining by generating a scarification of the seed coat, but also decreases the concentration of tetrazolium solution to be used, which translates into a cost reduction at the laboratory level to determine the seeds germination capacity

References

Aggarwal, S; Nirmala, C. 2012. Utilization of coir fibers as an eco-friendly substitute for costly gelling agents for in vitro orchid seed germination. *Scientia Horticulturae* 133:89-92. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.010>

Ramya Al-Turki, T.A; Baskin, C.C. 2017. Determination of seed viability of eight wild Saudi Arabian species by germination and X-ray tests. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24:822-829. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.06.009>

Bae, K.H; Hee, K.O; Kim, S.Y. 2014. Sodium hypochlorite treatment and light-emitting diode (LED) irradiation effect on *in vitro* germination of *Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl. *Journal of Plant Biotechnology* 41:44-49. <http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2014.41.1.44>

Carvalho, I.L; Meneghello, G.E; Madruga, L.T; Costa, C.J; Nogueira, V.S. 2017. Methodological

adjustments to the tetrazolium test in rice seeds. *Journal of Seed Science* 39:41-49. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n1169643>

Chaves, H.K; Mosquera, A; Otero, J. 2015. Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronómica* 64:125-133. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-28122015000200004

Deka, K; Sharma, P.B; Sarma, B; Borthakur, S.K. ; Tanti, B. 2017. Preventing extinction and improving conservation status of *Vanilla borneensis* Rolfe-A rare, endemic and threatened orchid of Assam, India. *Journal for Nature Conservation* 37:39-46. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2017.03.001>

Duarte, R; Mangeón, V; Küppers, G; Rocha, P; Niella, F. 2017. Tamaño y viabilidad de semillas: implicancias en la evolución y conservación de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae). *Caldasia* 39:388-399. <http://dx.doi.org/10.15446/caldasia.v39n2.62184>

Espitia, M; Cardona, C; Araméndiz, T. 2017. Morfología y viabilidad de semillas de *Bombacopsis quinata* y *Anacardium excelsum*. *Cultivos Tropicales* 38:75-83.

Fracchia, S; Aranda, A; Rothen, C; Sede, S. 2016. Associated fungi, symbiotic germination and *in vitro* seedling development of the rare Andean terrestrial orchid *Chloraea riojana*. *Flora* 224:106-111. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362017000400012

Hosomi, S.T; Santos, R.B; Custódio, C.C; Seaton, P; Marks, T Machado-Neto, N. 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology* 39:178-189. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2011.39.1.15>

Hosomi, S; Bonome, T; Custódio, C; Barbosa, N. 2017. Refining the tetrazolium test for evaluation of *Cattleya labiata* and *C. tigrina* seeds viability. *Australian Journal of Crop Science* 11:1320-1326. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.17.11.10.pne606>

Iossi, E; Vitti, F; Torres, B; Marani, R; Daiton, R. 2016. Chemical composition and tetrazolium test of *syagrus romanzoffiana* (cham.) glassman seeds. *Revista Brasileira de Fruticultura* 38: e-550. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452016550>.

Jevšnik, T; Luthar, Z. 2015. Successful disinfection protocol for orchid seeds and influence of gelling agent on germination and growth. *Acta agriculturae Slovenica* 105:95-102. <http://dx.doi.org/10.14720/aas.2015.105.1.10>

Jiang, H; Chen, M.C; Lee, Y.I. 2017. In vitro germination and low-temperature seed storage of *Cypripedium lentiginosum* P.J.Cribb & S.C.Chen, a rare and endangered lady's slipper orchid. *Scientia Horticulturae* 225:471-479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.040>

Kananont, N; Pinchyangkura, R; Chanprame, S; Chadchawan, S; Limpanavech, P. 2010. Chitosan specificity for the *in vitro* seed germination of two *Dendrobium* orchids (Asparagales: Orchidaceae).

- Scientia Horticulturae 124:239-247. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.019>
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:437 - 497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ramya, M; Ryun, H; Su, Y; Eswar, K.R; Hee, P. 2018. Orchid floral volatiles: Biosynthesis genes and transcriptional regulations. *Scientia Horticulturae* 235:62-69. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.049>.
- Salazar, S.A.M. 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica* 61:69-78. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/32463
- Salazar, S; Cancino, G. 2012. Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(1):53-59. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/31703>
- Salazar, S.A.M; Amay, A.Z.N.; Barrientos, F.R. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15:97-105. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41268>
- Salazar, S.A.M; Gélvez, J.D.M. 2015. Determining the viability of orchid seeds using the Tetrazolio and Carmin Índigo tests. *Revista de ciencias* 19:59-69. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-19352015000200004
- Salazar, S; Vega, N. 2017. Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb.f. Orchidaceae. *Acta Agron*, 66(4):544-548. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n4.63597>
- Salazar, S.A.M; Botello, E.A.D. 2018. Viabilidad de semillas de *Glycine max* (L.) utilizando la prueba de tetrazolio. *Revista de investigación Agraria y Ambiental* 9:89- 98. <https://doi.org/10.22490/issn.2145-6453>
- Salazar, S.A.M; Maldonado, H.A.B; Quintero, J.D.C. 2018. Evaluación de la calidad fisiológica de las semillas de *Linum usitatissimum* L. con la prueba de tetrazolio. *Avances en Investigación Agropecuaria* 22(3):25-35. <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2018/sept/3.pdf>
- Salazar, S. A. M; Torres, C. A. L; and Rojas, J. P. S. 2019. Cytotoxic evaluation of sodium hypochlorite, using *Pisum sativum* L as effective bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 173:71-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.027>.
- Salazar, S. Maldonado, H. 2020. Evaluation of the cytotoxic potential of sodium hypochlorite using meristematic root cells of *Lens culinaris* Med. *Science of the Total Environment* 701:134992. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134992>
- Salazar, S; Quintero, Botello, E. 2020a. Optimización de la prueba de tetrazolio para evaluar la vialidad en semillas de *Solanum lycopersicum* L. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 21.
- Salazar, S; Quintero, Rojas, J. 2020b. Optimization of the tetrazolium test in three species of orchids of the Andean forest. *Australian J. Crop Sci.* 14.
- Segovia-Rivas, A; Meave, J., González, E; Pérez-García, E. 2018. Experimental reintroduction and host preference of the microendemic and endangered orchid *Barkeria whartonianiana* in a Mexican Tropical Dry Forest. *Journal for Nature Conservation* 43:156-164. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2018.04.004>
- Schultz, J.S; Jardim, Y; Bento, M.T; Sorgato, J; Rosa, C. 2014. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. *Semina: Ciências Agrárias* 35:2275-2284. redalyc.org/articulo.oa?id=445744144003_5.
- Srivastava, S; Kadooka, C; Uchida, J.Y. 2018. Fusarium species as pathogen on orchids. *Microbiological Research* 207:188-195. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.002>
- Vasudevan, R; Staden, J.V. 2010. In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae* 123: 496-504. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.010>
- Vudala, S.M; Padial, A; Ribas, L. 2019. Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* through transverse and longitudinal thin cell layer culture. *South African Journal of Botany* 121:76-82. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.017>
- Zhang, Y; Lee, Y; Deng, L; Zhao, S. 2013. Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid. *Scientia Horticulturae* 164: 130-136. <https://www.semanticscholar.org/paper/Asymbiotic-germination-of-immature-seeds-and-the-of-Zhang-Lee/1a379c1586d3527daf75152eac6ae374aca13774>
- Zhang, S; Yang, Y; Li, J; Qin, J; Zhang, W; Huang, W; Hu, H. 2018. Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity* 40: 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>

Effect of *Mentha spicata* L. infusión on the productive performance and organoleptic characteristics of Cobb 500 broilers

Efecto de la infusión de *Mentha spicata* L. en el rendimiento y las características organolépticas de canales de pollos de engorde Cobb 500

Angel Roberto Sánchez Quinche^{1*}, Julia Cristina Solórzano Saldarriaga¹, José Nicasio Quevedo Guerrero², José Roberto Paladines Romero¹, Ion Pérez Baena³.

1.School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Universidad Técnica de Machala, Ecuador. 2.School of Agronomical Engineering. College of Agricultural Sciences. Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Research Group on Food Production and Animal Health (GIPASA). 3.Institute of Animal Science and Technology. Universitat Politècnica de Valencia, Spain. *Author for correspondence: arsanchez@utmachala.edu.ec

Rec.: 2019-05-10 Acep.:2019-12-19

Abstract

The objective of this research was evaluate the effect of *Mentha spicata* L. infusion on the productive performance and organoleptic characteristics of Cobb 500 broilers. The management, biosecurity and welfare of birds for open houses systems were followed using a completely random design (CRD). In order to evaluate treatments effects during 35 days, 200 1-day-old mixed chickens were distributed in five treatments, with four réplicas, of 10 birds each in the following groups: T₁ (control), T₂ (*M. spicata* infusion at 10%), T₃ (*M. spicata* infusion at 20%), T₄ (*M. spicata* infusion at 30%) and T₅ (*M. spicata* infusion at 40%). The variables studied were broilers productives performance, carcass weight, abdominal fat and organoleptic characteristics. The data was processed using statistical program Statgraphics Centurión XV.I, performing a multivariate analysis of variance and determining the factors with effect, and ANOVA of productive variables per week; contingency tables were prepared with organoleptic indicators data to determine differences (Chi-square test). Results show no effect on productive parameters up to 30% per liter because a decrease in feed consumption in the slaughter week for T₅ (40% of infusion) which indicate a limit of infusion use; the principal effects on infusion *M. spicata* L was on abdominal fat which was lower thickness in T₄ (30%) and T₅ (40%) maybe due to the presence of flavonoids in the mint plant, which have a positive effect on lipid metabolism, resulting in a lean product. Flavor, tenderness and juiciness showed a favorable acceptance for meat of animals reciving the infusion treatements in relation to the control group due to the tendency of the majority of the Ecuador population to consume products with markables organoleptics caracteristiques coming from animals raised in tradicional form.

Key words: Broilers, abdominal fat, carcass weight and quality, organoleptic characteristics.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la infusión de la menta (*Mentha spicata* L.) en el rendimiento y las características organolépticas de canal de pollos de engorde Cobb 500. Se siguió el manejo, la bioseguridad y el bienestar de las aves para los sistemas de casas abiertas utilizando un diseño completamente al azar (DCA). Para evaluar los efectos de los tratamientos durante 35 días, se distribuyeron 200 pollos mixtos de 1 día, en cinco tratamientos, con cuatro réplicas, de 10 aves cada uno en los siguientes grupos: T1 (control), T2 (infusión de *M. spicata* al 10 %), T3 (infusión de *M. spicata* al 20%), T4 (infusión de *M. spicata* al 30%) y T5 (infusión de *M. spicata* al 40%). Las variables estudiadas fueron: rendimiento de pollos de engorde, el peso de la canal y las características organolépticas. Los datos se procesaron utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.I, realizando un análisis multivariado de la varianza y determinando los factores con efecto, y un Anova por semana para las variables productivas; se elaboraron tablas de contingencia con los datos de los indicadores organolépticos para determinar las diferencias (Prueba de Chi-cuadrado). Los resultados no mostraron efecto sobre los parámetros productivos hasta la dosis de infusión de 30% por litro debido a una disminución en el consumo de alimento en la semana de sacrificio para T₅ (40% de la infusión), lo que indica un límite en el uso de infusión. Los principales efectos de la infusión de *M. spicata* L. ocurrieron en la grasa abdominal, que presentó

menor espesor en T₄ (30%) y T₅ (40%), posiblemente por la presencia de flavonoides en la planta de menta, que tienen un efecto positivo en el metabolismo de los lípidos, resultando un producto magro. El sabor, la terneza y la jugosidad mostraron una aceptación favorable para la carne de animales que recibieron los tratamientos de infusión en relación con el grupo control, de acuerdo con la preferencia de la mayoría de la población de Ecuador por productos con características organolépticas procedentes de animales criados en forma tradicional.

Palabras clave: Pollos de engorde, grasa abdominal, peso y calidad de la canal, características organolépticas.

Introduction

The need for the consumption of animal protein is constantly increasing, mainly due to the demographic growth of the population. This increase in demand means that the livestock production sector must continuously make improvement actions to increase industrial yields. In addition to this situation, the trend of today's society that demands safe meat, from farms that comply with quality and biosecurity regulations and specially apply and respect animal welfare, taking an increasingly growing interest in ecological management of the animals.

It is notorious the increasing demand for poultry products, as an alternative to red meats, which can promote diseases, such as diverticulosis (Böhm, 2015), diabetes (Pan et al., 2013) and the increased risk of suffering cancer (Wie et al., 2014). Under these circumstances of market demand, a lot of work has been done on genetic selection of birds (Sheng et al., 2015; Stratmann et al., 2016), especially in broiler (González-Cerón et al., 2015; Reyer et al., 2015), with the aim of obtaining a meat product in the shortest possible time and the reduction of the resources used in their production.

Increasing the production of poultry meat for the current demand, is no longer the only goal that the industry proposes, since it must consider demands of the market. This raises a reorganization of the production matrix, given that production systems must consider ecological aspects (Onrust et al., 2015; Ricke, 2015), and this is why the broilers industry has to evolve according to the market trend, becoming a great challenge for bird producers. It is meritorious all the research that has currently done in the area of new alternatives for avian management; and specially to replace artificial chemicals; such as antibiotics (Díaz-Sánchez et al., 2015) that can cause problems in the consumer's organism.

The disadvantage of finding traces of residues of different chemicals used in normal management for the production of white meat consumption is not the result of the absence of regulations that govern a country or international, because by law, these are worldwide. Rather, it arises when drug withdrawal times is not correctly established at the farm level (Beyene, 2016; Muhammad Danish Mund et al., 2017).

Although many replacement alternatives are currently used, combinations with artificial chemical substances also stand out (Samant et al., 2015), to look for possible effects with their administration. Additionally, it has been increased consumption of traditional foods, and it seems a return to flavors and colors reminiscent of field products. This is why research with medicinal plants attracts a lot of attention (Babak and Nahashon, 2014; Chiriboga Chuchuca et al., 2016; Sánchez et al., 2016), given the advantages they are showing and especially because it is a resource from which numerous active principles are being obtained due to the great variety of species that exist in the world.

In the present research was used *Mentha spicata* L. a Lamiaceae family, also known as mint, a perennial creeping plant with a fresh and intense aroma. This plant is traditionally used in Ecuador and other Latin American countries as a medicinal herb, in infusion, for the treatment of stomach disorders, diarrhea, coughing, wound healing due to its extraordinary source of aromatic compounds and essential oils containing biologically active constituents that possess antimicrobial action and insect repellent (Quevedo Guerrero, 2017). The general objective was evaluate the effect of the infusion of *M. spicata* L. on the performance and organoleptic characteristics of Cobb 500 broilers.

Materials and methods

The research was carried out at the Granja Santa Inés of the Agricultural Faculty of Sciences of the Universidad Técnica de Machala ubicate in Machala – Pasaje way, Machala Canton, Province El Oro, coastal region of Ecuador, in the geographic coordinates 79° 54' 05" longitude northeast and 3° 17' 16" south latitude. The environment temperature fluctuates from 22 to 35°C, in an altitude of 5 meters. Were adopted all possible management and biosecurity norms, for open cages in order to maintain total welfare in the birds. The disinfection of the vessel with formaldehyde and application of quicklime to the floor before the chickens enter. Wood chip was use as a litter, basic vaccination schedule was aplallied (New Castle 'La Sota' and Gumboro D78) and no antibiotics was administere. Two hundred 1-day-old mixed chickens of the COBB 500 line

were distributed in five treatments, each with four replicates of 10 birds. Those were randomly assigned (40 birds per treatment) as following: T1 control, T2 (*M. spicata* L. infusion at 10%), T3 (*M. spicata* L. infusion at 20%), T4 (*M. spicata* L. infusion at 30%) and T5 (*M. spicata* L. infusion at 40%). The infusion was offered as drinking water. Animals were fed with a commercial feed Proaves (Pronaca – Ecuador) ad libitum according to the age. Treatments were evaluated for 35 days; a 100-watt yellow bulb provided the heat source for each replica (10 chickens). For the preparation of the infusion of mind was applied the Chiriboga Chuchuca et al. (2016) methodology.

The variables measured were related with productive parameters: feed intake, water consumption, feed conversion ratio, mortality, live weight evolution, weight before slaughter, carcass weight, blood weight, weight feathers, weight viscera except lungs and kidneys, weight of head-neck and paws, average thickness of abdominal fat and organoleptic characteristics, flavor, tenderness and juiciness of breast meat. To measure the weight of chickens and feed was used an electronic scale CAMRY model EK9332-F302 with a maximum capacity of 5 Kg and an error margin of ± 1 g. For water consumption, was used a container of volume with minimum measurements of 10 ml and for fat measuring was employed a digital calibrator.

Feed intake was weekly recorded (10 chickens per replica) generating 100 data (5T x 4R x 5w), applying the equation 1:

$$\text{Feed intake(g)} = \text{offered feed} - \text{leftover feed} \quad \text{Eq. 1}$$

The water consumption was weekly measured (10 chickens per replica) registering 100 data (5T x 4R x 5w), with the equation 2:

$$\text{Water consumption(ml)} = \text{offered water} - \text{leftover water} \quad \text{Eq. 2}$$

The feed conversion ratio was weekly measured (10 chickens per replica) recording 100 data (5T x 4R x 5w), with the equation 3:

$$\text{Feed Conversion Ratio} = \frac{\text{Total feed consumed (g)}}{(\text{Final live weight (g)} - \text{Initial live weight (g)})} \quad \text{Eq. 3}$$

The mortality of the birds, as a percentage, was obtained by dividing the dead birds for which they started the trial, with the equation 4:

$$\text{Mortality (\%)} = \frac{\text{Number of dead chickens}}{\text{Number of chickens started}} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

the live weight of the broilers was determined weekly until day 35, registering individually and expressed in grams, with this 1000 data were obtained (5T x 4R x 10c x 5w) without discounting the mortality registered in the investigation.

To determine the yield of the carcass in grams, at day 35 of age, after fasting for 12 hours, broilers were slaughtered by cervical dislocation with suspension of the bird (hanging) for cutting the left jugular and bleeding for two minutes, and then underwent a blanching process at 60 °C. for approximately 30 seconds. Two birds per replicate, taken at random for 40 chickens (5T x 4R x 2c), to obtain weight data post-bleeding, post plucking, post-evisceration. For measuring thickness of abdominal fat, a digital caliper 0-150 mm (TACTIX Mark) was applied directly on it with moderate pressure. Weight data was obtained from head-neck-legs, wings, thighs, drumstick, shoulder, rump and breast (fresh, frozen, boneless and cooked). In addition, were recorded water losses by cooking the meat, taking the frozen breasts and left them at room temperature for two hours, then proceeded to make cuts of 1 cm of thick. Breasts were placed in baking shells identified individually, and then placed in a pot containing boiling water for 10 minutes. They were removed from the fire and the subsequent processes were continued, obtaining 600 data (5T x 4R x 2c x 15v).

For organoleptic characteristics, 105 personal surveys were carried out with standard discrimination questions applied to the consumer tasting methodology, giving a total of 2100 responses (5T x 105p x 4C), they were evaluated qualitatively in meat samples from the 5 treatments: flavor, tenderness, juiciness and smell, for all the pleasant and unpleasant criterion was applied.

Experimental design. For the research, was used a completely randomized design (CRD), with five treatments, each with 4 replicas of 10 chickens, for 40 birds per treatment. The treatments design was as follows: T1 = Balanced feed only, T2 = Balanced feed + 2 ml of *M. spicata* L. infusion at 10% was administered per liter of drinking water, T3 = Balanced feed + 2 ml of *M. spicata* L. infusion at 20% was administered per liter of drinking water, T4 = Balanced feed + 2 ml of *M. spicata* L. infusion at 30% was administered per liter of drinking water, and T5 = Balanced feed + 2 ml of *M. spicata* L. infusion at 40% was administered per liter of drinking water.

Statistical analysis. The statistical analyzes were carried out according to Blasco (2010), a multivariate variance analysis was used for the variables under study and to determine which factors have a statistical effect on the variables. For live weight, feed intake, water consumption and feed conversion ratio was used an analysis of parametric variance (Anova one-way) per week, after checking the assumptions of normality and homocedasticity. To establish statistical differences between treatments Tukey's

honest significant difference procedure (HSD), at a confidence level of 95.0% was use. For the analysis of criterio consumer, contingency tables were elaborate and chi-square test was use to establish the differences between treatments. All the analysis was carrie out using the statistical program Statgraphics Centurión XV.I.®.

Results and Discussion

Feed intake, water consumption, and feed conversión ratio

When performing multivariate analysis of variance in feed intake, it showed a significant diference in the week*treatment interaction. An additional Anova analysis was performed per week. Table 1 shows the averages of feed intake, with their intervals of confidence. From the first week, were detected statistical differences, being the T5 the one that maintained it until the end of the experiment (T5: 32525.8 ± 645.8^b vs T1: 34248.5 ± 645.8^a). In this treatment, lower intakes were detected, and this agrees with the results found by Darabighane et al. (2017). In that experiment using male broiler Ross 308, they evaluated a fresh leaves of *Mentha piperita* and the gel contained in the leaves of *Aloe barbadensis*, added in the feed, to compare it with an antibiotic, used as a growth promoter.

The water consumption did not show significance in their interaction, however, when was analyzed the data per week, it showed that birds in T4 consumed less water (T1: 14578.3 ± 792.7^a , T2: 14001.5 ± 792.7^{ab} , T3: 14064.3 ± 792.7^{ab} , T4: 12838.5 ± 792.7^b , T5: 13289.3 ± 792.7^{ab}) than T1 (Table 2). The feed conversion ratio did not show a significant statistical difference in their interaction. But when week effect was analyzed, statistical differences were observed in T1 and T3, but at the end of the experiment, no differences were detected (Table 3). These results agree with those found by Ameri et al. (2016), who administered dried ground leaves of *Mentha piperita* in the feed of broilers Ross 308 to evaluate performance, body temperature and the characteristics of the carcass.

Mortality

For all treatments the mortality observed in this researh was as expected for tropical zones (less than 5%), therefore this variable was not influenced by treatments. This result is similar to that reported by Chiriboga Chuchuca et al. (2016) who spreng an infusion of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) and vinegar in chickens *Gallus gallus domesticus* in the drinking wáter, without no reporting an effect in this variable.

Live weight

When was analyzed the interaction of the live weight per week there were no significant statistical differences. After, analyzed the data per week, it was observed that there is no significance throughout the duration of the experiment (Table 4), agreeing with those results of Ameri et al. (2016), Chiriboga Chuchuca et al. (2016), Sánchez et al. (2016), the latter administered to Cobb 500 chickens, 3 ml of 10% infusions of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Plectranthus amboinicus* (Lour.), and *Tilia cordata* (Mill.) per liter of drinking water and they did not report differences in the weights of the birds. However, Darabighane et al. (2017) reported differences at the beginning, in the growth and in the total weight of the birds.

Carcass yield

Table 5 shows the data obtained measuring the weighing of broilers before slaughter, and after subtracting blood, feathers and the head-neck-paws weight. No statistical differences were detected; but, the visceral weight (T1: 305.8 ± 37.8^a , T2: 239.5 ± 37.8^{ab} , T3: 212.3 ± 37.8^b , T4: 190.3 ± 37.8^b , T5: 247.3 ± 37.8^{ab}) and abdominal fat thickness were different (T1: 4.95 ± 0.79^a , T2: 4.17 ± 0.79^{ab} , T3: 4.49 ± 0.79^{ab} , T4: 2.90 ± 0.79^c , T5: 3.31 ± 0.79^{bc}). Regarding the weight of wings, thighs, counter-thighs, shoulder, rump, breast, frozen breast, water loss by defrosting breast, boneless breast and cooked breast showed no significance. Table 6 show the data obtained for chicken breasts, only detecting significant statistical difference in the breast bone (T1: 51.25 ± 3.43^a , T2: 50.88 ± 3.43^a , T3: 45.75 ± 3.43^{ab} , T4: 47.25 ± 3.43^{ab} , T5: 43.38 ± 3.43^b) and the water losses of the breasts subjected to cooking (T1: 38.88 ± 4.41^{ab} , T2: 41.38 ± 4.41^a , T3: 33.38 ± 4.41^{ab} , T4: 30.25 ± 4.41^b , T5: 31.38 ± 4.41^b). The variables that show statistical differences tend to decrease, since they are the groups that received the infusion. This differs from that mentioned by Khursheed et al. (2017), who did not find significant statistical differences in data obtained from the commercial broiler chicken channel in an experiment where fresh mint leaves were administere with and without enzymatic supplementation to evaluate blood biochemistry, carcass characteristics and sensory attributes. It also differs from that reported by Ameri et al. (2016), regarding to the characteristics of the carcass.

Organoleptic characteristics

Regarding the taste of meat, not significant statistical differences between treatments was report. The flavor (Figure 1) of all the meats were agreeable for the majority of the respondents (T 1: 85, T 2: 93, T 3: 100, T 4: 94 and T 5: 103),

when comparing with the control, all treatments showed an arithmetic difference, but only were detected statistical differences between T3 and T5. The results of tenderness by criterion of meat mastication (Figure 2) show that the majority of respondents find it pleasant for all treatment with statistical difference to T4. The juiciness (Figure 3) shows arithmetical differences in all treatments

Table 1. Averages of weekly acumulative feed intake (g).

Treat.	Week				
	1	2	3	4	5
1	1692.5 ± 49.9 ^a	5221.3 ± 48.5 ^a	11940.3 ± 143.4 ^a	22061.3 ± 643.2 ^a	34248.5 ± 645.8 ^a
2	1590.5 ± 49.9 ^a	5123.5 ± 48.5 ^{bc}	11751.3 ± 143.4 ^a	21441.5 ± 643.2 ^{ab}	33901.0 ± 645.8 ^a
3	1565.0 ± 49.9 ^b	5155.3 ± 48.5 ^{ab}	11720.8 ± 143.4 ^a	21369.3 ± 643.2 ^{ab}	33824.3 ± 645.8 ^a
4	1582.0 ± 49.9 ^b	5114.8 ± 48.5 ^{bc}	11763.8 ± 143.4 ^a	21722.3 ± 643.2 ^a	34187.8 ± 645.8 ^a
5	1530.0 ± 49.9 ^b	5056.5 ± 48.5 ^c	10374.0 ± 143.4 ^b	20197.5 ± 643.2 ^b	32525.8 ± 645.8 ^b

Difference superindice, statistical differences (P < 0.05).

Table 3. Averages of the weekly feed conversion ratio.

Treat.	week				
	1	2	3	4	5
1	0.90 ± 0.04 ^a	0.94 ± 0.03 ^a	1.15 ± 0.06 ^{ab}	1.42 ± 0.08 ^a	1.54 ± 0.08 ^a
2	0.83 ± 0.04 ^{ab}	0.92 ± 0.03 ^a	1.22 ± 0.06 ^b	1.34 ± 0.08 ^a	1.55 ± 0.08 ^a
3	0.82 ± 0.04 ^{ab}	0.94 ± 0.03 ^a	1.19 ± 0.06 ^b	1.34 ± 0.08 ^a	1.57 ± 0.08 ^a
4	0.84 ± 0.04 ^{ab}	0.95 ± 0.03 ^a	1.24 ± 0.06 ^b	1.40 ± 0.08 ^a	1.61 ± 0.08 ^a
5	0.81 ± 0.04 ^b	0.93 ± 0.03 ^a	1.05 ± 0.06 ^a	1.29 ± 0.08 ^a	1.48 ± 0.08 ^a

Difference superindice, statistical differences (P < 0.05).

Table 5. Data obtained with the slaughter of the birds on day 35.

Treat.	W. Slaugh. (g)	Blood (g)	Feath-ers (g)	Viscera (g)	Heat-neck-paws (g)	Abd.Fat (mm)
1	2339.1 ± 187.7 ^a	86.4 ± 22.4 ^a	99.6 ± 39.1 ^a	305.8 ± 37.8 ^a	179.6 ± 28.2 ^a	4.95 ± 0.79 ^a
2	2429.5 ± 187.7 ^a	100.3 ± 22.4 ^a	102.8 ± 39.1 ^a	239.5 ± 37.8 ^{ab}	187.4 ± 28.2 ^a	4.17 ± 0.79 ^{ab}
3	2204.5 ± 187.7 ^a	89.1 ± 22.4 ^a	91.3 ± 39.1 ^a	212.3 ± 37.8 ^b	193.4 ± 28.2 ^a	4.49 ± 0.79 ^{ab}
4	2166.5 ± 187.7 ^a	68.6 ± 22.4 ^a	108.5 ± 39.1 ^a	190.3 ± 37.8 ^b	214.3 ± 28.2 ^a	2.90 ± 0.79 ^c
5	2213.0 ± 187.7 ^a	84.3 ± 22.4 ^a	89.4 ± 39.1 ^a	247.3 ± 37.8 ^{ab}	210.6 ± 28.2 ^a	3.31 ± 0.79 ^{bc}

Difference superindice, statistical differences (P < 0.05).

being pleasant for the majority of respondents, but statistically, T3, T4 and T5 differ from the control. These results differ from those reported by Khursheed et al. (2017), who used a panel of experts, not find significant statistical differences from sensory analysis of meat. Meat colour was not evaluate.

Table 2. Average accumulated weekly water (ml) consumption.

Treat.	week				
	1	2	3	4	5
1	4722.0 ± 348.3 ^a	14578.3 ± 792.7 ^a	30169.3 ± 1340.5 ^a	55508.3 ± 2584.4 ^a	94309.5 ± 3455.8 ^a
2	4795.0 ± 348.3 ^a	14001.5 ± 792.7 ^{ab}	30280.5 ± 1340.5 ^a	53692.0 ± 2584.4 ^a	91544.0 ± 3455.8 ^a
3	4740.0 ± 348.3 ^a	14064.3 ± 792.7 ^{ab}	30113.3 ± 1340.5 ^a	54940.5 ± 2584.4 ^a	93045.8 ± 3455.8 ^a
4	4393.5 ± 348.3 ^a	12838.5 ± 792.7 ^b	27864.0 ± 1340.5 ^a	51029.3 ± 2584.4 ^a	88902.8 ± 3455.8 ^a
5	4604.5 ± 348.3 ^a	13289.3 ± 792.7 ^{ab}	27964.3 ± 1340.5 ^a	52758.5 ± 2584.4 ^a	91613.5 ± 3455.8 ^a

Difference superindice, statistical differences (P < 0.05).

Table 4. Averages of the weekly live weights (g) of birds.

Treat.	Week				
	1	2	3	4	5
1	187.6 ± 4.9 ^a	494.3 ± 13.2 ^a	997.2 ± 30.1 ^a	1482.1 ± 42.8 ^a	2128.4 ± 71.6 ^a
2	179.8 ± 5.0 ^a	483.8 ± 13.9 ^a	993.9 ± 31.8 ^a	1506.3 ± 45.1 ^a	2173.5 ± 75.4 ^a
3	183.1 ± 4.9 ^a	480.1 ± 13.2 ^a	998.7 ± 30.1 ^a	1477.6 ± 42.8 ^a	2126.9 ± 71.6 ^a
4	184.1 ± 5.0 ^a	486.1 ± 13.5 ^a	1007.5 ± 31.3 ^a	1533.9 ± 45.1 ^a	2144.1 ± 75.5 ^a
5	180.5 ± 4.9 ^a	472.6 ± 13.2 ^a	996.1 ± 30.1 ^a	1497.2 ± 42.8 ^a	2149.3 ± 71.6 ^a

Difference superindice, statistical differences (P < 0.05).

Table 6. Averages obtained from the chicken breasts at day 35.

Treat.	W. Breasts (g)	Los.Bre. Thaw. (g)	Bone Tissue (g)	Wat. Loss Cook (%)
1	595.4 ± 40.8 ^{ab}	6.63 ± 1.58 ^a	51.25 ± 3.43 ^a	38.88 ± 4.41 ^{ab}
2	669.1 ± 40.8 ^b	6.50 ± 1.58 ^a	50.88 ± 3.43 ^a	41.38 ± 4.41 ^a
3	562.5 ± 40.8 ^a	7.63 ± 1.58 ^a	45.75 ± 3.43 ^{ab}	33.38 ± 4.41 ^{ab}
4	550.9 ± 40.8 ^a	7.75 ± 1.58 ^a	47.25 ± 3.43 ^{ab}	30.25 ± 4.41 ^b
5	558.5 ± 40.8 ^a	7.13 ± 1.58 ^a	43.38 ± 3.43 ^b	31.38 ± 4.41 ^b

Difference superindice, statistical differences (P < 0.05).

FLAVOR

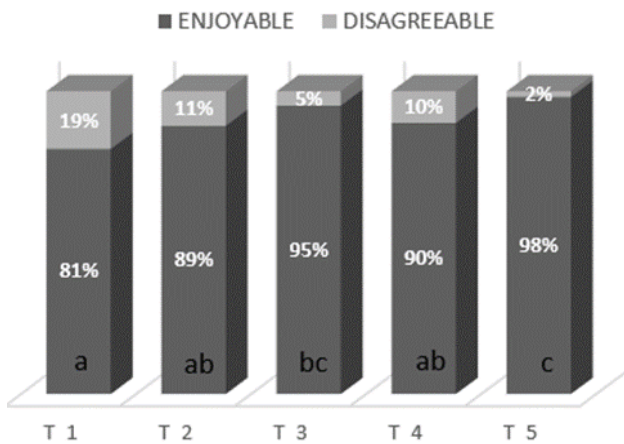


Figure 1. Flavor comparative results.

TENDERNESS

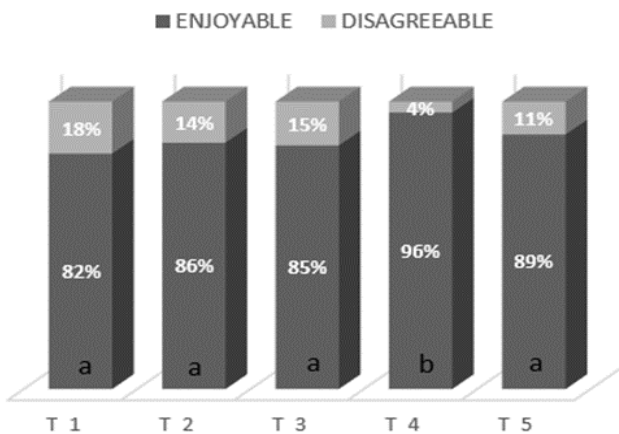


Figure 2. Tenderness comparative results (%).

JUICINESS

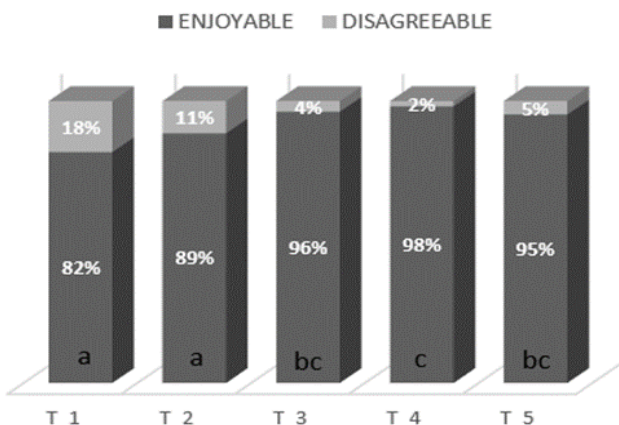


Figure 3. Juiciness comparative results (%).

Conclusions

The administration of 2 ml of infusion of *M. spicata* L. in drinking water showed no effect on the productive parameters up to 30% per liter because a decrease in feed consumption in the slaughter week for T₅ (40% of infusion) was observed indicate a limit of infusion use. The principal effects on infusion *M. spicata* L was on abdominal fat which was lower thickness in T₄ (30%) and T₅ (40%) maybe due to the presence of flavonoids in the mint plant, which have a positive effect on lipid metabolism, resulting in a lean product. Flavor, tenderness and juiciness showed a favorable acceptance for meat of animals receiving the infusion treatments in relation to the control group due to the tendency of the majority of the Ecuador population to consume products with markables organoleptics characteristics coming from animals raised.

Acknowledgments

To the Animal Scientist Doctor Dervin Bartolo Dean Gutiérrez, PHD and Veterinary Medicine Doctor Carlos Armando Alvarez Díaz for his collaboration in writing and translation into the English language of this work.

References

- Ameri, S; Samadi, F; Dastar, B; and Zarehdaran, S. 2016. Efficiency of Peppermint (*Mentha piperita*) Powder on performance, body temperature and carcass characteristics of broiler chickens in heat stress condition. Iranian Journal of Applied Animal Science 6(4). Retrieved April 24, 2018, from: http://ijas.iaurasht.ac.ir/article_526645_4686eef9f2e841e4d270e5971a70b924.pdf
- Babak, D. and Nahashon, S. 2014. A Review on Effects of Aloe Vera as a Feed Additive in Broiler Chicken Diets. Annals of Animal Science 14(3):491-500. Retrieved 16 Apr. 2018, from DOI:10.2478/aoas-2014-0026
- Beyene, T. 2016. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. J. Vet. Sci. Technol. 7(1):285. Retrieved April 15, 2018, from: <https://pdfs.semanticscholar.org/a32a/7a542168428bc0e0f89aa680578269aeda5f.pdf>
- Blasco, A. 2010. Análisis de Datos Experimentales para Proyectos Fin de Carrera. Departamento de Ciencia Animal. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Valencia. Ref.: 2010.288. Editorial de la UPV.
- Böhm, S. 2015. Risk Factors for Diverticulosis, Diverticulitis, Diverticular Perforation, and Bleeding: A Plea for More Subtle History Taking.

- Viszeralmedizin 31:84-94. Retrieved April 15, 2018, from: <https://doi.org/10.1159/000381867>
- Chiriboga Chuchuca, C.; Sánchez Quinche, A.; Vargas González, O.; Hurtado Flores, L. and Quevedo Guerrero, J. 2016. Uso de Infusión de oregano Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng y del vinagre en la crianza de pollos "Acriollados" (*Gallus gallus domesticus*) mejorados. Acta Agronómica 65(3):298 - 303. Retrieved April 15, 2018, from: DOI: <https://doi.org/10.15446/acag.v65n3.46222>
- Darabighane, B.; Gheshlagh, F.; Navidshad, B.; Mahdavi, A.; Zarei, A. and Nahashon, S. 2017. Effects of Peppermint (*Mentha piperita*) and Aloe vera (*Aloe barbadensis*) on Ileum Microflora Population and Growth Performance of Broiler Chickens in Comparison with Antibiotic Growth Promoter. Iranian Journal of Applied Animal Science, 7(1). Retrieved April 24, 2018, from: http://ijas.iaurasht.ac.ir/article_528873_487e4981f88b596a60692e1053775dc7.pdf
- Diaz-Sanchez, S.; D'Souza, D.; Biswas, D.; Hanning, I. 2015. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production, Poultry Science 94(6):1419-1430. Retrieved April 15, 2018, from: <https://doi.org/10.3382/ps/pev014>
- González-Cerón, F.; Rekaya, R.; Aggrey, S. 2015. Genetic analysis of bone quality traits and growth in a random mating broiler population, Poultry Science 94(5):883-889. Retrieved April 15, 2018, from: <https://doi.org/10.3382/ps/pev056>
- Khursheed, A.; Banday, M. T.; Khan, A. A.; Adil, S.; Ganai, A. M.; Sheikh, I. U. and Sofi, A. H. 2017. Effect of mint leaves with or without enzyme supplementation on blood biochemistry, carcass characteristics and sensory attributes of broiler chicken. Adv. Anim. Vet. Sci. 5(11):449-455. Retrieved April 25, 2018, from: http://nexusacademicpublishers.com/uploads/files/AAVS_5_11_449-455.pdf
- Muhammad Danish Mund; Umair Hassan Khan; Uruj Tahir; Bahar-EMustafa and Asad Fayyaz. 2017. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review, International Journal of Food Properties 20(7):1433-1446. Retrieved April 15, 2018, from: DOI: 10.1080/10942912.2016.1212874
- Onrust, L.; Ducatelle, R.; Van Driessche, K.; De Maesschalck, C.; Vermeulen, K.; Haesebrouck, F.; Eeckhaut, V. and Van Immerseel, F. 2015. Steering Endogenous Butyrate Production in the Intestinal Tract of Broilers as a Tool to Improve Gut Health. Front. Vet. Sci. Vol. 2, article 75. Retrieved April 15, 2018, from: <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00075>
- Pan, A.; Sun, Q.; Bernstein, A.; Manson, J.; Willett, W.; Hu, F. 2013. Changes in Red Meat Consumption and Subsequent Risk of Type 2 Diabetes Mellitus Three Cohorts of US Men and Women. JAMA Intern Med. 173(14):1328-1335. Retrieved April 15, 2018, from: https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/1697785?utm_source=feedly
- Reyer, H.; Hawken, R.; Murani, E.; Ponsuksili, S. and Wimmers, K. 2015. The genetics of feed conversion efficiency traits in a commercial broiler line. Scientific Reports. volume 5, Article number: 16387. Retrieved April 15, 2018, from: DOI:10.1038/srep16387
- Ricke, S. 2015. Potential of fructooligosaccharide prebiotics in alternative and nonconventional poultry production systems, Poultry Science Volume 94(6):1411-1418. Retrieved April 15, 2018, from: <https://doi.org/10.3382/ps/pev049>
- Samant, S.; Crandall, P.; O'Bryan, C.; Lingbeck, J.; Martin, E.; Seo, H. 2015. Sensory impact of chemical and natural antimicrobials on poultry products: a review, Poultry Science 94(7):1699-1710. Retrieved April 15, 2018, from: <https://doi.org/10.3382/ps/pev134>
- Sánchez, A.; Ávila, S.; Hurtado, L.; Aguilar, L.; Vargas, O.; Zapata, M. 2016. Effect of *Cymbopogon Citratus* (DC.) Stapf; *Plectra Thus Amboinicus* (Lour.), *Tilia Cordata* (Mill.), *Lippia Alba* (Mill.) and *Ocimum Bacilicum* (L.), To Control *Escherichia coli* in Broiler Chickens. American International Journal of Contemporary Research 6(5). Retrieved April 15, 2018, from: <http://www.aijcrnet.com/journal/index/1071>
- Sheng, Z.; Pettersson, M.; Honaker, C.; Siegel, P. and Carlborg, Ö. 2015. Standing genetic variation as a major contributor to adaptation in the Virginia chicken lines selection experiment. Genome Biology 16:219. Retrieved April 15, 2018, from: <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0785-z>
- Stratmann, A.; Fröhlich, E.; Gebhardt-Henrich, S.; Harlander-Matauschek, A.; Würbel, H.; Toscano, M. 2016. Genetic selection to increase bone strength affects prevalence of keel bone damage and egg parameters in commercially housed laying hens, Poultry Science 95(5):975-984. Retrieved April 15, 2018, from: <https://doi.org/10.3382/ps/pev026>
- Wie, G.; Cho, Y.; Kang, H.; Ryu, K.; Yoo, M.; Kim, Y.; ... Joung, H. 2014. Red meat consumption is associated with an increased overall cancer risk: A prospective cohort study in Korea. British Journal of Nutrition 112(2):238-247. Retrieved April 15, 2018, from: DOI: 10.1017/S0007114514000683.

Detección molecular de begomovirus en arvenses asociadas al cultivo de tomate en Panamá

Molecular detection of begomovirus in weeds associated with tomato crops in Panama

Yatzari L. Ortiz Sánchez¹, Orlando O. Osorio Burgos², Maira E. Díaz Vergara^{3*}

1.Universidad de Panamá, Panamá. 2.Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, El Ejido, Los Santos, República de Panamá. 3. Instituto de Investigaciones Científicas Aplicadas y Servicios de Alta Tecnología. Empresas Melo, S.A. Panamá.

*Autor para correspondencia: mairadiaz@grupomelo.com

Rec.: 2018-02-18 Acep.:2020-01-16

Abstract

Los Santos district is the main producer of tomato in Panama and has been reported in recent years up to 100% infestation with begomovirus (Geminiviridae). The objective of this study was to identify alternate hosts of begomovirus in weeds associated with tomato crops, throughout the year. During 2016-2017 season, 110 samples of symptomatic and asymptomatic weeds were collected into tomato crops from 10 villages sited in the district of Los Santos. Begomovirus detection was performed by polymerase chain reaction (PCR) technique using the degenerate primers AVCORE 494 and ACCORE 1048. Of the total collected, thirty-seven samples were positive belonging to 10 species and six families. Species with the highest prevalence of infection, were: *Physalis angulata*, *Mimosa* sp. and *Amaranthus dubius* (100%), *Calopogonium mucunoides* (78%), *Rhynchosia minima* (67%), *Cleome viscosa* (60%), *Amaranthus spinosus* (50%), *Hybanthus attenuatus* (50%), *Malvastrum americanum* (25%) and *Malachra alceifolia* (17%), listed in descending order. To our knowledge, this is the first report of weeds *A. dubius*, *A. spinosus*, *C. mucunoides*, *C. viscosa*, *H. attenuatus*, *M. alceifolia*, *M. americanum* and *P. angulata* as host of begomovirus associated with tomato crops in Panama. These results indicate that the predominant weeds in the tomato crops of Los Santos district are reservoir of begomovirus throughout the year.

Key words: Alternative host, *Bemisia tabaci*, Geminivirus, *Solanum lycopersicum*

Resumen

El distrito de Los Santos es el mayor productor de tomate industrial de Panamá y en los últimos años se ha registrado hasta 100% de infección con begomovirus (Geminiviridae) en los campos de cultivo. El objetivo de este trabajo fue identificar los hospederos alternativos de begomovirus durante la época de cultivo y de barbecho. En la temporada 2016-17 se recolectaron 110 muestras de arvenses sintomáticas y asintomáticas en 10 fincas ubicadas en el distrito de Los Santos, provincia de Los Santos, República de Panamá. La detección de begomovirus se hizo por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores degenerados AVCORE 494 y ACCORE 1048. Del total recolectado, 37 arvenses resultaron positivas pertenecientes a 10 especies y 6 familias. Las especies, en orden descendente, de prevalencia de la infección fueron: *Physalis angulata*, *Mimosa* sp. y *Amaranthus dubius* (100%), *Calopogonium mucunoides* (78%), *Rhynchosia minima* (67%), *Cleome viscosa* (60%), *Amaranthus spinosus* (50%), *Hybanthus attenuatus* (50%), *Malvastrum americanum* (25%) y *Malachra alceifolia* (17%). Hasta la fecha del estudio, éste era el primer registro para Panamá de las arvenses *A. dubius*, *A. spinosus*, *C. mucunoides*, *C. viscosa*, *H. attenuatus*, *M. alceifolia*, *M. americanum* y *P. angulata* como hospederas de begomovirus asociadas al cultivo de tomate industrial en Panamá. Estos resultados nos indican que las arvenses asociadas al cultivo de tomate en el distrito de Los Santos son reservorios de begomovirus durante todo el año.

Palabras clave: hospedero alternativo, *Bemisia tabaci*, Geminivirus, *Solanum lycopersicum*.

Introducción

Los virus del género *Begomovirus* (familia Geminiviridae) tienen el genoma de ADN circular de cadena sencilla y son transmitidos por el complejo críptico de especies de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) a plantas dicotiledóneas (Stanley et al., 2005; Brown et al., 2015).

Las arvenses asociadas a los cultivos se consideran el sitio ideal para que los begomovirus puedan sobrevivir, conservar su estructura genética, participar en procesos de intercambio genético y la aparición de nuevas especies virales (Padidam, Sawyer y Fauquet, 1999; Ramos et al., 2003; Jovel et al., 2004; García-Andrés, Monci, Navas-Castillo y Moriones, 2006). Diversas arvenses son conocidas como hospederas de begomovirus en las regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial y han sido estudiadas en América Central y el Caribe (Brown, Lastra y Bird, 1991; Roye, Mclaughlin, Nakhla, y Maxwell, 1997; Umaharan, Padidam, Phelps, Beachy, y Fauquet, 1998; Solórzano-Morales et al., 2017).

En 1983, en la región Azuero de Panamá, se observaron las primeras plantas infestadas con *B. tabaci* que presentaban síntomas de infección por begomovirus. Sin embargo, solo fue en 1991 cuando se registraron elevadas pérdidas económicas en la producción de tomate de tipo industrial, atribuidas al incremento en la población de las especies del complejo de la mosca blanca en asociación con el begomovirus *Potato yellow mosaic Panama virus* (PYMPV) (Engel, Fernández, Jeske, y Frischmuth, 1998; Anderson y Morales, 2005). La provincia de Los Santos pertenece a la Región de Azuero y según el informe de producción agropecuaria del Instituto Nacional de Estadística y Censo de Panamá (2017) durante la época seca produce el 87% del tomate industrial del país.

En el distrito Los Santos, Fernández, Osorio y Frischmuth, (1998) identificaron las arvenses en los cultivos de tomate con infección de begomovirus que pertenecen a las familias Malvaceae (*Herissantia crispa*, *Sida acuta* y *Sida rhombifolia*), Euphorbiaceae (*Euphorbia heterophylla*), Tiliaceae (*Corchorus orinocensis*), Fabaceae (*R. minima*) y Asteraceae (*Eleutheranthera ruderalis*). Durante la época lluviosa, las parcelas de cultivo son dejadas en barbecho o son usadas para pastoreo. La alternancia entre temporada de cultivo y de barbecho puede estimular a la mosca blanca a utilizar hospederas alternos, siendo estos, generalmente, las arvenses asociadas al

cultivo (Bezerra, De Oliveira y Vasconcelos, 2004). Este trabajo se desarrolló con el objetivo de identificar los reservorios de begomovirus en las parcelas dedicadas al cultivo de tomate, en las épocas de barbecho y de cultivo en el distrito de Los Santos, provincia de Los Santos (Panamá). La identificación de nuevos hospederos alternativos de begomovirus en las áreas de cultivo de tomate permitirá mejorar las estrategias de manejo de las arvenses, incluyendo la época de barbecho en la planificación.

Materiales y métodos

Área de muestreo

Fueron seleccionadas 10 fincas dedicadas al cultivo de tomate industrial entre los productores asociados a la Cooperativa El Progreso R. L. del Corregimiento de Agua Buena del Distrito de Los Santos. La ubicación de las parcelas se determinó mediante un sistema de posicionamiento global (GPS) (Etrex, Summit HC, Garmin®, Shijr, Taiwan), en los poblados de Tres Quebradas, La Limona, La Colorada, San Luis, La Balita, La Espigadilla, La Lomita y La Honda Los Santos que pertenecen al distrito de Los Santos, provincia de Los Santos, República de Panamá (Tabla 1).

Recolección de plantas arvenses

Las recolecciones fueron realizadas en parcelas de tomate de tipo industrial var. IDIAP T-8, en el periodo comprendido entre octubre de 2016 y abril de 2017. Las recolecciones en campos en barbecho fueron realizadas entre mayo y septiembre de 2016.

El recorrido de las parcelas para la toma de muestras se hizo tratando de abarcar una superficie representativa. Durante este recorrido, fueron recolectadas 110 muestras de ápices de arvenses dicotiledóneas sintomáticas y asintomáticas, 78 en época de cultivo y 32 en época de barbecho (Tabla 2). Se consideró como plantas sintomáticas aquellas con la presencia de síntomas característicos de virosis, tales como: mosaico foliar amarillo, moteado foliar amarillo, entrenudos cortos, hojas enrolladas o rizadas (Engel et al., 1998).

Procesamiento de muestras

Las muestras fueron colocadas en tubos de poliuretano de 50 ml con gel de silicio (Scharlau®, Barcelona, España) como secante para garantizar su conservación. La identificación taxonómica preliminar se realizó en campo, mediante observación de las plantas con flores. Luego

fueron codificadas e identificadas en el Laboratorio del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). Su identificación fue verificada en el Herbario de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI).

Extracción de ácidos nucleicos totales

Se obtuvo el ADN total a partir de 0.05 g de tejido vegetal como lo indica el protocolo de Dellaporta (Dellaporta, Wood y Hicks, 1983). El producto obtenido fue disuelto en 100 µL de agua bidestilada estéril y conservado a -20 °C hasta su posterior uso en PCR.

Amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La solución para la PCR consistió en 6.25 µL de PCR Master Mix® (Promega®, Madison WI, U.S.A), 0.20 µL de cada cebador degenerado AVCORE 494 y ACCORE 1048 que amplifican universalmente la región conservada de aproximadamente 550 pb, ubicada en la parte central de la secuencia de ADN que codifica para la proteína de la cápside de los begomovirus (Wyatt y Brown, 1996). Se completó con 2.25 µL de agua destilada estéril para un volumen de reacción final de 12.5 µL que incluía 2.5 µL de ADN total de cada muestra. La amplificación se realizó en un termociclador modelo 2720 Applied Biosystems Thermal Cycler versión 2.09 (ThermoFisher Scientific, CA, U.S.A). El programa de PCR consistió en 2 min a 94 °C, 30 ciclos que comprendían tres etapas cada uno: 94 °C durante 1 min, 58 °C durante 1 min y 72 °C por 1 min. Los resultados se visualizaron en gel de agarosa (Type I, Sigma-Aldrich) al 1.5% en TAE 1.0% y tinción de bromuro de etidio. Como patrón se usó el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Promega®, Madison WI, U.S.A) (Figura 1). Como control positivo se usaron plantas de tomate del cultivo con síntomas de infección por begomovirus. Como control negativo se usaron plantas de tomate cultivadas en invernadero.

Análisis estadísticos

La comparación de la presencia de begomovirus en las arvenses fue realizada entre temporada de cultivo y temporada de barbecho, mediante una Prueba de *t* de Student para demostrar que la prevalencia de malezas infectadas por begomovirus varía durante la época de barbecho (μ_1) con respecto a la época de cultivo (μ_2), es decir: $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$; en donde: μ_1 es el valor promedio de la prevalencia de plantas infectadas por begomovirus durante el barbecho y μ_2 es el valor promedio de la prevalencia durante la temporada de cultivo

(Tabla 3). Para verificar que las diferencias entre las medias no fueron debidas al azar, se usó un nivel de significancia de 5%. El proceso de selección de las muestras de tejido vegetal en campo se realizó de manera aleatorizada y los valores de las prevalencias de las plantas infectadas por begomovirus fueron transformadas con para compensar la falta de normalidad de los datos. En esta investigación la variable de estudio fue la prevalencia de plantas infectadas por begomovirus.

Resultados y discusión

Se analizaron un total de 110 muestras mediante PCR, la observación de una banda entre 550 y 600 pares de bases indicó la presencia de begomovirus en las muestras como señalan Wyatt y Brown (1996) (Figura 1). En la época de cultivo de tomate de 2016 (Tabla 1) fueron evaluadas en total 35 muestras de arvenses para detectar la presencia o ausencia de begomovirus. Las muestras evaluadas durante esta época pertenecían a 12 familias, representadas por 18 especies. Los resultados obtenidos mostraron

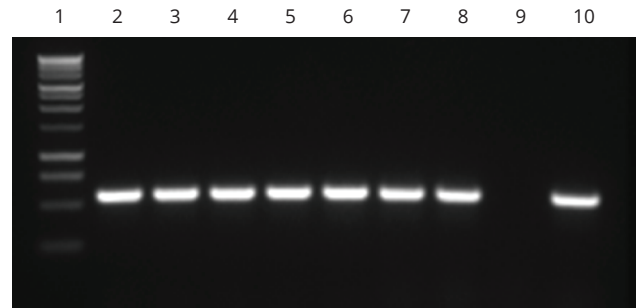


Figura 1. Resultados de la amplificación por PCR de un fragmento del componente A de begomovirus de aproximadamente 550 pb con los cebadores AVCORE y ACCORE. Líneas: **1.** Marcador de peso molecular 1 kb Ladder (Promega), **2.** *P. angulata*, **3.** *C. mucunoides*, **4.** *R. minima*, **5.** *M. alceifolia*, **6.** *A. spinosus*, **7.** *M. americanum*, **8.** *C. viscosa*, **9.** Control negativo, **10.** Control positivo. Electroforesis en gel de agarosa 1.0% con tinción de Bromuro de etidio.

Tabla 1. Ubicación de los sitios de colecta en el Distrito de Los Santos.

Finca (No.)	Pobladros	Coordenadas (WGS 84)	
		Latitud	Longitud
1	Tres Quebradas	N 7°50'51.4176"	W 80°23'37.8605"
2	Tres Quebradas	N 7°50'44.4912"	W 80°24'05.9858"
3	La Limona	N 7°49'24.9456"	W 80°26'07.9588"
4	La Colorada	N 7°50'09.0924"	W 80°31'45.3774"
5	San Luis	N 7°51'44.2"	W 80°30'60"
6	La Balita	N 7°49'400"	W 80°28'281'
7	La Espigadilla	N 7°51'41"	W 80°22'33"
8	La Lomita	N 7°51'51"	W 80°22'37"
9	La Honda	N 7°53'56"	W 80°21'12"
10	La Honda	N 7°54'14"	W 80°21'67"

la infección de 12 arvenses de las especies *R. minima*, *Calopogonium mucunoides*, *Mimosa* sp. y *Physalis. angulata*. Es decir, un total del 34% de plantas estaban infectadas (Tabla 2).

En la época de barbecho del 2016, (Tabla 1) fueron evaluadas 32 muestras. Los resultados obtenidos indicaron que 13 muestras pertenecientes a siete especies fueron positivas a infección por begomovirus. Estas fueron: *A. dubius*, *Cleome viscosa*, *C. mucunoides*, *R. minima*, *Malvastrum americanum*, *P. angulata* y *Hybanthus. attenuatus*, para un total del 41% de plantas infectadas durante esta temporada (Tabla 2).

En la época de cultivo de 2017, se tomaron muestras en cuatro fincas (Tabla 1) para un total de 43 muestras evaluadas. Los resultados obtenidos fueron: 12 muestras positivas de las especies *A. spinosus*, *C. viscosa*, *R. minima*, *Malachra alceifolia* y *P. angulata*, para un total de 28% (Tabla 2).

Los resultados muestran la presencia de arvenses infectadas por begomovirus en fincas dedicadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos, tanto en épocas de cultivo como de barbecho. Las especies de arvenses que resultaron con mayor número de plantas infectadas por begomovirus fueron: *P. angulata*. (100%), *Mimosa* spp. (100%), *A. dubius* (100%), *R. minima* (70%), *C. viscosa* (60%), *A. spinosus* (50%), *H. attenuatus* (50%), *C. mucunoides* (44.4%), *M. alceifolia* (28%), *M. americanum* (25%). En general, el 33.64% de las arvenses resultaron infectadas por begomovirus. Las plantas positivas pertenecen a las familias Amaranthaceae, Cleomaceae, Fabaceae, Malvaceae, Solanaceae y Violaceae.

Las arvenses *A. dubius*, *A. spinosus*, *C. mucunoides*, *C. viscosa*, *H. attenuatus*, *M. alceifolia*, *M. americanum*, *Mimosa* sp. y *P. angulata* fueron registradas por primera vez como hospederas de *begomovirus* asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos y en la República de Panamá.

Los síntomas de infección con begomovirus, como mosaico dorado, fueron observadas en *C. mucunoides*, *R. minima* y *Sida* spp. tanto en la época de cultivo como de barbecho. Las arvenses *M. alceifolia*, *M. americanum* y *Euphorbia* spp. no fueron recolectadas durante la época de cultivo, ya que por tratarse de arbustos de mayor tamaño, son eliminadas por los productores de las áreas de cultivo. No obstante durante la época de barbecho fue posible recolectar plantas con síntomas de mosaico amarillo y clorosis en la hoja. La presencia de arvenses con clorosis de la hoja y negativas a begomovirus, pudo ser debido a que estaban infectadas con otros patógenos o presentaban carencias nutricionales. Las plantas

con alto contenido de mucilago como *Sida* spp. y *Euphorbia* spp., no dieron resultados positivos, a pesar de que se les extrajo ADN total siguiendo protocolos específicos (Echevarria-Machado et al., 2005; Ghosh, Paul, Ghosh, Roy, 2009).

El 100% de las arvenses identificadas como *P. angulata* que fueron recolectadas, tanto en época de cultivo como de barbecho, fueron asintomáticas y presentaron infección por begomovirus. Este dato es importante porque esta especie, igual que *S. lycopersicum*, pertenecen a la familia Solanaceae, lo que aumenta el riesgo de ser un hospedero alternativo de los begomovirus que infectan al tomate o una fuente de variabilidad genética para estos (Bridson, Patil, Bagewadi, Nawaz-ul-rehman, y Fauquet, 2010). La presencia de begomovirus que infectan arvenses y plantas de interés económico en Centroamérica ha sido documentada entre Fabaceae en el caso de frijol y *Calopogonium golden mosaic virus* en Nicaragua y Costa Rica (Diaz, Maxwell, Karkashian y Ramirez, 2002; Karkashian, Ramos-Reynoso, Maxwell y Ramirez, 2011; Fiallo-Olivé, Navas-Castillo, Moriones y Martínez-Zubiaur, 2012). Los resultados presentados indican que el 26% de las arvenses infectadas por begomovirus son asintomáticas (Tabla 2), lo que permite suponer que la cantidad de inóculo presente en el agroecosistema al momento de establecer el cultivo puede ser subestimada por el productor. Una práctica frecuente es la remoción de las arvenses infectadas por virus y que se encuentran presentes en los alrededores de cultivos de interés económico. Sin embargo, esto no siempre reduce la prevalencia de virus en un cultivo inclusive, en algunos casos puede incrementar la infección, ya que induce al vector a trasladarse desde las arvenses hasta el cultivo (Bezerra et al., 2004).

Presencia de begomovirus en las arvenses en temporadas de cultivo y de barbecho

La gran capacidad innata de sobrevivencia de las arvenses les permite persistir en el ecosistema a través de las épocas del año. No obstante, esta situación las expone a infecciones por begomovirus provenientes de las moscas blancas virulíferas de la zona. Este hecho, permite la propagación y recombinación de los begomovirus en hospederos alternativos, aún en épocas con ausencia de los hospederos de interés económico, como señalan Gilbertson, Rojas, Russell y Maxwell (1991). La comparación de la presencia de begomovirus en las arvenses entre temporada de cultivo y temporada de barbecho, indicó que la prevalencia de malezas infectadas no varió ($P > 0.05$) a

Tabla 2. Presencia de begomovirus en arvenses asociadas al cultivo de tomate, en el distrito de Los Santos, Panamá.

Familia	Especie	Cultivo 2016		Brbecho 2016		cultivo 2017	
		Sínt ¹ .	PCR	Sínt.	PCR	Sínt.	PCR
Amaranthaceae	<i>Amaranthus dubius</i> Mart. ex Thell.	—	—	A**	1 (+)	—	—
Amaranthaceae	<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	—	—	A	1 (-)	A	1 (-)
Amaranthaceae	<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	—	—	—	—	A	2 (+)
Rubiaceae	<i>Borreria laevis</i> (Lam.) Griseb.	—	—	—	—	A	1 (-)
Fabaceae	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	S*	3 (+)	S	4 (+)	—	—
Fabaceae	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	A	1 (-)	A	1 (-)	—	—
Cleomaceae	<i>Cleome viscosa</i> (L.)	A	2 (-)	A	1 (+)	A	2 (+)
Tiliaceae	<i>Corchorus orinocensis</i> Kunth	A	1 (-)	—	—	A	1 (-)
Euphorbiaceae	<i>Croton hirtus</i> L'Her.	A	1 (-)	—	—	—	—
Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i> (L.)	S	1 (-)	A	1 (-)	—	—
Fabaceae	<i>Desmodium tortuosum</i> Desv	—	—	—	—	A	1 (-)
Fabaceae	<i>Desmodium tortuosum</i> Desv	—	—	—	—	S	1 (-)
Asteraceae	<i>Eleutheranthera ruderalis</i> (Sw.) Sch.Bip	A	1 (-)	—	—	A	1 (-)
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	A	2 (-)	S	2 (-)	A	1 (-)
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	—	—	—	—	S	3 (-)
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hypericifolia</i> (L.)	—	—	S	2 (-)	—	—
Boraginaceae	<i>Heliotropium indicum</i> (L.)	—	—	A	1 (-)	A	2 (-)
Violaceae	<i>Hybanthus attenuatus</i> Humb. & Bonpl. ex Roem. & Schult.	—	—	A	1 (+)	A	1 (+)
Euphorbiaceae	<i>Jatropha gossypifolia</i> (L.)	—	—	—	—	A	3 (-)
Euphorbiaceae	<i>Jatropha integerrima</i> Jacq.	A	1 (-)	—	—	—	—
Zygophyllaceae	<i>Kallstroemia máxima</i> Scop	A	1 (-)	—	—	A	2 (-)
Zygophyllaceae	<i>Kallstroemia máxima</i> Scop.	—	—	—	—	—	—
Onagraceae	<i>Ludwigia</i> sp.	—	—	—	—	A	2 (-)
Malvaceae	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	A	2 (-)	A	2 (-)	A	2 (-)
Malvaceae	<i>Herissantia crispa</i>	—	—	A	1 (-)	—	—
Malvaceae	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	—	—	S	1 (-)	A	1 (+)
Malvaceae	<i>Malvastrum americanum</i> (L.) Torr	—	—	S	2 (-)	—	—
Malvaceae	<i>Malvastrum americanum</i> (L.) Torr	—	—	A	1 (-)	—	—
Asteraceae	<i>Melampodium divaricatum</i> (L. C. Rich.) DC.	—	—	A	1 (-)	—	—
Sterculiaceae	<i>Melochia pyramidata</i> (L.)	—	—	—	—	A	2 (-)
Fabaceae	<i>Mimosa</i> sp.	A	1 (+)	—	—	—	—
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> (L.)	—	—	—	—	A	1 (-)
Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn.	A	1 (-)	—	—	A	1 (-)
Solanaceae	<i>Physalis angulata</i> (L.)	A	2 (+)	A	1 (+)	A	3 (+)
Portulacaceae	<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	A	3 (-)	—	—	A	2 (-)
Fabaceae	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	S	6 (+)	S	4 (+)	S	3 (+)
Fabaceae	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	A	4 (-)	—	—	A	3 (-)
Rubiaceae	<i>Richardia scabra</i> (L.)	A	1 (-)	—	—	—	—
Malvaceae	<i>Sida</i> spp.	—	—	S	2 (-)	—	—
Malvaceae	<i>Sida</i> spp.	A	1 (-)	—	—	A	1 (-)
Asteraceae	<i>Spiracantha cornifolia</i> Kunth	—	—	A	1 (-)	—	—
Asteraceae	<i>Tridax procumbens</i> (L.)	—	—	A	1 (-)	—	—

*S: Sintomática: Presencia de mosaico dorado, clorosis de la hoja, enrollamiento de la hoja, clorosis de las venas. **A: Asintomática: Ausencia de los síntomas descritos para la infección con begomovirus. ¹.Sínt. = Síntomas.

través del año (Tabla 3). Los resultados obtenidos indican que, tanto en época de cultivo como de barbecho, se pueden encontrar arvenses infectadas en las parcelas de cultivo de tomate, lo que muestra el potencial que tienen como reservorio y hospedero alternativo de begomovirus, que infecten las plantas de este cultivo de una temporada a la siguiente.

Tabla 3. Prevalencia de begomovirus en las malezas durante las temporadas de cultivo y de barbecho (2016-17). distrito de Los Santos, Panamá.

Finca (No.)	Barbecho	Cultivo
1	1.449	1.414
2	1.472	1.472
3	1.612	1.528
4	1.549	1.700
5	1.581	1.500
6	1.658	1.528
7	—	1.472
8	—	1.477
9	—	1.512
10	—	1.569
Promedio	1.553	1.517
F test (P)	0.520	n.s.
F calc.	0.901	n.s.
t test (p)	0.438	n.s.
t score (calc.)	0.798	n.s.
t 0.05/2 (14 d.f.)	3.326	n.s.
CV	0.030	

*P<0.05, **P<0.01 y n.s. P≥0.05

Datos transformados con la función $\sqrt{x+2}$.

+Fuente: *Biometrika tables for statisticians* (Pearson y Hartley, 1966).

Conclusiones

Los resultados indican que las especies de arvenses asociadas al cultivo de tomate en el Distrito de Los Santos, son hospederas de begomovirus durante las épocas de cultivo y de barbecho. Las especies de plantas infectadas con begomovirus fueron: *P. angulata*, *A. dubius*, *A. spinosus*, *R. minima*, *C. viscosa*, *H. attenuatus*, *C. mucunoides*, *M. alceifolia*, *M. americanum* y *Mimosa* sp.

Las arvenses *A. dubius*, *A. spinosus*, *C. mucunoides*, *C. viscosa*, *H. attenuatus*, *M. alceifolia*, *M. americanum*, *Mimosa* sp. y *P. angulata*, fueron registradas por primera vez en este estudio como hospederas de begomovirus en el distrito de Los Santos, República de Panamá.

Las especies sintomáticas *R. minima* y *C. mucunoides* y la asintomática *P. angulata* presentaron resultados positivos a infección por

begomovirus tanto en la temporada de cultivo como de barbecho. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en los valores de prevalencia de infección por begomovirus entre las arvenses recolectadas durante la temporada de cultivo y la de barbecho.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología de Panamá por el financiamiento del proyecto ITE15-008, a INDICASAT-AIP, a los agricultores de la Cooperativa Agropecuaria El Progreso R.L., a S. Vásquez, R. Serrano y A V. Morales de la FCA de la Universidad de Panamá.

Referencias

- Anderson, P. K. y Morales, F. J. (2005). *Whitefly and whitefly-borne viruses in the tropics: Building a knowledge base for global action*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 351 p. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54327>
- Bezerra, M.-A.; De Oliveira, M. R.V. y Vasconcelos, S. (2004). Does the Presence of Weeds Affect *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) infestation on tomato plants in a semi-arid agro-ecosystem? *Neotropical Entomology*, 33(6), 769-775. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000600015>
- Bridson, R. W.; Patil, B. L.; Bagewadi, B.; Nawaz-ul-rehman, M. S. y Fauquet, C. M. (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-97>
- Brown, J. K.; Lastra, R. y Bird, J. (1991). First documentation of whitefly-transmitted geminiviruses causing widespread disease in cotton, tobacco and tomato in Dominican Republic and in tomato in Puerto Rico. *Fitopatología*, 26, 47. <https://books.google.com.pa/books?id=aiHpCAAAQBAJypg>
- Brown, J. K.; Zerbini, F. M.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Ramos-Sobrinho, R.; Silva, J. C. F. y Varsani, A. (2015). Revision of begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160(6), 1593-1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>
- Dellaporta, S. L.; Wood, J. y Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Diaz, M., Maxwell, D. P., Karkashian, J. P. y Ramirez, P. (2002). Calopogonium golden mosaic virus Identified in Phaseolus vulgaris from Western and Northern Regions of Costa Rica. *Plant Disease*, 86(2), 188. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.2.188B>
- Echevarria-Machado, I.; Sanchez-Cach, L. A.; Hernandez-Zepeda, C.; Rivera-Madrid, R. y Moreno-Valenzuela, O. A. (2005). A simple and efficient method for isolation of DNA in high

- mucilaginous plant tissues. *Mol. Biol.*, 31, 129-135. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:129>
- Engel, M.; Fernández, O.; Jeske, H. y Frischmuth, T. (1998). Molecular characterization of a new whitefly-transmissible bipartite geminivirus infecting tomato in Panama. *The Journal of General Virology*, 79, 2313-2317. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-10-2313>
- Fernández, O.; Osorio, O. y Frischmuth, T. (1998). Detección de Geminivirus en Malezas Asociadas al Cultivo de Tomate en Panamá. *Memoria VII Taller Latinoamericano y del Caribe de Mosca Blanca y Geminivirus*. Nicaragua.
- Fiallo-Olivé, E.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E. y Martínez-Zubiaur, Y. (2012). Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. *Archives of Virology* 157(1), 141-146. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1123-8>
- García-Andrés, S.; Monci, F.; Navas-Castillo, J. y Moriones, E. (2006). Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*, 350(2), 433-442. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.028>
- Ghosh, R.; Paul, S.; Ghosh, S. K. y Roy A. (2009). An improved method of DNA isolation suitable for PCR-based detection of begomoviruses from jute and other mucilaginous plants. *J. Virol. Methods*, 159, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.020>
- Gilbertson, R. L.; Rojas, M. R.; Russell, D. R. y Maxwell, D. P. (1991). Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *The Journal of General Virology*, 72, 2843-2848. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-11-2843>
- Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC). (2017). Disponible en: https://www.contraloria.gob.pa/inec/Publicaciones/Publicaciones.aspx?ID_SUBCATEGORIA=60yID_PUBLICACION=479.
- Jovel, J.; Reski, G.; Rothenstein, D.; Ringel, M.; Frischmuth, T. y Jeske, H. (2004). *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of Begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. *Archives of Virology*, 149(4), 829-841. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0235-1>
- Karkashian, J.; Ramos-Reynoso, E. D.; Maxwell, D. P. y Ramírez, P. (2011). Begomoviruses Associated with Bean Golden Mosaic Disease in Nicaragua. *Plant Disease*, 95(8), 901-906. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-10-0165>
- Padidam, M.; Sawyer, S. y Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265(2), 218-225. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0056>
- Pearson, E. S. y Hartley, H. O. (Edit.). (1966). *Biometrika Tables for Statisticians*, Vol. I, 3. Auflage. University Press, Cambridge. XVI. 264 S. Preis 35 s.
- Ramos, P. L.; Guevara-González, R. G.; Peral, R.; Ascencio-Ibañez, J. T.; Polston, J. E.; Argüello-Astorga, G. R. y Rivera-Bustamante, R. F. (2003). Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*, 148(9), 1697-1712. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0136-3>
- Roye, M. E.; McLaughlin, W. A.; Nakhla, M. K. y Maxwell, D. P. (1997). Genetic Diversity Among Geminiviruses Associated with the Weed Species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease*, 81(11), 1251-1258. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1251>
- Solórzano-Morales, Á.; Castro-Vásquez, R.; Barboza-Vargas, N.; Hernández-Jiménez, E.; Hammond, R. y Ramírez-Fonseca, P. (2017). Detección de crinivirus y begomovirus en plántulas de tomate y arvenses asociadas a semilleros. *Agron. Mesoam.*, 28(2), 477-488. doi:10.15517/ma.v28i2.25860
- Stanley, J.; Bisaro, D. M.; Briddon, R.W.; Brown J.K.; Fauquet, C.M.; Harrison, B.D.; Rybicki, E.P. y Stenger, D.C. (2005). Geminiviridae. In: Fauquet C.M, Mayo M.A, Maniloff J, Desselberger., U. y Ball, L.A., eds. *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. London, UK: Elsevier/Academic Press. Pg. 301-326. <https://www.worldcat.org/title/virus-taxonomy-viiiith-report-of-the-international-committee-on-taxonomy-of-viruses/oclc/695933497>
- Umaharan, P.; Padidam, M.; Phelps, R. H.; Beachy, R. N. y Fauquet, C. M. (1998). Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology*, 88(12), 1262-1268. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1262>
- Wyatt, S. y Brown, J. K. (1996). Detection of Subgroup III Geminivirus Isolates in Leaf Extracts by Degenerate Primers and Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*, 86(12), 1288. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-1288>



Acta Agronómica



Revista Acta Agronómica

Página web: http://bit.ly/Acta_Agronomica_UNpal

ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118

actagronomica_pal@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira

www.palmira.unal.edu.co

Carrera 32 # 12-00, Edificio posgrados, 2^{do} piso

57 (2) 286 8888 Ext.: 35190

Palmira, Valle del Cauca, Colombia, Suramérica