

3

enero-junio de 2015

ISSN 2448-5225

E-CUCBA

CUCBA | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA



FECHA EFECTIVA DE PUBLICACIÓN: 26 DE JUNIO DE 2015

Nota del editor

Con la intención de llegar a un público más extenso que hacen uso de las tecnologías actuales, se decidió publicar la revista Scientia-CUCBA exclusivamente en formato digital. En México, el Instituto Nacional de Derechos de Autor, establece que se reinicie la serie con un ISSN distinto y a partir del "número uno" para la versión electrónica. Por desgracia, el título para la versión electrónica no puede utilizarse porque "Scientia" es un vocablo ya ocupado con anterioridad por lo que tuvo que proponerse un nombre nuevo: **e-Cucba**. Esto no significa que se trate de otra revista, por ello no será necesario alterar los registros de la versión impresa que de ella se tengan en las bibliotecas.

Esta versión electrónica puede consultarse de manera libre en la dirección: <http://e-cucba.cucba.udg.mx> y está diseñada para imprimirse en papel tamaño carta (21.59 × 27.94 cm).

Serán bienvenidos todos los trabajos en las diferentes áreas de la Biología, Ciencias Agropecuarias y Forestales para su revisión y posible publicación; la "información para los autores" se encuentra en la dirección antes citada. Las propuestas deben dirigirse a: servando.carvajal1@gmail.com

Editor's note

With the intention to make it possible for more readers to have easy access to our publications we have decided to publish our bulletin Scientia-CUCBA exclusively in digital format. Unfortunately, the title to the electronic version can not be used because "Scientia" is a word already occupied previously, so we had to propose a new one: **e-CUCBA**. This does not imply that it is a new journal and therefore libraries should not designate a new title for e-Cucba. However, the Mexican Instituto Nacional de Derechos de Autor requires distinct ISSN number beginning with "number one" for the first electronic volume. Please note this difference in future citations.

The electronic version is available to anyone in: <http://e-cucba.cucba.udg.mx>. The page is designed to print on letter size paper (8.5 × 11 inches).

We welcome articles regarding any aspects of Biology and Agricultural and Animal Sciences and Forestry for review and possible publication. Information for contributors is available at the address cited above. Proposals should be sent to: servando.carvajal1@gmail.com



Arreglo Floral presentado en el Festival Flores de Jalisco 2014 por la empresa Inverflor, vinculada con investigadores del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Fotografía María Luisa García Sahagún.

e-Cucba, Año 2, Número 3, enero-junio de 2015, es una publicación semestral, editada por la Universidad de Guadalajara, a través de la Coordinación de Investigación, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, C.P. 45225, La Venta del Astillero, Zapopan, Jalisco, México. Teléfono: (33) 3777-1155, <http://e-cucba.cucba.udg.mx>, servando.carvajal@cucba.udg.mx, editor responsable: Servando Carvajal Hernández. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo 04 – 2013 – 091314164100 – 203, ISSN: 2448-5225, otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la actualización de este número Angélica María Velázquez Flores de la Coordinación de Tecnologías para el Aprendizaje. Fecha de la última modificación 26 de junio de 2015, con un tiraje de un ejemplar.

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

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la Universidad de Guadalajara.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

RECTORÍA GENERAL

Iztcoatl Tonatiuh Bravo Padilla
Rector

Miguel Ángel Navarro Navarro
Vicerrector Ejecutivo

José Alfredo Peña Ramos
Secretario General

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Salvador Mena Munguía
Rector

Salvador González Luna
Secretario Académico

José Rizo Ayala
Secretario Administrativo

Coordinación de Investigación

Servando Carvajal
Coordinador de Investigación

Servando Carvajal
servando.carvajal1@gmail.com

María Luisa García Sahagún
mlgsahagun@gmail.com
Editores

Paul C. Kersey
pasapavi85@gmail.com
Auxiliar en la edición

Contenido

Fenología y producción de materia seca en variedades de frijol arbustivo de diferente hábito de crecimiento

Phenology and dry matter production in bush bean varieties of different growth habit Citar

Rogelio Lépiz Ildelfonso, Iris Etlvina Chavarín Espinoza y Eduardo Rodríguez Guzmán **3**

Silenciamiento del gen de la prosistemina en callos de *Physalis philadelphica* (Solanaceae)

Silencing of the prosystemin gene in the calluses of *Physalis philadelphica* (Solanaceae) Citar

María Fernanda Esparza-Soltero, Fernando Santacruz-Ruvalcaba, Abel Gutiérrez-Ortega, José Luis Cabrera-Ponce y Carla Sánchez-Hernández **19**

Evaluación de sustratos y el efecto algas marinas en el desarrollo y rendimiento de *Capsicum annuum* (Solanaceae)

Evaluation of substrates and the effect of marine algae on the development and yield of *Capsicum annuum* (Solanaceae) Citar

María Luisa García Sahagún, Luis Eduardo Durán Meza, Ricardo Ulises Cárdenas Rodríguez, Alicia De Luna Vega, Eduardo Rodríguez Díaz y Juan Pedro Corona Salazar **31**

El aislamiento social después del destete altera el desarrollo de los índices conductuales de maduración sexual y produce déficits en la conducta sexual de ratas machos

Post-weaning social isolation alters the development of behavioral indices of sexual maturation and leads to deficits in the sexual behavior of male rats Citar

Marisela Hernández-González, Miguel Ángel Guevara, Mayra Liliana Ramírez-Rentería y Enrique Hernández-Arteaga **55**

Comite Editorial Internacional 2013-2016

Anatoli Borodanienko

Universidad de Guanajuato,
México.

Alejandro Castillo Ayala

Universidad de Texas A & M.
U.S.A.

Daniel G. Debouck

Centro Internacional de
Agricultura Tropical (CIAT),
Cali, Colombia.

Eric Esteve

Centro Mas Bove. Tarragona,
España.

René Funes Rodríguez

Centro Interdisciplinario de
Ciencias Marinas (CICIMAR-
IPN), Baja California,
México.

Steve Gliesman

Universidad de California,
Campus Santa Cruz. U.S.A.

Rafael Gómez Kasky

Universidad de Las Villas,
Cuba.

Eduardo González Izquierdo

Universidad de Pinar del Río,
Cuba.

David Hansen

Midamerican International
Agricultural Consortium,
Iowa State University. U.S.A.

Ángel Luque Escalona

Universidad de Las Palmas,
Gran Canaria, España.

Anderson Ferreira P.**Machado.**

Universidade Estadual de
Feira de Santana, BA. Brasil

Xavier Navarro Acebes

Departament de Biología
Cel•lular, de Fisiología i
d'immunologia, Bellaterra,
España.

Guillermo A. Navarro

Centro Agronómico Tropical
de Investigación y Enseñanza
(CATIE) - Turrialba, Costa
Rica.

Michael F. Notan

Collage of Agricultura,
Food & Natural Resources,
University of Missouri,
Columbia, U.S.A.

Oliver Pratseval Algels

Centro de Tecnología de la
Carne. Monells (Girona)
España.

Ruperto Quesada Monge

Instituto Tecnológico de
Costa Rica.

Joan Tibau

Centro de Control Porcino.
Monells (Girona) España.

Enrique Verdú Navarro

Departament de Biología
Cel•lular, de Fisiología i
d'immunologia, Bellaterra,
España.

Francisco Villalpando Ibarra

Organización Meteorológica
Mundial (OMM), Ginebra,
Suiza.



Es una publicación de la Universidad de Guadalajara, que tiene el propósito de difundir el conocimiento generado en Biología, ciencias Agropecuarias y Forestales, entendidas en sentido amplio, así como los resultados de los trabajos de investigación científica desarrollados en sus centros universitarios y en otras instituciones tanto nacionales como del extranjero. Se publican trabajos originales e inéditos en español, inglés, portugués y francés; cada artículo contiene un resumen en español y en inglés, además del propio de la lengua en que esté escrito. No hay límites en el número de páginas ni en la cantidad de fotografías a color.

Diseño y maquetación

ORGÁNICA EDITORES

Saulo Cortés | José Manuel Sánchez
🌐 www.organicaeditores.mx

Fenología y producción de materia seca en variedades de frijol arbustivo de diferente hábito de crecimiento

Phenology and dry matter production in bush bean varieties of different growth habit

Rogelio Lépiz Ildelfonso[✉], Iris Etelvina Chavarín Espinoza y Eduardo Rodríguez Guzmán

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez
No. 2100, La Venta del Astillero,
Zapopan 45221, Jalisco, México.
☎ 3777-1150, ext. 33190.

✉ rlepiz@cucba.udg.mx

Citar

Resumen

Se estableció un ensayo de variedades de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferente hábito de crecimiento, para determinar los tiempos y duración de sus etapas de desarrollo y la acumulación de materia seca. Las variedades fueron “Peruano Mostaza” de hábito de crecimiento determinado tipo I, “Palomo” de hábito indeterminado erecto tipo II y “Azufrado Tapatío” de crecimiento indeterminado postrado tipo III. Se sembraron en un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones, se registraron las etapas de desarrollo y se practicaron muestreos de materia seca al inicio de cada etapa a partir de la primera hoja trifoliada. Se construyeron las curvas de acumulación de peso seco y se obtuvieron las tasas de crecimiento entre etapas fenológicas. Las variedades mostraron un ciclo biológico similar entre 88 y 93 días después de la siembra y diferencias entre sí en alcanzar algunas etapas de desarrollo. La producción de materia seca entre variedades, presentó diferencias en algunas etapas del cultivo. “Peruano Mostaza” fue superior en primera y segunda hoja trifoliada, “Palomo” en prefloración y floración y “Azufrado Tapatío” registró la mayor producción de biomasa en la etapa de madurez fisiológica. Al desagregar la producción de materia seca, las estructuras vegetativas y reproductivas pre-

sentaron un incremento hasta el llenado de vainas; de llenado de vainas a madurez fisiológica la parte vegetativa descendió y la parte reproductiva se incrementó. La tasa de crecimiento ($\text{gdía}^{-1}\text{m}^{-2}$) mostró resultados similares a lo observado en producción de materia seca; la variedad “Peruano Mostaza” expresó su mayor tasa de crecimiento en el periodo de tercera hoja trifoliada a prefloración ($9.13 \text{gdía}^{-1}\text{m}^{-2}$), el cultivar “Palomo”, entre prefloración a floración ($12.0 \text{gdía}^{-1}\text{m}^{-2}$) y “Azufrado Tapatío” en el periodo de floración a formación de vainas ($12.27 \text{gdía}^{-1}\text{m}^{-2}$).

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., etapas de desarrollo, biomasa, Leguminosae, Fabaceae.

Abstract

A trial was established using varieties of bush beans (*Phaseolus vulgaris* L.) characterized by different growth habits to determine the times and duration of their developmental stages and dry matter accumulation. The varieties were “Peruano Mostaza”, determinate growth habit type I; “Palomo”, indeterminate erect habit type II; and “Azufrado Tapatío”, indeterminate prostrated growth habit type III. All three varieties were sown in a randomized complete-block design with 3 replications. Recordings included (1) the developmental stages; and, (2) sam-

plings of dry matter taken at the onset of each stage from the first trifoliolate leaf. Dry weight accumulation curves were elaborated and the growth rates between successive phenological stages were obtained. These varieties showed a similar life-cycle of 88-to-93 days after sowing, but differences in reaching some stages of development. Dry matter production among the varieties presented differences in some stages of growth. “Peruano Mostaza” was superior in the first and second trifoliolate leaves, “Palomo” at pre-flowering and flowering, while “Azufrado Tapatío” registered the highest production of biomass upon reaching physiological maturity. Disaggregation of the dry matter,

vegetative, and reproductive structures showed an increase up to the stage of pod-filling, but from pod-filling to physiological maturity the vegetative part decreased and the reproductive part increased. Growth rates ($\text{gday}^{-1}\text{m}^2^{-1}$) showed similar results to those observed in dry matter production; the variety “Peruano Mostaza” had its highest growth rate in the third trifoliolate leaf-to-pre-flowering period ($9.13 \text{ gday}^{-1}\text{m}^2^{-1}$); “Palomo” from pre-flowering to flowering ($12.0 \text{ gday}^{-1}\text{m}^2^{-1}$); and “Azufrado Tapatío” in the flowering-to-pod-formation period ($12.27 \text{ gday}^{-1}\text{m}^2^{-1}$).

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., stages of development, biomass, Leguminosae, Fabaceae.

Introducción

Durante el ciclo biológico de una planta, se presentan cambios morfológicos y fisiológicos que sirven de base para identificar las diferentes etapas o estadios por los que transita un cultivo durante su crecimiento y desarrollo. El desarrollo se refiere al proceso de diferenciación o de cambios estructurales durante el ciclo biológico, tales como emergencia, tercer nudo, inicio de floración, etcétera. Por su parte, el crecimiento se refiere al fenómeno cuantitativo y acumulativo al paso del tiempo de número de hojas, número de nudos, número de vainas, materia seca, etcétera (Kohashi-Shibata 1991; White 1991; Elías & Castellví 1996).

En genotipos de una especie como el frijol, de diferente hábito de crecimiento o ciclo biológico, una etapa de desarrollo determinada puede ocurrir en diferente tiempo (Fehr *et al.* 1971; Fernández *et al.* 1991) por efectos genéticos (hábito de crecimiento, ciclo vegetativo), pero también por factores del medio ambiente (tipo y calidad de suelo, elementos del clima, fotoperiodo); la interacción de estos factores puede modificar el momento en que un genotipo alcance un esta-

Introduction

During their life-cycle plants undergo morphological and physiological changes that allow us to identify the different stages or phases through which a crop passes during growth and development. Growth refers to a quantitative and accumulative phenomenon over time that involves the number of leaves, nodes and pods, and dry matter production, etcetera (Kohashi-Shibata 1991; White 1991; Elías & Castellví 1996). Development, in contrast, refers to the process of structural differentiation or change during the life-cycle, including sprouting, third node, and onset of flowering, etcetera.

In genotypes of species like beans that have different growth habits or life-cycles, a certain developmental stage can occur at different times (Fehr *et al.* 1971; Fernández *et al.* 1991) due to both genetic effects (growth habit, vegetative cycle) and environmental factors (eg. soil type and quality, climatic elements, photoperiod). The interaction of these factors can modify the moment at which a particular genotype reaches a specific developmental stage (Elías & Castellví 1996; Galindo & Clavijo 2009), so when refer-

dio de desarrollo determinado (Elías & Castellví 1996; Galindo & Clavijo 2009). Por lo anterior, referirse a una etapa de desarrollo para la realización de una práctica agronómica o para la aplicación de un tratamiento al cultivo, es más adecuado que referirse a los días transcurridos después de la siembra (Fehr *et al.* 1971. Fernández *et al.* 1991; Meier *et al.* 2009).

La escala fenológica aceptada y utilizada por la mayor parte de los programas de frijol de América y del Viejo Continente (Escalante & Kohashi-Shibata 1993), describe diez etapas sucesivas y se basa en la morfología de la planta y en los cambios fisiológicos que se suceden durante el desarrollo del frijol (Fernández *et al.* 1991). Las etapas se agrupan en dos grandes fases: vegetativa (5 estadios) y reproductiva (5 estadios). La escala desarrollada para frijol, es similar a la escala utilizada en el cultivo de la soya; por el hábito de crecimiento de la soya, la escala es más extendida y contempla seis estadios correspondientes a la fase vegetativa y ocho a la fase reproductiva (Fehr *et al.* 1971). Por su parte el sistema de codificación BBCH (iniciales de las palabras alemanas *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry*) propuesto para casi todas las plantas cultivadas, anuales y perennes, considera también diez estadios principales de desarrollo, con adición de etapas secundarias dentro de cada estadio principal, para describir con mayor precisión etapas cortas, dando como resultado un código de dos cifras (Meier *et al.* 2009).

De acuerdo con Fernández *et al.* (1991), la fase vegetativa en frijol da inicio cuando se le brinda a la semilla las condiciones para iniciar la germinación y termina cuando aparecen los primeros botones florales. En esta fase se desarrollan las estructuras vegetativas necesarias para la actividad reproductiva de la planta e incluye cinco estadios conocidos también como etapas de desarrollo: germinación (V0), emergencia (V1), hojas primarias (V2), primera hoja trifoliada (V3) y tercera hoja trifoliada (V4). La fase reproductiva se inicia con la aparición de los botones florales y termina cuando la planta llega a madurez fisiológica; incluye cinco estadios: prefloración (R5), floración (R6), formación de vainas (R7), llenado de vainas (R8) y madurez fisiológica (R9). En las plantas de frijol de hábito

ring to a developmental stage for carrying out an agricultural practice or applying a crop treatment it is best to refer to the days elapsed after planting (Fehr *et al.* 1971; Fernández *et al.* 1991; Meier *et al.* 2009).

The phenological scale that is widely accepted and utilized by most programs for American and European bean species (Escalante & Kohashi-Shibata 1993) describes ten successive stages based on plant morphology and the physiological changes that occur during bean development (Fernández *et al.* 1991). These stages are grouped into two broad phases, vegetative and reproductive, each with 5 states. The scale elaborated for beans is similar to the one used for soya, though the latter is more extensive as it includes six and eight states in the vegetative and reproductive phases, respectively (Fehr *et al.* 1971). The BBCH coding system (from the German *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry*) applied to almost all annual and perennial cultivated plants also has ten principal stages of development, but adds secondary stages within each main one to describe small changes more precisely; this results in a 2-digit code (Meier *et al.* 2009).

According to Fernández *et al.* (1991), in beans the vegetative phase begins when the seeds encounter the conditions necessary to commence germination, and ends when the first floral blossoms appear. This is the phase in which the vegetative structures that the plant requires for reproduction develop. It includes five states also called developmental stages: germination (V0), sprouting (V1), primary leaves (V2), first trifoliolate leaf (V3), and third trifoliolate leaf (V4). The reproductive phase begins with the appearance of floral blossoms, and ends when the plant reaches physiological maturity. It also includes five states: pre-flowering (R5), flowering (R6), pod-formation (R7), pod-filling (R8), and physiological maturity (R9). In bean plants with an indeterminate growth habit the appearance of vegetative structures continues after onset of the reproductive phase, so in plants of this type it is possible that some developmental stages will show simultaneous production of leaves, branches, stems, flowers and pods (Fernández *et al.* 1991, Escalante and Kohashi-Shibata 1993).

de crecimiento indeterminado, continúa la aparición de estructuras vegetativas cuando se inicia la fase reproductiva; en una planta de este tipo es posible que en algunas etapas de desarrollo se estén produciendo simultáneamente hojas, ramas, tallo, flores y vainas (Fernández *et al.* 1991, Escalante y Kohashi-Shibata 1993). Cada etapa comienza en un evento del desarrollo de la planta cuyo nombre la identifica y termina donde se inicia la siguiente. Cuando se trata de una población, se declara iniciada una etapa de desarrollo, cuando el 50 % de las plantas presentan tal condición. En los trabajos agronómicos como soya y frijol, suele registrarse también la madurez de cosecha, evento posterior que ocurre cuando las plantas presentan condiciones apropiadas de secado para su cosecha y trilla (Fernández *et al.* 1991; Lépiz *et al.* 2015).

En frijol, el rendimiento biológico medido a través de la materia seca o del rendimiento económico evaluado por la producción de grano, está determinado por el genotipo e influenciado por factores del medio (Fernández *et al.* 1991; Escalante & Kohashi-Shibata 1993). Se ha establecido que una variedad con mayor ciclo biológico y mayor tiempo de fotosíntesis, tiene una mayor producción de materia seca y en general, un mayor rendimiento de grano. Igualmente, se sabe que las tasas de crecimiento son sensibles a los cambios ambientales provocados por las prácticas agronómicas o por los factores del clima como la temperatura y el fotoperiodo (Kohashi-Shibata 1991; White 1991; Elías & Castellví, 1996).

Por su parte, el análisis del crecimiento a través de muestras secuenciales y acumulativas del peso seco de la planta, describe el crecimiento de un cultivo a través de sus etapas de desarrollo. Los análisis de crecimiento demostraron ser útiles en describir la plasticidad del cultivo, su respuesta a la aplicación de insumos, a cambios ambientales y así también, para determinar diferencias entre cultivares (Araújo *et al.* 2009).

En el frijol, la producción y acumulación de materia seca bajo condiciones no deficitarias, registra una tendencia de curva sigmoidea; una fase de crecimiento lento entre la emergencia (V1) y tercera hoja trifoliada (V4), un crecimiento ac-

Each stage begins with an event in plant development whose name identifies it, and ends when the following stage begins. When examining a population, a developmental stage is said to have begun when 50% of the individual plants present the required condition. Agronomic studies of soya and beans usually record crop maturity as well, a later event recognized when the plants show the appropriate drying condition for harvesting and threshing (Fernández *et al.* 1991; Lépiz *et al.* 2015).

The biological and economic yields of beans, measured by the amount of dry matter and grain production, respectively, depend on genotype, but can also be affected by environmental factors (Fernández *et al.* 1991; Escalante & Kohashi-Shibata 1993). Studies have established that varieties with longer life-cycles and photosynthesis periods have greater dry matter production and, usually, larger grain yields. It is also clear that growth rates are sensitive to environmental changes caused by agronomic practices or climatic factors such as temperature and photoperiod (Kohashi-Shibata 1991; White 1991; Elías & Castellví, 1996).

Analyses of growth based on sequential and cumulative samples of plant dry weight describe crop growth based on developmental stages. Growth analyses have proven to be useful in describing crop plasticity, responses to the application of inputs and environmental change, and in determining differences among cultivars (Araújo *et al.* 2009).

In beans, dry matter production and accumulation under non-deficitary conditions shows a curve with a sigmoidal tendency; that is, a phase of slow growth between sprouting (V1) and the third trifoliolate leaf (V4), active growth from pre-flowering (R5) to pod-filling (R8), and a stage with less accumulation between R8 and physiological maturity (R9) due to senescence and the loss of such organs as leaves, flowers and abortive pods (White & Izquierdo 1991; Kohashi-Shibata 1991; Silva *et al.* 2005).

The varieties registered for commercial bean production include cultivars with different growth habits and vegetative cycles. Although

tivo entre prefloración (R5) y llenado de vainas (R8) y una etapa de menor acumulación entre R8 y madurez fisiológica (R9) por la senescencia y pérdida de órganos como hojas, flores y vainas abortivas. (White & Izquierdo 1991; Kohashi-Shibata 1991; Silva *et al.* 2005).

Entre las variedades registradas para la producción comercial de frijol, se cuenta con cultivos de diferente hábito de crecimiento y ciclo vegetativo. No obstante que las nuevas variedades y líneas avanzadas cuentan con información relativa a sus caracteres morfológicos y agronómicos, se hace necesario conocer su fenología y características de acumulación de materia seca durante su desarrollo, para lograr un mejor manejo del cultivo. Si se considera lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el tiempo de ocurrencia y duración de las etapas de desarrollo y la acumulación de materia seca de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferente hábito de crecimiento.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en Las Agujas, Municipio de Zapopan, Jalisco, sitio ubicado a los 20° 44' N y 103° 30' O y a 1 578 m de elevación; con clima semicálido subhúmedo (Medina *et al.* 1998), con temperatura de 19.6 °C y precipitación media anual de 979.6 mm. Los suelos son de tipo regosol éutrico de mediana fertilidad, libres de sales y un pH ácido con rango de 4.5 a 5.5.

Los materiales genéticos que se utilizaron fueron “Peruano Mostaza” de hábito determinado arbustivo tipo I, “Palomo” de hábito indeterminado arbustivo erecto tipo II y “Azufrado Tapatío” de hábito indeterminado arbustivo postrado guía corta tipo III (para la determinación de los hábitos de crecimiento y su tipo, véase Fernández *et al.* 1991). La parcela experimental fue de cuatro surcos, de 70 cm de ancho y 5 m de longitud. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. La siembra se realizó el 29 de julio bajo condiciones de temporal y el ensayo se condujo bajo el manejo agronómico recomendado para una producción comercial de frijol (Lépiz *et al.* 2015). Se registraron las etapas de desarrollo descritas

we have information on the morphological and agronomic characteristics of new varieties and advanced lines, it is also necessary to know their phenology and properties of dry matter accumulation during development in order to optimize crop management. In light of these observations, the objective of this study was to determine the onset and duration of the developmental stages and dry matter accumulation of three common varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) that have different growth habits.

Materials and Methods

The experiment was conducted in the community of Las Agujas, Municipality of Zapopan, state of Jalisco, Mexico; located at 20° 44' N and 103° 30' OR and an elevation of 1,578 m.a.s.l. The climate is semi-warm and sub-humid (Medina *et al.* 1998), with a mean annual temperature of 19.6°C and mean annual precipitation of 979.6 mm. Soils are of the Eutric Regosol type with medium fertility, free of salts, and an acid pH in the range of 4.5–5.5.

The genetic materials used were “Peruano Mostaza”, determinate bush habit type I; “Palomo”, indeterminate bush erect habit type II; and “Azufrado Tapatío”, indeterminate prostrate bush short pod habit type III (on the classification of growth habits and types, see Fernández *et al.* 1991). The experimental plot included four furrows, each 70 cm wide and 5 m long. A randomized complete-block experimental design was used and three replications were made. Planting took place on July 29 under temporal conditions, and the trial was conducted following recommended agronomic management practices for commercial bean production (Lépiz *et al.* 2015). Developmental stages were recorded following Fernández *et al.* (1991). Seven samplings of dry matter were carried out with ten plants chosen randomly per plot beginning at the first trifoliolate leaf. The plants were taken at a constant weight in a drying oven.

Using the initial and final days of each developmental stage, phenological graphs were drawn for each variety, while the dry weight values were plotted on graphs of dry matter accu-

por Fernández *et al.* (1991). Se realizaron siete muestreos de materia seca a partir de la primera hoja trifoliada, de diez plantas al azar por parcela; las plantas se llevaron a peso constante en una estufa de secado.

Con los días de inicio y fin de cada una de las etapas de desarrollo, se elaboraron gráficas fenológicas de cada variedad y con los valores de peso seco se construyeron gráficas de acumulación de materia seca de las variedades durante el ciclo biológico. Así mismo, con los valores de materia seca y el número de días transcurridos entre una fase y la siguiente, se calcularon las tasas de producción de materia seca ($gdía^{-1}m^{-2}$) para siete periodos consecutivos, para cada una de las tres variedades. Las tasas de crecimiento se calcularon según White 1991; Kohashi-Shibata 1996; Escalante & Kohashi-Shibata 1993. Se practicaron análisis de varianza para las variables cuantitativas y comparaciones entre promedios utilizando la Diferencia Mínima Significativa (DMS).

Resultados y discusión

Etapas de desarrollo

Los tres cultivares de diferente hábito de crecimiento registraron un ciclo biológico similar. El cultivar “Peruano Mostaza” de hábito tipo I, registró el mayor tiempo, 93 días de siembra a madurez; “Palomo”, 88 días y “Azufrado Tapatío”, 90 días (Figura 1). Por el hábito de crecimiento de las variedades, se esperaba un comportamiento en duración del ciclo biológico de menor a mayor en el orden de “Peruano Mostaza”, “Palomo”

mulation elaborated for each variety during its life-cycle. Also, based on the values for dry matter and the number of days elapsed between one state and the next, dry matter production rates of ($gday^{-1}m^{-2}$) were calculated for seven consecutive periods for each variety. Growth rates were calculated following White 1991, Kohashi-Shibata 1996, and Escalante & Kohashi-Shibata 1993. Analyses of variance were performed for the quantitative variables with comparisons of means to determine Least Significant Differences (LSD).

Results and Discussion

Developmental stages

Although the three cultivars had different growth habits, their life-cycles were similar. “Peruano Mostaza” –habit type I– had the longest time from sowing to maturity, 93 days; while the varieties “Palomo” and “Azufrado Tapatío” had 88 and 90 days, respectively (Figure 1). With respect to their growth habits we expected to find the following order of life-cycle duration from shortest to longest: “Peruano Mostaza”, “Palomo” and “Azufrado Tapatío” (Lépiz 1983; Fernández *et al.* 1991; Voysest 1991; Rosales *et al.* 2004). According to Lépiz (1983), and based on the mean of more than six varieties by habit type from the area of Tepatitlán, Jalisco, days to physiological maturity for the three habits should be: 88, 100 and 100, respectively. In the present study, “Peruano Mostaza” –habit type I– showed the largest number of days to physiological maturity.

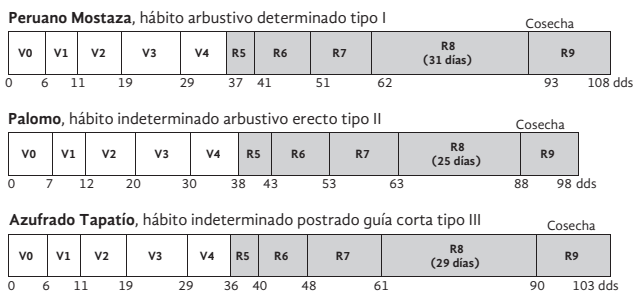


Figura 1. Etapas de desarrollo de las variedades de frijol expresadas de manera gráfica en número de días después de la siembra (dds). V0, germinación; emergencia (V1); hojas primarias (V2); primera hoja trifoliada (V3); tercera hoja trifoliada (V4); prefloración (R5); floración (R6); formación de vainas (R7); llenado de vainas (R8) y madurez fisiológica (R9).

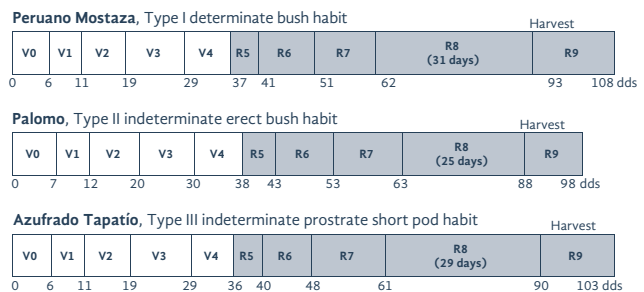


Figure 1. Developmental stages of three bean varieties expressed graphically by number of days after sowing (dds); germination (V0); sprouting (V1); primary leaves (V2); first trifoliolate leaf (V3); third trifoliolate leaf (V4); pre-flowering (R5); flowering (R6); pod-formation (R7); pod-filling (R8), and physiological maturity (R9).

y “Azufrado Tapatío” (Lépiz 1983; Fernández *et al.* 1991; Voysest 1991; Rosales *et al.* 2004). De acuerdo con Lépiz (1983) y con base al promedio de más de seis variedades por tipo de hábito y para el área de Tepatlán, Jalisco, los días a madurez fisiológica para los tres hábitos, debería ser de 88, 100 y 100. En este trabajo “Peruano Mostaza” de hábito tipo I registró el mayor número de días a madurez fisiológica.

El resultado sugiere que dentro del hábito de crecimiento tipo I hay variabilidad genética en cuanto a ciclo vegetativo y que es posible seleccionar y desarrollar cultivares con mayor ciclo vegetativo, con mayor tiempo para realizar fotosíntesis, factor que puede incrementar el rendimiento de materia seca y de grano (Laing *et al.* 1984, citados por White & Izquierdo 1991). Esta posibilidad se pone de manifiesto en “Peruano Mostaza”, de hábito determinado, con mayor ciclo en relación a las variedades tradicionales de hábito I como “Canario 107” y “Bayomex”, cultivares con 36 días a floración y 85 días a madurez fisiológica (Lépiz 1983; Alemán-Martínez *et al.* 1996).

Los resultados mostraron también que el tiempo en alcanzar alguna etapa de desarrollo fenológico, fue diferente entre variedades (Figura 1). “Palomo”, registró un retraso en su desarrollo vegetativo, alcanzado la floración en 43 días, dos días después de “Azufrado Tapatío”; en la etapa de llenado de vainas, “Palomo” requirió solo de 25 días, alcanzando la etapa R9 en solo 88 días. En la misma etapa de llenado de vainas, “Peruano Mostaza” y “Azufrado Tapatío”, necesitaron de 31 y 29 días respectivamente, incrementando así el tiempo a madurez fisiológica; ambos de hábito de crecimiento diferente, mostraron un comportamiento fenológico similar.

En relación al efecto del medio ambiente sobre el comportamiento fenológico de las variedades de frijol utilizadas, se puede afirmar que en el estudio presente los factores ambientales (tipo y calidad de suelo, elementos del clima, fotoperiodo), tuvieron un efecto similar sobre la duración de las etapas de desarrollo. La afirmación se basa en que las tres variedades se sembraron en el mismo sitio, el mismo día y con un manejo agronómico uniforme, donde las variaciones

This result suggests that there is genetic variability in the vegetative cycle of growth habit type I, and that it is possible to select and develop cultivars with longer vegetative cycles that will have more time to carry out photosynthesis; a factor that could increase dry matter production and grain yields (Laing *et al.* 1984, cited in White & Izquierdo 1991). This possibility was observed in “Peruano Mostaza” (determinate habit), for it had a longer cycle than such traditional habit I varieties as “Canario 107” and “Bayomex”, cultivars with 36 days to flowering and 85 to physiological maturity (Lépiz 1983; Alemán-Martínez *et al.* 1996).

These findings also show that the time required to reach a particular stage of phenological development differed among varieties (Figure 1). “Palomo” showed a delay in vegetative development as it reached flowering in 43 days, two days later than “Azufrado Tapatío”; while for the pod-filling stage “Palomo” needed only 25 days, and reached stage R9 in just 88 days. In contrast, “Peruano Mostaza” and “Azufrado Tapatío” needed 31 and 29 days, respectively, to reach the pod-filling stage and, therefore, took longer to achieve physiological maturity. Despite their different growth habits, these two varieties showed similar phenological behavior.

In relation to environmental effects on the phenological behavior of the beans varieties studied, it is clear that environmental factors (soil type and quality, climatic elements, photoperiod) had similar effects on the duration of the developmental stages. This affirmation is based on the fact that all three varieties were sown at the same site on the same day and cared for with uniform agronomic management practices to ensure that any environmental variations that occurred during the growing season would affect all three genotypes equally.

Total dry matter

In the seven developmental stages that were quantified, the dry matter content at the onset of each stage showed significant differences among varieties, except for the pod-filling stage (Table 1). Differences were highly significant in the flowering and physiological maturity stages. The coefficients of variation ranged from 2.19-

Cuadro 1. Parámetros estadísticos de los análisis de varianza del contenido de materia seca (g10pl^{-1}) en variedades de frijol, registrado al inicio de las etapas de desarrollo a partir de la primera hoja trifoliada (V3).

Etapas de desarrollo	Cuadro Medio	Valor de F	Probabilidad Error	Coefficiente Variación (%)
Primera hoja trifoliada (V3)	53.30	11.68	0.0214*	6.66
Tercera hoja trifoliada (V4)	130.58	8.45	0.0366*	6.03
Prefloración (R5)	3681.08	9.04	0.0328*	14.90
Etapas de floración (R6)	4462.61	151.98	0.0002**	3.18
Formación de vainas (R7)	3810.56	10.68	0.0249*	8.56
Llenado de vainas (R8)	1863.77	1.15	0.4038	13.12
Madurez fisiológica (R9)	2058.70	34.84	0.0029**	2.19

* Diferencias significativas al 5% de probabilidad de error ($P \leq 0.05$).

** Diferencias altamente significativas al 0.01% de probabilidad de error ($P \leq 0.01$).

ambientales que pudieron ocurrir durante la estación de crecimiento, afectaron por igual a los tres genotipos.

Materia seca total

En las siete etapas de desarrollo en que se cuantificó el contenido de materia seca al inicio de cada estadio, se encontraron diferencias significativas entre las variedades, excepto en la etapa de llenado de vainas (Cuadro 1). Las diferencias fueron altamente significativas en las etapas de Floración y madurez fisiológica. Los coeficientes de variación estuvieron en el rango de 2.19 a 14.90 %, por lo que el trabajo de estimación del contenido de materia seca en cada una de las etapas de desarrollo de las variedades de frijol estudiadas, se considera aceptable. Los promedios de materia seca producida en cada una de las siete etapas de desarrollo y la comparación estadística entre variedades (Cuadro 2), muestran que en las primeras tres etapas fenológicas (V3, V4 y R5), “Peruano Mostaza” registró mayor acumulación de biomasa. En las etapas R6 y R7, “Palomo” incrementó significativamente el peso seco en relación a las otras dos variedades. En la etapa fenológica de R8 (llenado de vainas), las tres variedades registraron pesos iguales y finalmente en madurez fisiológica (R9), “Peruano Mostaza” y “Azufrado Tapatío”, superaron en producción de materia seca a la variedad “Palomo”. En las etapas intermedias “Peruano Mostaza” mostró

Table 1. Statistical parameters of the analysis of variance of dry matter content (g10pl^{-1}) in bean varieties recorded at the onset of developmental stages from the first trifoliolate leaf (V3).

Developmental stages	Average chart	F value	Probability of error	Coefficient of variation (%)
First trifoliolate leaf (V3)	53.30	11.68	0.0214*	6.66
Third trifoliolate leaf (V4)	130.58	8.45	0.0366*	6.03
Pre-flowering (R5)	3681.08	9.04	0.0328*	14.90
Flowering (R6)	4462.61	151.98	0.0002**	3.18
Pod-formation (R7)	3810.56	10.68	0.0249*	8.56
Pod-filling (R8)	1863.77	1.15	0.4038	13.12
Physiological maturity (R9)	2058.70	34.84	0.0029**	2.19

* Significant differences at 5% of probability of error ($P \leq 0.05$).

** Highly significant differences at 0.01% of probability of error ($P \leq 0.01$).

14.90%, so the estimates of dry matter content in each developmental stage of the bean varieties studied are considered acceptable. The mean dry matter produced in each one of the seven developmental stages and the statistical comparison of the varieties (Table 2) show that in the first three phenological stages (V3, V4, R5), “Peruano Mostaza” had the largest accumulation of biomass. In stages R6 and R7, the dry weight of “Palomo” increased significantly in relation to the other two varieties, while in phenological stage R8 (pod-filling) the three varieties had equal weights. Finally, in the stage of physiological maturity (R9), “Peruano Mostaza” and “Azufrado Tapatío” surpassed “Palomo” in dry matter production. In the intermediate stages, “Peruano Mostaza” showed a lower than expected value for damage due to *Alternaria* spp., a fungal disease that causes premature falling of the lower leaves.

Figure 2 presents a graphic representation of the results of dry matter accumulation by variety for each phenological stage sampled. This graph shows the generally-expected behavior; i.e., slow growth from V3-to-V4; active growth from R5-to-R8; and a decrease in biomass accumulation from R8-to-R9, except in “Peruano Mostaza”. These results agree with those from White & Izquierdo (1991), Kohashi-Shibata (1991) and Silva *et al.* (2005), since the dynamic of dry mat-

Cuadro 2. Contenido de materia seca (g10pl⁻¹) y comparación de promedios por etapas de desarrollo entre variedades de frijol.

Etapas fenológicas	Peruano Mostaza	Palomo	Azufrado Tapatío	Media	DMS 0.05
Primera hoja trifoliada (V3)*	36.70 (a)	28.43 (b)	31.13 (b)	32.09	4.84
Tercera hoja trifoliada (V4)*	72.07 (a)	58.90 (b)	64.73 (ab)	65.23	8.91
Prefloración (R5)*	172.8 (a)	130.0 (ab)	103.4 (b)	135.42	45.74
Etapas de floración (R6)**	198.7 (b)	214.5 (a)	141.9 (c)	185.00	12.28
Formación de vainas (R7)*	210.7 (b)	260.3 (a)	191.1 (b)	220.68	42.82
Llenado de vainas (R8)	278.4 (a)	323.0 (a)	320.1 (a)	307.16	91.37
Madurez fisiológica (R9)	361.9 (a)	321.8 (b)	371.0 (a)	351.58	17.43

* Diferencias significativas al 5% de probabilidad de error ($P \leq 0.05$).

** Diferencias altamente significativas al 0.01% de probabilidad de error ($P \leq 0.01$).

Medias con letras iguales en cada fila, no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05).

Table 2. Dry matter content (g10pl⁻¹) and comparison of means by developmental stages among bean varieties.

Phenological stages	Peruano Mostaza	Palomo	Azufrado Tapatío	Mean	DMS 0.05
First trifoliolate leaf (V3)*	36.70 (a)	28.43 (b)	31.13 (b)	32.09	4.84
Third trifoliolate leaf (V4)*	72.07 (a)	58.90 (b)	64.73 (ab)	65.23	8.91
Pre-flowering (R5)*	172.8 (a)	130.0 (ab)	103.4 (b)	135.42	45.74
Flowering (R6)**	198.7 (b)	214.5 (a)	141.9 (c)	185.00	12.28
Pod-formation (R7)*	210.7 (b)	260.3 (a)	191.1 (b)	220.68	42.82
Pod-filling (R8)	278.4 (a)	323.0 (a)	320.1 (a)	307.16	91.37
Physiological maturity (R9)	361.9 (a)	321.8 (b)	371.0 (a)	351.58	17.43

* Significant differences at 5% of probability of error ($P \leq 0.05$).

** Highly significant differences at 0.01% of probability of error ($P \leq 0.01$).

Means with the same letters in each row are not statistically different (DMS, 0.05).

un valor menor a lo esperado por daño de *Alternaria* spp., enfermedad fungosa que ocasionó una caída prematura de las hojas inferiores.

Por su parte, la Figura 2 presenta de manera gráfica los resultados de materia seca acumulada por variedad en cada una de las etapas fenológicas muestreadas. La gráfica muestra el comportamiento general esperado: de V3 a V4, un crecimiento lento; de R5 a R8, un crecimiento activo; de R8 a R9, una reducción en la acumulación de biomasa, excepto en “Peruano Mostaza”. El resultado obtenido concuerda con lo consignado por White & Izquierdo (1991), Kohashi-Shibata (1991) y Silva *et al.* (2005), ya que la dinámica de acumulación de materia seca durante el desarrollo de una planta, sigue una tendencia similar a la curva clásica de crecimiento sigmoideal.

Los resultados muestran también el rápido establecimiento y producción acelerada de materia seca de “Peruano Mostaza”; se enfatiza este resultado, puesto que la literatura señala que un rá-

ter accumulation during plant development follows a tendency similar to the classic curve of sigmoidal growth.

These findings also reveal the rapid establishment and accelerated production of dry matter by “Peruano Mostaza”. We emphasize this result because the literature affirms that rapid crop establishment translates into increased biomass and, eventually, the production of photosynthates and grain yields (Adams 1973; White & Izquierdo 1991). Despite the fact that “Peruano Mostaza” had lower values in stages R6, R7 and R8 due to foliar damage caused by the fungal disease *Alternaria* spp., in the end (R9) the production of biomass by this variety of determinate habit surpassed “Palomo” and equaled “Azufrado Tapatío”.

The behavior of “Palomo” –indeterminate erect habit type II– also presented an interesting dynamic. It began its cycle with low dry matter production, showed a significant increase in

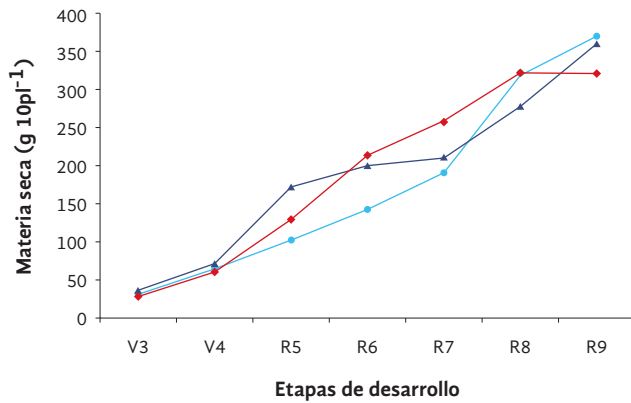


Figura 2. Acumulación de materia seca de variedades de frijol en siete etapas de desarrollo. ▲ Peruano Mostaza, ◆ Palomo y ● Azufrado Tapatío.

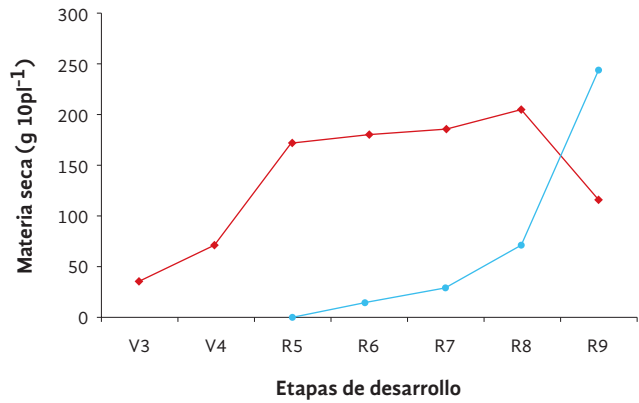


Figura 3. Acumulación de materia seca en órganos vegetativos (◆) y reproductivos (●) de la variedad de frijol Peruano Mostaza, en siete etapas de desarrollo.

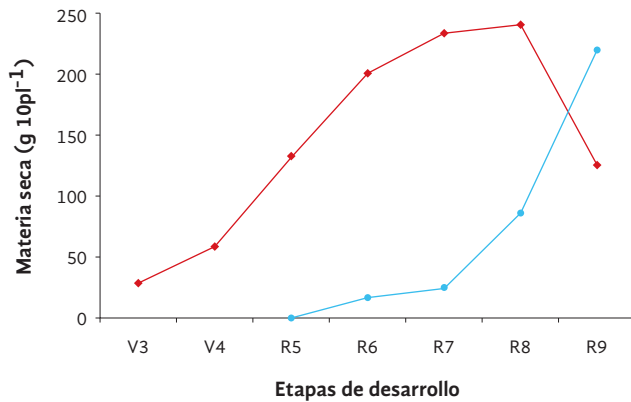


Figura 4. Acumulación de materia seca en órganos vegetativos (◆) y reproductivos (●) de la variedad de frijol Palomo, en siete etapas de desarrollo.

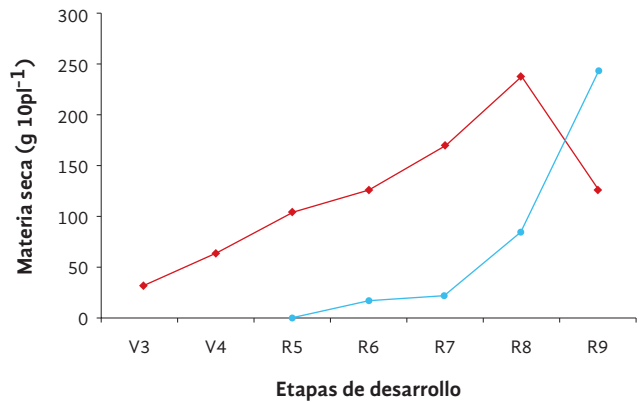


Figura 5. Acumulación de materia seca en órganos vegetativos (◆) y reproductivos (●) de la variedad de frijol Azufrado Tapatío, en siete etapas de desarrollo.

pedido establecimiento del cultivo se traducirá en un incremento de la biomasa y eventualmente en la producción de fotosintatos y rendimiento de grano (Adams 1973; White & Izquierdo 1991). Esta variedad de hábito determinado que registró valores menores en las etapas R6, R7 y R8 por daño foliar de la enfermedad fungosa *Alternaria* spp., al final (R9) fue superior en producción de biomasa a “Palomo” e igual a la variedad “Azufrado Tapatío”.

El comportamiento de “Palomo”, variedad de hábito indeterminado erecto tipo II, también ofrece una dinámica de interés. Inició su ciclo con una producción baja de materia seca, en las etapas R6 y R7 mostró un incremento significativo y en la etapa de madurez (R9), redujo la producción de biomasa de manera importante (Cuadro 2 y Figura 2). La producción significa-

stages R6 and R7, and then significantly reduced biomass production in the stage of maturity (R9) (Table 2, Figure 2). The significantly lower production of dry matter by “Palomo” at the end of the cycle could be explained by less photosynthesis time between pod-filling and physiological maturity (25 days), and by the senescence and premature loss of leaves in the variety (Adams 1973; White & Izquierdo 1991).

Finally, “Azufrado Tapatío” –indeterminate prostrate habit type III– showed relatively slow dry weight accumulation up to flowering (R6), but increased production in the three final stages until it was statistically equal to “Peruano Mostaza”. Because of its indeterminate prostrate habit, short pod, and greater potential for biomass production (branches, leaves), it was expected to show greater dry matter accumulation com-

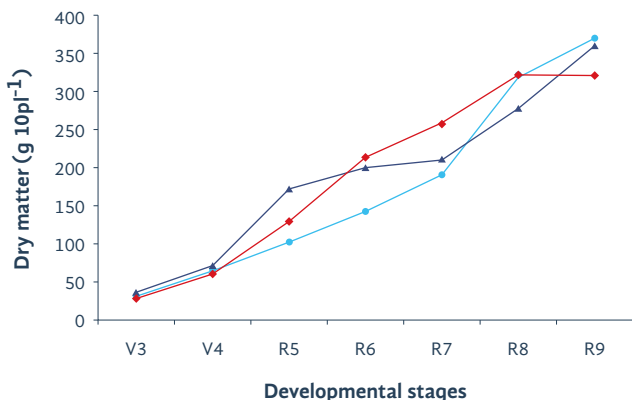


Figure 2. Accumulation of dry matter of bean varieties in seven developmental stages. ▲ Peruano Mostaza, ◆ Palomo y ● Azufrado Tapatío.

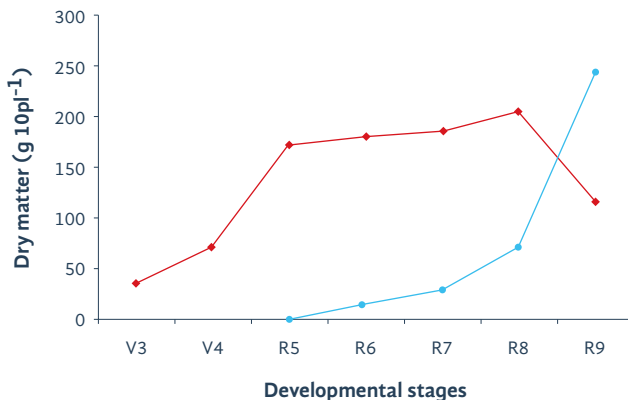


Figure 3. Accumulation of dry matter in the vegetative (◆) and reproductive (●) organs from the bean variety Peruano Mostaza, in seven developmental stages.

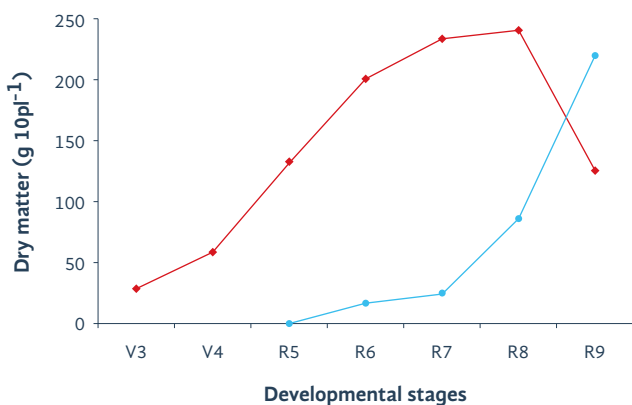


Figure 4. Dry matter accumulation in the vegetative (◆) and reproductive (●) organs from the bean variety Palomo, in seven developmental stages.

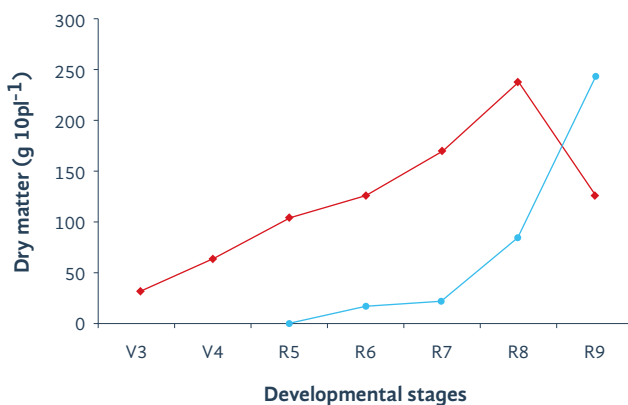


Figure 5. Dry matter accumulation in the vegetative (◆) and reproductive (●) organs from the bean variety Azufrado Tapatío, in seven developmental stages.

tivamente menor de materia seca de “Palomo” al final del ciclo, podría explicarse por su menor tiempo de fotosíntesis entre llenado de vainas y madurez fisiológica (25 días) y por la senescencia y caída adelantada de las hojas en esta variedad (Adams 1973; White & Izquierdo 1991).

Finalmente “Azufrado Tapatío” de hábito indeterminado postrado tipo III, presentó una acumulación de peso seco relativamente lenta hasta la floración (R6) e incrementó su producción en las tres etapas finales, resultando estadísticamente igual a “Peruano Mostaza”. Por su hábito indeterminado postrado guía corta y mayor potencial de producción de biomasa (ramas, hojas), se esperaba una mayor acumulación de materia seca en relación a los otros dos cultivares. El resultado podría explicarse por la igualdad del ciclo biológico entre “Peruano Mostaza” y “Azu-

pared to the other two crops. This result could be explained by the similarity in the life-cycles of “Peruano Mostaza” and “Azufrado Tapatío”, cultivars that had the same opportunity to produce biomass and accumulate photoassimilates. The similarity of the life-cycles of two materials with different growth habits may be due to the effect of the selection performed by the plant breeders, which has extended the life-cycle of generally precocious varieties of determinate habit like “Peruano Mostaza”, while shortening that of the usually longer indeterminate prostrate habit varieties like “Azufrado Tapatío” (López 1983; Fernández *et al.* 1991; Rosales *et al.* 2004) in order to adjust their life-cycles to the existing growth season.

frado Tapatío”, cultivares que tuvieron la misma oportunidad para producir biomasa y de acumular fotoasimilados. La igualdad de ciclo biológico entre dos materiales de diferente hábito de crecimiento, podría deberse al efecto de la selección practicada por los fitomejoradores, donde a las variedades de hábito determinado como “Peruano Mostaza” generalmente precoces, se les ha alargado el ciclo y a las de hábito indeterminado postrado como “Azufrado Tapatío” generalmente más tardías (Lépiz 1983; Fernández *et al.* 1991; Rosales *et al.* 2004), se les ha acortado, para ajustar su ciclo a la estación de crecimiento existente.

Crecimiento vegetativo y reproductivo

A partir de la etapa de floración (R6), el peso seco total de las variedades se desagregó en la parte vegetativa (hojas, tallos, ramas y raíces) y reproductiva (botones, flores y vainas) (Figuras 3, 4 y 5). En las tres variedades se observó un incremento en el peso seco de la parte vegetativa hasta la fase de llenado de vaina (R8). Posteriormente, de llenado de vainas a madurez fisiológica como era de esperarse, las tres variedades presentaron un marcado descenso (White & Izquierdo, 1991; Silva *et al.*, 2005). La declinación del peso seco de la parte vegetativa, tiene dos componentes principales: a) la translocación de fotoasimilados esencialmente de las hojas, a las estructuras reproductivas representadas por vainas y semillas; b) la senescencia y caída gradual principalmente de hojas al acercarse la madurez fisiológica (Kohashi-Shibata, 1991).

Por su parte, el peso seco de las estructuras reproductivas de las tres variedades, mostró dos etapas marcadas: entre prefloración (R5) y formación de vainas (R7), hubo un crecimiento moderado; entre las fases de formación de vainas (R7) a madurez fisiológica (R9), el incremento en peso seco de la parte reproductiva, fue muy pronunciado. Los resultados obtenidos al desagregar el peso seco de las estructuras vegetativas y reproductivas, son similares a lo reportado por White & Izquierdo (1991), Kohashi-Shibata (1991) y Silva *et al.*, (2005).

Tasa de crecimiento

Las tasa de crecimiento ($\text{gdía}^{-1}\text{m}^{-2}$) en seis periodos consecutivos medidos entre el inicio de

Vegetative and reproductive growth

Beginning with the flowering stage (R6), the total dry weight from the varieties was disaggregated into its vegetative (leaves, stems, branches and roots) and reproductive (blossoms, flowers and pods) parts (Figures 3, 4, 5). Up to the pod-filling state (R8) all three varieties showed increases in the dry weight of the vegetative part. Later, from pod-filling to physiological maturity, as expected, all three presented a marked decrease (White & Izquierdo, 1991; Silva *et al.*, 2005). The reduction of the dry weight of the vegetative part depends on two main components: a) the translocation of photoassimilates essentially from the leaves to the reproductive structures represented by pods and seeds; and, b) the senescence and gradual loss, primarily of leaves, upon approaching physiological maturity (Kohashi-Shibata, 1991).

Turning to the dry weight of the reproductive structures of the three varieties, the study determined two marked stages: from pre-flowering (R5) to pod-formation (R7) growth was moderate; but between the phases of pod-formation (R7) and physiological maturity (R9) the increase in dry weight of the reproductive part was very pronounced. The results obtained upon disaggregating the dry weight of the vegetative and reproductive structures are similar to those reported by White & Izquierdo (1991), Kohashi-Shibata (1991) and Silva *et al.* (2005).

Growth rates

The growth rates ($\text{gday}^{-1}\text{m}^{-2}$) in six consecutive periods measured from the onset of one developmental stage to the beginning of the next one showed marked differences in dry matter production between the developmental stages of the varieties, but not among genotypes in the same period (Figure 6). The highest values for growth rate were recorded in the intermediate periods V4-R5, R5-R6, R6-R7, and R7-R8, when bean growth was most active (Figure 6). The growth rates by period show a relation to dry matter content (g10pl^{-1}) per developmental stage among these bean varieties (Table 2) and clearly reveal their periods of greatest photosynthetic activity. This information reveals the critical stages during which these bean cultivars

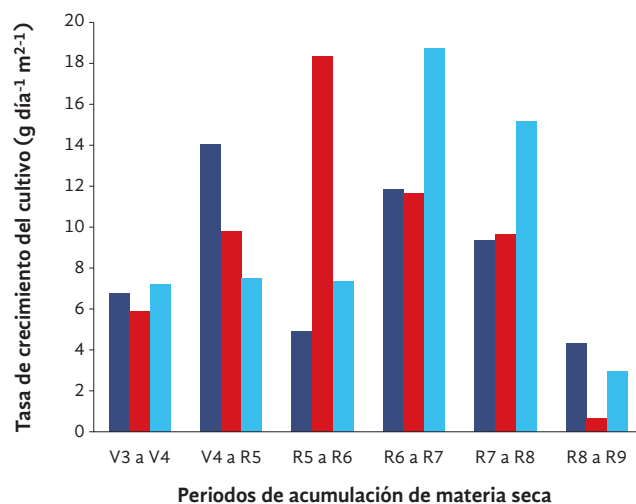


Figura 6. Tasa de crecimiento ($\text{g día}^{-1} \text{m}^{2-1}$) durante seis etapas de desarrollo fenológico, en las variedades de frijol Peruano Mostaza (■), Palomo (■) y Azufrado Tapatío (■).

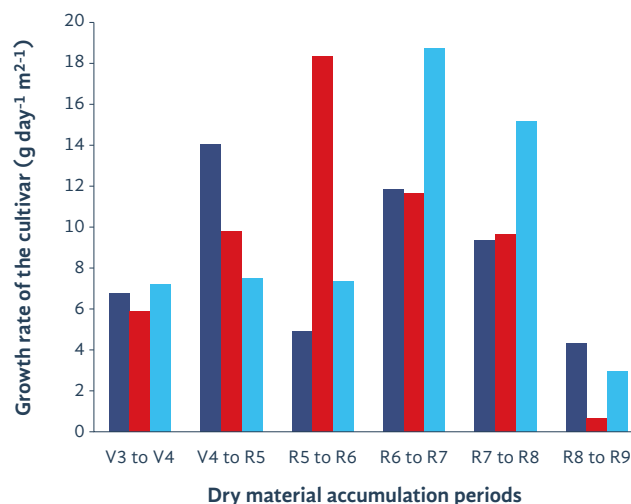


Figure 6. Growth rates ($\text{g day}^{-1} \text{m}^{2-1}$) during six stages of phenological development in the bean varieties Peruano Mostaza (■), Palomo (■) and Azufrado Tapatío (■).

una etapa de desarrollo y la siguiente, mostraron diferencias marcadas en la producción de materia seca entre etapas de desarrollo de las variedades, no así entre genotipos en un mismo periodo (Figura 6). Los mayores valores de tasa de crecimiento se registraron en los periodos intermedios V4 a R5, R5 a R6, R6 a R7 y R7 a R8, periodos donde el crecimiento del frijol fue más activo (Figura 6). Las tasas de crecimiento por periodo, muestran relación con el contenido de materia seca ($\text{g}10\text{pl}^{-1}$) por etapas de desarrollo entre variedades de frijol (Cuadro 2) y exponen de manera clara los periodos de mayor actividad fotosintética de las variedades utilizadas. Esta información pone de manifiesto las etapas críticas donde los cultivares de frijol deben disponer de los elementos necesarios para su crecimiento y desarrollo óptimos, tales como agua, nutrimentos, ausencia de daño de plagas y factores favorables del clima.

Al observar el comportamiento de las variedades, se aprecian ciertas tendencias en las tasas de acumulación de materia seca (Figura 6). “Peruano Mostaza” mostró una mayor tasa de crecimiento en sus primeras etapas, con mayor valor en el periodo V4 a R4 ($13.86 \text{ g día}^{-1} \text{m}^{2-1}$); “Palomo” registró su valor mayor en etapas intermedias, registrando su mayor tasa entre R5 a R6 ($18.26 \text{ g día}^{-1} \text{m}^{2-1}$) y “Azufrado Tapatío” en los periodos finales, con mayor valor de R6 a R7 ($18.62 \text{ g día}^{-1} \text{m}^{2-1}$). Las tasas máximas de

must have access to the elements necessary for optimal growth and development, including water, nutrients, freedom from damage by plagues, and favorable climatic conditions.

Upon observing the behavior of these varieties, certain tendencies in the rates of dry matter accumulation can be appreciated (Figure 6). “Peruano Mostaza” showed a higher growth rate in initial stages, attaining its highest value in the period V4-R4 ($13.86 \text{ g day}^{-1} \text{m}^{2-1}$). “Palomo” registered its highest value in the intermediate stages with its maximum rate from R5-R6 ($18.26 \text{ g day}^{-1} \text{m}^{2-1}$). Finally, “Azufrado Tapatío” grew more rapidly in the final periods, with a maximum value from R6-R7 ($18.62 \text{ g day}^{-1} \text{m}^{2-1}$). The maximum growth rates obtained are similar to those reported for beans in the literature; *i.e.*, from $16-18 \text{ g day}^{-1} \text{m}^{2-1}$ (White & Izquierdo, 1991).

Conclusions

Though the bean varieties “Peruano Mostaza”, “Palomo” and “Azufrado Tapatío” have different growth habits they showed a similar life-cycle of 88-to-93 days after planting, but differences in terms of reaching some developmental stages. In terms of total dry matter accumulation, these varieties showed slow growth up to the stage of the third trifoliolate leaf, accelerated growth be-

crecimiento obtenidas, son similares a las reportadas para frijol en la literatura, de entre 16 y 18 $\text{gdía}^{-1}\text{m}^{2-1}$ (White & Izquierdo, 1991).

Conclusiones

Las variedades de frijol “Peruano Mostaza”, “Palomo” y “Azufrado Tapatío” de hábito de crecimiento diferente, mostraron un ciclo biológico similar, entre 88 y 93 días después de la siembra y diferencias entre sí, para alcanzar algunas etapas de desarrollo. En acumulación de materia seca total, las variedades mostraron un crecimiento lento hasta la etapa de tercera hoja trifoliada, un crecimiento acelerado entre prefloración y llenado de vainas y un descenso al final del ciclo. Las variedades mostraron un incremento de peso seco en las estructuras vegetativas hasta llenado de vaina y un descenso marcado en madurez fisiológica. Las estructuras reproductivas presentaron un crecimiento moderado hasta formación de vainas y una acumulación acelerada entre formación de vainas y madurez fisiológica. En tasa de acumulación de materia seca “Peruano Mostaza” registró mayor producción de biomasa en las etapas de desarrollo iniciales, “Palomo” en etapas intermedias y “Azufrado Tapatío” en las etapas fenológicas finales. ❖

tween pre-flowering and pod-filling, and a decrease at the end of the cycle. They also showed an increase in the dry weight of the vegetative structures up to pod-filling, with a marked decrease at physiological maturity. The reproductive structures presented moderate growth up to pod-formation with an accelerated accumulation between pod-formation and physiological maturity. With respect to the rates of dry matter accumulation, “Peruano Mostaza” had the highest production of biomass in the initial stages of development, “Palomo” in the intermediate stages, and “Azufrado Tapatío” in the final phenological stages. ❖

Literatura citada | Literature cited

- ADAMS, M.W. 1973.** Plant architecture and physiological efficiency in the field bean. In: CIAT (Ed.). *Potentials of field beans and other food legumes in Latin America*. CIAT, Cali, Colombia. Series Seminars No. 2E. p. 266–278.
- ARAÚJO, J.R., M.A. PATTO, A.T. BRUZI & A.F. BARBOSA. (JUL/AGO) 2009.** Dry matter accumulation in genotypes of bean submitted to different levels of nitrogen. *Ciência e Agrotecnologia Lavras* 33(4): 985–992. [ISSN 1413-7054]
- ALEMÁN-MARTÍNEZ, V., S. NÚÑEZ, H. FLORES, P. ALEMÁN & J.J. ACEVES. 1996.** *Guía para producir frijol en los altos y centro de Jalisco*. Agenda Técnica No. 2. Campo Experimental Altos de Jalisco. INIFAP. Tepatitlán, Jalisco, México. 36 p. [ISBN 978-607-8336-60-9]
- ELÍAS, C.F. & F. CASTELLVÍ. 1996.** *Agrometeorología*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Departamento de Medio Ambiente y Ciencias del Suelo (DMACS). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria (ETSEA). Universidad de Lleida (UdL). España. 517 p. [ISBN: 84-7114-973-7]
- ESCALANTE, E.J.A. & J. KOHASHI-SHIBATA. 1993.** *El rendimiento y crecimiento del frijol. Manual para toma de datos*. Centro de Botánica. C.P. Montecillo, Estado de México. 84 p. [ISBN: 978-968-884-41-20]
- FEHR, W., C. CAVINESS, D. BURMOOD & J. PENNINGTON. 1971.** Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*. 11, 929–931. [ISSN (print) 1435-0653; (Online) 0011-183X]
- FERNÁNDEZ, F., P. GEPTS & M. LÓPEZ. 1991.** *Etapas de desarrollo de la planta de Frijol*. En: López, M., F. Fernández y A. Schoonhoven (eds). *Frijol: Investigación y Producción*. CIAT, Cali, Colombia. p. 61–78. [ISBN: 84-89206-54-6]
- GALINDO, P.J.R. & J. CLAVIJO. 2009.** Fenología del cultivo de arveja (*Pisum sativum* L. var. Santa Isabel) en la sabana de Bogotá en campo abierto y bajo cubierta plástica. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 10(1): 5–15. [ISSN: 0122-8706]
- KOHASHI-SHIBATA, J. 1991.** *Fisiología*. En: Engleman, E. M. (ed). *Contribuciones al Conocimiento del Frijol (Phaseolus)* en México. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p. 39–58. [ISBN 9688390887]
- KOHASHI-SHIBATA, J. 1996.** *Aspectos de la morfología y fisiología del frijol (Phaseolus vulgaris L.) y su relación con el rendimiento*. Instituto de Recursos Naturales. C. P. Montecillo, Estado de México. 42 p. [ISBN (10): 9688391107; (13): 9789688391105]
- LÉPÍZ-ILDEFONSO, R. 1983.** *Origen y descripción botánica*. En: Lépez y Navarro (eds). *Frijol en el Noroeste de México*. Tecnología de Producción. CIAPAN, INIA. Culiacán, Sinaloa, México. p. 29–44. [ISBN: 978-607-425-030-5]
- LÉPÍZ-ILDEFONSO, R., S. SÁNCHEZ, E. LÓPEZ, A. GONZÁLEZ & S. NÚÑEZ. 2007.** *El cultivo de frijol en las regiones centro y sur de Jalisco. Tecnología para altos rendimientos*. Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco, México. 34 p. [ISBN: 970-27-1099-5]
- MEDINA, G., J. A. RUIZ & R. MARTÍNEZ. 1998.** *Los climas de México*. INIFAP-SAGARPA. Guadalajara, Jalisco, México. 108 p. [ISBN: 978-607-425-715-1]
- MEIER, U., H. BLEIHOLDER, L. BUHR, C. FELLER, H. HACK, M. HESS, P.D. LANCASHIRE, U. SCHNOCK, R. STAUSS, T. VAN DEN BOOM, E. WEBER & P. ZWERGER. 2009.** *The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants – history and publications*. *Journal für Kulturpflanzen*, 61 (2). S. 41–52, [ISSN 0027-7479]. Verlag Eugen Ulmer KG, Stuttgart.
- ROSALES-SERNA, R., J.A. ACOSTA, J.S. MURUAGA, J.M. HERNÁNDEZ, G. ESQUIVEL & P. PÉREZ. 2004.** *Varietades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*. INIFAP. Libro Técnico. No. 6. 148 pp. [ISBN: 968-5580-18-9]
- SILVA, V.M.P., M.J.B. ANDRADE, A.R. MORAES, N.M.B. VIEIRA & J. ALVES. 2005.** Dry matter accumulation by common bean cv. BRS MG Talisma. *Bean Improvement Cooperative. Annual Report*. p. 154–155. [ISSN: 0084-7747]
- WHITE, J. W. 1991.** *Conceptos básicos de fisiología de frijol*. En: López M, F Fernández y A Schoonhoven (eds). *Frijol: Investigación y Producción*. CIAT, Cali, Colombia. p. 43–56.
- WHITE, J.W. & J. IZQUIERDO. 1991.** *Physiology of yield potential and Stress Tolerance*. In: van Schoonhoven, A. & O. Voysest (eds). *Common Beans. Research for Crop Improvement*. p. 287–366. [ISBN 958-9183-24-7].

Silenciamiento del gen de la prosistemina

en callos de *Physalis philadelphica*

(Solanaceae)

Silencing of the prosystemin gene in

the calluses of *Physalis philadelphica*

(Solanaceae)

María Fernanda Esparza-Soltero¹, Fernando Santacruz-Ruvalcaba¹, Abel Gutiérrez-Ortega², José Luis Cabrera-Ponce³ y Carla Sánchez-Hernández¹✉

¹Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, La Venta del Astillero, 45221, Zapopan, Jalisco; México.

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato, Laboratorio de Transformación Genética de Plantas, Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León Irapuato 36821, Guanajuato, México.

³Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Biotecnología Médica y Farmacéutica, Av. Normalistas 800 Colinas de La Normal, Guadalajara 44270, Jalisco, México.

✉ shc32289@cucba.udg.mx

Citar

Resumen

Las plantas responden al ataque de los insectos herbívoros mediante la activación de la expresión de genes involucrados en defensa, los cuales ejercen un efecto sobre el desarrollo, reproducción y comportamiento de los insectos herbívoros. La sistemina es un péptido de 18 aminoácidos, sintetizado a partir del extremo C-terminal de una proteína precursora conocida como prosistemina, que promueve en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) la expresión de proteínas relacionadas con defensa cruciales en la resistencia contra insectos herbívoros. El análisis genético de la respuesta a daño en jitomate sugiere que la prosistemina forma parte de una ruta de señalización de defensa que involucra una compleja regulación de la biosíntesis y percepción del ácido jasmónico (AJ). Con el propósito de entender si los mecanismos que regulan la respuesta defensiva en tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam.) corresponden con el modelo de señalización planteado para jitomate, en esta investigación se evaluó la funcionalidad de la prosistemina de tomate de cáscara durante la modulación de respuestas asociadas a AJ. Para ello, se generaron callos transgénicos silenciados en la expresión de la prosistemina, en

los cuales se analizó la expresión de genes marcadores de la ruta de señalización del AJ.

Palabras clave: ácido jasmónico, genes de defensa, prosistemina, Solanaceae, CUCBA.

Abstract

Plants respond to the attacks of herbivorous insects by activating the expression of genes involved in defense, which exert an effect on the development, reproduction and behavior of those insects. Systemin is an 18-amino acid peptide synthesized from the C-terminus of a protein precursor called prosystemin that in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) promotes the expression of defense-related proteins that are crucial in resistance to herbivorous insects. Genetic analyses of the response to damage in tomato suggests that prosystemin forms part of a defense signaling pathway that involves a complex regulation of the biosynthesis and perception of jasmonic acid (JA). In order to determine whether the mechanisms that regulate the defensive response in tomatillo (*Physalis philadelphica* Lam.) correspond to the signaling model posited for tomato, this study evaluated the functionality of the prosystemin in tomatillo during

modulation of responses associated with JA. To this end, silenced transgenic calluses were generated in the expression of prosystemin, in which the expression of marker genes of the signaling pathway of JA was analyzed.

Key words: jasmonic acid, defense genes, prosystemin, Solanaceae, CUCBA.

Introducción

Las plantas responden al ataque de los insectos herbívoros mediante la activación de la expresión de genes involucrados en defensa. Estos genes tienen un efecto sobre el desarrollo, reproducción y comportamiento de los insectos herbívoros y/o de sus enemigos naturales, que permite contrarrestar los efectos negativos de dicha interacción (War *et al.* 2012). La defensa sistémica requiere de un sistema de reconocimiento del agresor en el sitio de daño, que a su vez active una vía de transducción de señales capaz de generar, transportar e interpretar señales de alarma para modular a distancia una respuesta de defensa.

Hace más de 20 años, se descubrió en “jitomate” (*Solanum lycopersicum*) la primera hormona peptídica en plantas involucrada en la regulación de una respuesta defensiva (Pearce *et al.* 1991). La sistemina es un péptido de 18 aminoácidos que promueve la expresión de inhibidores de proteasas y emisión de compuestos volátiles, cruciales para la resistencia contra Lepidópteros (Ryan 2000). Este péptido se sintetiza a partir del extremo C-terminal de una proteína precursora de 200 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 23kDa, conocida como prosistemina (Pearce *et al.* 1991). El análisis genético de la respuesta a daño en jitomate sugiere que la prosistemina y la sistemina son elementos de una ruta de señalización de defensa que involucra una compleja regulación de la biosíntesis y percepción del ácido jasmónico (AJ) en la célula (Li *et al.* 2001; Pearce & Ryan 2003). La interacción de la sistemina con su receptor en membrana da origen a una compleja cascada de eventos intracelulares, tales como la apertura de

Introduction

Plants respond to the attacks of herbivorous insects by activating the expression of genes involved in defense. These genes exert an effect on the development, reproduction and behavior of herbivorous insects and/or their natural enemies that makes it possible to counteract the negative effects of that interaction (War *et al.* 2012). Systemic defense requires a system that recognizes the aggressor at the damage site and, in turn, activates a signal transduction pathway that is able to generate, transport and interpret alarm signals to remotely modulate a defense response.

Over 20 years ago, studies of “tomato” (*Solanum lycopersicum*) discovered the first peptide hormone in plants that is involved in regulating a defensive response (Pearce *et al.* 1991). Systemin is an 18-amino acid peptide that promotes the expression of protease inhibitors and the emission of volatile compounds that are crucial in resistance against Lepidoptera (Ryan 2000). This peptide is synthesized from the C-terminus of a pre-cursor, 200-amino acid protein with an approximate molecular weight of 23kDa, called prosystemin (Pearce *et al.* 1991). Genetic analyses of the response to damage in tomatoes suggest that prosystemin and systemin are elements of a defensive signaling pathway that involves a complex regulation of the biosynthesis and perception of jasmonic acid (JA) in the cell (Li *et al.* 2001; Pearce & Ryan 2003). Interaction of systemin with its receptor in the membrane produces a complex cascade of intracellular events, including the aperture of ionic channels, changes in the concentration of cytosolic calcium, depolarization of the membrane, and activation of MAP kinases. All these events converge in the

canales iónicos, cambios en la concentración de calcio citosólico, despolarización de membrana y activación de MAP cinasas. Todos estos eventos convergen en la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, la liberación del ácido linoléico y la síntesis del AJ a través de la ruta octadecanoica. Se ha propuesto que la señalización a distancia se transmite mediante una amplificación que se produce a través de la activación de genes que codifican para la síntesis de AJ en el tejido vascular de manera dependiente de sistemina (Schilmiller & Howe 2005). Se han identificado homólogos de la prosistemina de “jitomate” en “papa” (*Solanum tuberosum* L.), “hierba mora” (*S. nigrum* L.) “chile” (*Capsicum annuum* L.) y “tomate de cáscara” (*Physalis philadelphica*). El análisis de las secuencias aminoacídicas reveló una similitud entre el 68–88 % respecto a la de “jitomate” (Constabel *et al.* 1998; Rosales-Campos *et al.* 2008). Al analizar la actividad biológica de los péptidos, se observó que la sistemina de “chile” y “papa”, inducían en jitomate la síntesis de inhibidores de proteasas (Constabel *et al.* 1998).

Los resultados de distintos trabajos resaltan la función de la prosistemina en la regulación de las respuestas defensivas asociadas a herbivoría en “jitomate”. Plantas transgénicas transformadas con el gen de la prosistemina en antisentido mostraron una reducción considerable de las respuestas sistémicas asociadas a defensa y presentaron un incremento en susceptibilidad hacia herbívoros (Orozco-Cardenas *et al.* 1993). Por otro lado, la sobreexpresión del gen de la prosistemina ocasionó una expresión constitutiva de numerosos genes de defensa (McGurl *et al.* 1994) y un aumento en la resistencia a herbívoros (Li *et al.* 2002). Además, se comprobó que mutaciones en la señalización intermediada por prosistemina modificaban la expresión inducida de genes de respuesta a herbivoría (Sun *et al.* 2011). No obstante, en “hierba mora”, Schmidt & Baldwin (2006), al utilizar líneas transgénicas silenciadas en prosistemina demostraron la nula participación de este gen en la regulación de defensas contra insectos herbívoros, reportando niveles similares de inhibidores de proteasas y de AJ, así como el número de herbívoros y porcentaje de daño, entre plantas silenciadas y plantas control (no transformadas).

hydrolysis of phospholipids in the membrane, the release of linolenic acid, and the synthesis of JA through the octadecanoid pathway. It has been suggested that remote signaling is transmitted through an amplification produced by the activation of genes that codify for the synthesis of JA in the vascular tissue in a systemin-dependent manner (Schilmiller & Howe 2005). Homologues of the prosystemin of “tomato” have been identified in the “potato” (*Solanum tuberosum* L.), “nightshade” (*S. nigrum* L.), “chili peppers” (*Capsicum annuum* L.), and “tomatillo” (*Physalis philadelphica*). Analyses of the amino acid sequences revealed a 68–88% similarity with respect to “tomato” (Constabel *et al.* 1998; Rosales-Campos *et al.* 2008). Upon analyzing the biological activity of the peptides, the systemin in “chili peppers” and “potato” was seen to induce synthesis of protease inhibitors in tomato (Constabel *et al.* 1998).

Results from several studies emphasize the function of prosystemin in regulating defensive responses associated with herbivory in “tomato”. Transgenic plants transformed with the prosystemin gene in antisense showed a considerable reduction of the systemic responses associated with defense, and presented increased susceptibility to herbivores (Orozco-Cardenas *et al.* 1993). In addition, the over-expression of the prosystemin gene produced an expression that was constitutive of numerous defense genes (McGurl *et al.* 1994), and an increase in resistance to herbivores (Li *et al.* 2002). Also, it has been proven that mutations in the signaling mediated by prosystemin modified the induced expression of response genes to herbivory (Sun *et al.* 2011). Nonetheless, working with “nightshade” and using transgenic lines silenced in prosystemin, Schmidt & Baldwin (2006) demonstrated the null participation of this gene in the regulation of defenses against herbivorous insects, reporting similar levels of protease inhibitors and JA, as well as the number of herbivores and the percentage of damage, between silenced and control (*i.e.*, non-transformed) plants.

To determine whether the mechanisms that regulate the defensive response in tomatillo correspond to the signaling model posited for “tomato”, this study evaluated the functionality of

Con el objetivo de entender si los mecanismos que regulan la respuesta defensiva en tomate de cáscara corresponden con el modelo de señalización planteado para “jitomate”, en este trabajo se evaluó la funcionalidad de la prosistemina durante la modulación de respuestas asociadas a AJ. Para ello, se generaron callos transgénicos silenciados en la expresión de la prosistemina, en los cuales se analizó la expresión de genes marcadores de la ruta de señalización del AJ.

Materiales y métodos

Material biológico

Para la generación de callos, se germinaron semillas de *Physalis philadelphica* variedad Yoreme, en medio MS (Murashige y Skoog 1962) en cámara de crecimiento con condiciones controladas de fotoperiodo de 16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C. Para la obtención de explantes se utilizaron las hojas cotiledonares; los explantes fueron colocados en medio MS adicionado con ácido naftalenacético (ANA) 1 µM y bencil aminopurina (BAP) 12.5 µM. Para la transformación se utilizó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el plásmido pFGC5941 o pFGC5941SYSFR (Figura 1) crecida en agitación por 48 h en medio YM líquido, adicionado con 50 mg/L de kanamicina y 50 mg/L de rifampicina. Los plásmidos contienen los genes de selección *nptII* (kanamicina) para bacterias y *Bar* (bialafos) para callos, pFGC5941SYSFR contienen además los fragmentos repetidos invertidos de la secuencia de la prosistemina que formará el RNAi (SYSFR).

Para los ensayos con plantas, se germinaron las semillas en musgo descompuesto (Sunshine) y las plántulas trasplantadas a macetas de 350 mL, con una mezcla de musgo descompuesto, perlita (Dicamex) y suelo agrícola en partes iguales. Se mantuvieron las plantas en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo (16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C) hasta llegar a desarrollar 5 a 6 hojas verdaderas.

Transformación vía *Agrobacterium*

La transformación se realizó de acuerdo al protocolo de Assad-García *et al.* (1992). Para ello, se tomaron 50 explantes y se mantuvieron 48 h

prosystemin during modulation of responses associated with JA. To do so, transgenic calluses silenced in the expression of prosystemin were generated, and the expression of marker genes of the JA signaling pathway was analyzed.

Materials and Methods

Biological material

To produce the calluses, seeds of *Physalis philadelphica*, variety Yoreme, were germinated in MS medium (Murashige and Skoog 1962) in a growth chamber under controlled conditions for a photoperiod of 16 h of light at 28°C and 8 h of darkness at 16°C. Cotyledon leaves were used to obtain explants, which were then placed in MS medium with 1 µM of *naphthaleneacetic acid* (ANA) and 12.5 µM of benzyl aminopurine (BAP) added. For the transformation, the study used the LBA4404 strain of *Agrobacterium tumefaciens* transformed with the pFGC5941 or pFGC5941SYSFR plasmid (Figure 1) cultured under agitation for 48 h in liquid YM medium, adding 50 mg/L of kanamycin and 50 mg/L of rifampicin. The plasmids contain *nptII* selection genes (kanamycin) for bacteria and *Bar* (bialaphos) for calluses, while pFGC5941SYSFR contains as well the inverted repeat fragments of the prosystemin sequence that will form RNAi (SYSFR).

For the trials with plants, seeds were germinated in decomposed moss (Sunshine) and the seedlings were transplanted to 350-mL pots with a mixture of equal parts of decomposed moss, perlite (Dicamex) and agricultural soil. The plants were kept under controlled conditions of temperature and photoperiod (16 h of light at 28°C and 8 h of darkness at 16°C) until they had developed 5-to-6 true leaves.

Transformation via *Agrobacterium*

Transformation was performed following Assad-García *et al.*'s protocol (1992), as follows. A total of 50 explants were placed for 48 h in agitation at 160 rpm in liquid MS medium that contained 1 mL of the bacteria previously grown to 0.7 of DO_{600nm}. The cotyledons were transferred to solid MS medium and 1 µM of ANA (*naphthaleneacetic acid*) and 12.5 µM of BAP (6 benzyl

en agitación a 160 rpm en medio MS líquido que contenía 1 mL de la bacteria previamente crecida hasta 0.7 de DO_{600nm} . Los cotiledones fueron transferidos a medio MS sólido adicionado con ANA (ácido naftalenacético) 1 μM y BAP (6 bencilaminopurina) 12.5 μM por 14 d para fomentar la regeneración de brotes y formar callos organogénicos. Para acelerar la eliminación de la bacteria, posterior al cocultivo, los cotiledones se lavaron con Claforan (cefotaxima) 500 mg/L por 48 h a 160 rpm. En ensayos preliminares se realizó una curva de tolerancia de los callos organogénicos al bialafos, con concentraciones de 0.1 a 10 mg/L. En los experimentos de transformación genética los callos fueron seleccionados en medio MS adicionado con ANA 1 μM y BAP 12.5 μM , 4mg/L de bialafos y 500mg/L de Claforan durante 4 semanas. Los callos se mantuvieron en condiciones controladas en cámara de crecimiento (16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C), con una frecuencia de subcultivo de 2 semanas.

Confirmación molecular de la transformación

La confirmación molecular se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen *Bar* (242pb) y de un fragmento de la construcción correspondiente a una sección del promotor 35S y de la secuencia SYSF (319pb) (Figura 1). Partiendo de 200 mg de callo organogénico se extrajo DNA siguiendo el protocolo de Dellaporta (1983). Los oligonucleótidos utilizados para la

aminopurine) were added for 14 d to foster the regeneration of sprouts and form organogenic calluses. To accelerate elimination of the bacteria, after the co-culture, the cotyledons were washed with 500 mg/L of Claforan (cefotaxime) for 48 h at 160 rpm. In preliminary trials, a tolerance curve of the organogenic calluses to the bialaphos was elaborated using concentrations of 0.1-to-10 mg/L. In the genetic transformation experiments, the calluses were selected in MS medium with 1 μM of ANA, 12.5 μM of BAP, 4mg/L of bialaphos and 500mg/L of Claforan added during 4 weeks. The calluses were kept under controlled conditions in a growth chamber (16 h of light at 28°C and 8 h of darkness at 16°C), with a sub-culture frequency of 2 weeks.

Molecular confirmation of the transformation

Molecular confirmation was conducted using PCR amplification of a fragment of the *Bar* gene (242pb) and a fragment of the construction that corresponded to a section of the 35S promoter and the SYSF sequence (319pb) (Figure 1). Beginning with 200 mg of organogenic callus, DNA was extracted following Dellaporta's protocol (1983). The oligonucleotides used for amplification were: 5'-ACGCACAATCCACTATCCT-3'/5'-TTTCTTGTGCATCCTCCCT-3' for SYSFR and 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAC-3'/5'-AGTCGACCGTGTACGTCTCC-3' for *Bar*. The program employed to conduct amplification was: denaturalization at



Figura 1. Plásmido pFGC5941SYSFR utilizado para silenciar el gen de la prosistemina en explantes de tomate de cáscara. Se destacan los fragmentos de los repetidos invertidos (SYSF y SYSR) de la secuencia de la prosistemina (verde) y del intrón de la chalcona sintasa *ChsA* de *Petunia hybrida* (morado), necesarios para la formación del precursor del RNAi. El plásmido posee los genes *Kan* de resistencia a kanamicina (amarillo) y *Bar* de resistencia a bialafos (azul). En negro se señalan los fragmentos esperados utilizados para confirmar por PCR la transformación.

Figure 1. The pFGC5941SYSFR plasmid used to silence the gene of prosystemin in explants of tomatillo, showing the fragments of the inverted repeats (SYSF and SYSR) of the prosystemin sequence (green), and of the intron of the chalcone synthase, *ChsA*, of *Petunia hybrida* (purple), necessary for the formation of the precursor of the RNAi. The plasmid possesses the *Kan* genes of resistance to kanamycin (yellow) and *Bar* of resistance to bialaphos (blue). The black color shows the expected fragments utilized to confirm transformation by PCR.

amplificación fueron: 5'-ACGCACAATCCCAC-TATCCT-3'/5'-TTTCTTGTGCATCCTCCCCT-3' para SYSFR y 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAA-AC-3'/5'-AGTCGACCGTGTACGTCTCC-3' para *Bar*. El programa que se utilizó para amplificar fue: desnaturalización a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización 94 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C para SYSFR o 60 °C para *Bar* por 30 s, extensión a 72 °C y 30 s; seguida de una extensión final a 72 °C por 10 min. La reacción de PCR se realizó al utilizar la enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), de acuerdo a las especificaciones del producto.

Análisis de expresión por PCR cuantitativo (qPCR)

La inducción de los genes a evaluar se realizó a callos o plantas, asperjando una solución de ácido jasmónico 1 mM hasta punto de saturación. Las muestras permanecieron dentro de cámara de crecimiento bajo condiciones controladas y se colectaron y pulverizaron con nitrógeno líquido a las 0 h (control), 2, 4, 8, 12 y 24 h. El material vegetal se mantuvo a -70 °C hasta su procesamiento.

La extracción de RNA total se realizó a partir de 200 mg de callo (o tejido foliar) y el reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del producto. La calidad e integridad de RNA se evaluó por espectrofotometría a 260/280 nm y electroforesis desnaturalizante. El cDNA se sintetizó mediante la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Para el qPCR se utilizó el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). La mezcla se llevó a cabo en placas de 96 pozos en un volumen total de 15 μ L utilizando una concentración de 150 nM de cada oligonucleótido. Cada una de las muestras contenía 2x SYBR Green Mastermix, oligonucleótidos sentido y antisentido, cDNA y agua. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineación a 58 °C por 1 min y una extensión de 95 °C por 15 s. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. El análisis de expresión se realizó mediante el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en donde $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen a evaluar} - Ct \text{ gen de referencia})$ de callos control - $(Ct \text{ gen a evaluar} - Ct \text{ gen de referencia})$

94 °C for 5 min, 35 denaturalization cycles at 94 °C for 30 s, alignment at 56 °C for SYSFR or 60 °C for *Bar* for 30 s, extension at 72 °C for 30 s, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR reaction was performed with the enzyme GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), following product specifications.

Analysis of quantitative expression by PCR (qPCR)

Induction of the genes to be evaluated was carried out with calluses or plants by sprinkling a 1 mM solution of jasmonic acid up to the saturation point. The samples remained in the growth chamber under controlled conditions until collected and pulverized with liquid nitrogen at 0 (control), 2, 4, 8, 12 and 24 h. The vegetable material was held at -70 °C until processing.

Total RNA extraction was performed with 200 mg of callus (or foliar tissue) and the TRIzol Reagent (Invitrogen), following product specifications. The quality and integrity of the RNA was evaluated by spectrophotometry at 260/280 nm and denaturalizing electrophoresis. The cDNA was synthesized by the M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (Promega). The StepOne Plus thermocycler (Applied Biosystems) was utilized for qPCR. Mixing was conducted in 96-well plates at a total volume of 15 μ L using a 150 nM concentration of each oligonucleotide. Each sample contained 2x SYBR Green Mastermix, sense and antisense oligonucleotides, cDNA and water. The amplification conditions were: denaturalization at 95 °C for 10 min, followed by 40 denaturalization cycles at 95 °C for 15 s, alignment at 58 °C for 1 min, and an extension at 95 °C for 15 s. All samples were analyzed in triplicate. Expression analysis was conducted using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ comparative method, where $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gene to be evaluated} - Ct \text{ reference gene})$ of control calluses - $(Ct \text{ gene to be evaluated} - Ct \text{ reference gene})$ of the induced calluses, following Livak and Schmittgen (2001), and employing 18S as the reference gene of (5'-TAGCAGGCTGAGGTCTCGTT-3'/5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3'). The 5'-AGGGAGGATGCACAAGAAA-3'/5'-ATTGTGCTCCCTCTCCTCCT-3' and 5'-GGCCTAGTTAGCTCAATGGC-3'/5'-TGAAGTGAAGGGACACAAC-3' oligonucleotides were used to

de callos inducidos de acuerdo a Livak y Schmittgen (2001), empleando el 18S como gen de referencia (5'-TAGCAGGCTGAGGTCTCGTT-3'/5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3'). Los oligonucleótidos 5'-AGGGGAGGATGCACAA-GAAA-3'/5'-ATTGTGCTCCCTCTCCTCCT-3' y 5'-GGCCTAGTTAGCTCAATGGC-3'/5'-TGA-ACTGAAAGGGACACA-3', se utilizaron para evaluar la expresión de los genes de prosistema y lipoxigenasa (*Lox*), respectivamente.

Resultados y discusión

Se logró el establecimiento de los callos sin modificación alguna a protocolo propuesto por Assad-García *et al.* (1992). Los primeros indicios de la formación de callos se apreciaron a partir de la segunda semana de iniciado el cultivo. Cuatro semanas después, los explantes se transformaron completamente en callo. Los resultados obtenidos de la curva de tolerancia del agente de selección mostraron que 7 días de exposición, y una concentración de 0.5 mg/L de bialafos, reducían el crecimiento de los callos y generaban clorosis en comparación con un control (sin tratamiento). Concentraciones superiores resultaban tóxicas e inhibían en su totalidad el crecimiento (Figura 2). Para la selección del material transformado se utilizó una concentración inhibitoria óptima de 4 mg/L.

evaluate the expression of the genes of prosystemin and lipoxigenase (*Lox*), respectively.

Results and Discussion

The calluses were established with no modifications whatsoever, according to the protocol proposed by Assad-García *et al.* (1992). The first indications of the formation of calluses appeared during the second week after culture began. Four weeks later, the explants were completely transformed into calluses. The results obtained from the tolerance curve of the selection agent showed that 7 days of exposure with a concentration of 0.5 mg/L of bialaphos, reduced the growth of the calluses and produced chlorosis, compared to an untreated control. Higher concentrations proved to be toxic, inhibiting growth completely (Figure 2). An optimal inhibitory concentration of 4 mg/L was used to select the transformed material.

Of the 50 explants subjected to transformation with the empty plasmid (pFGC5941), only 4 individual calluses showed tolerance to bialaphos. However, molecular confirmation by PCR was only positive in 1 callus (Figure 3a). From the 50 explants subjected to transformation with the silencing construction (SYSRF), 5 bialaphos-tolerant calluses were obtained, of which only 2 turned out to be positive upon confirma-

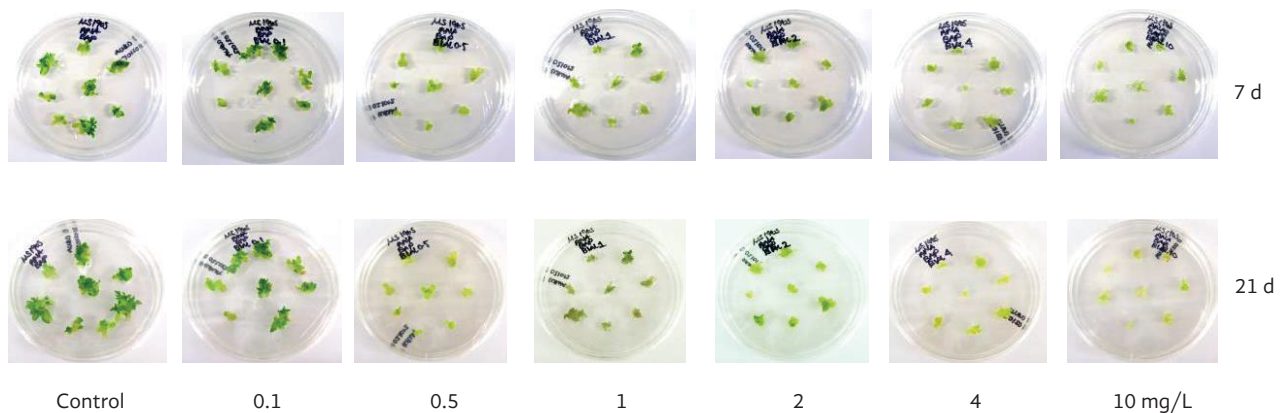


Figura 2. Curva de tolerancia de los callos organogénicos 7 y 21 días posteriores al contacto con el agente de selección. La evaluación incluyó concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2, 4 y 10 mg/L de bialafos y un control (sin bialafos).

Figure 2. Tolerance curve of the organogenic calluses at 7 and 21 days after contact with the selection agent. Evaluation included concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2, 4 and 10 mg/L of bialaphos and a control (without bialaphos).

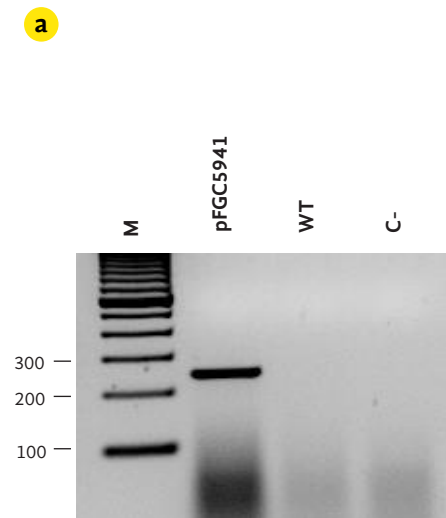


Figura 3. Confirmación de la transformación mediante amplificación por PCR. Detección del producto de amplificación de un fragmento del gen *Bar* (242 pb) en callos transformados con el plásmido pFGC5941 (a). Detección del producto de amplificación de un fragmento del gen *Bar* y de un fragmento de la construcción de silenciamiento (SYSFR), que incluye parte de la secuencia del promotor 35S y de uno de los repetidos invertidos de la secuencia de la prosistemia (319 pb), en callos transformados con el plásmido pFGC5941SYS (b). M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), WT: Callos no transformados, C: Controles técnicos (+ y -), SysFR-1 y SysFR-2: Clonas transformadas con la construcción de silenciamiento, pFGC5941: Clona transformada con el plásmido vacío.

De los 50 explantes sometidos a transformación con el plásmido vacío (pFGC5941), sólo 4 callos individuales presentaron tolerancia hacia el bialafos. Sin embargo, la confirmación molecular por PCR sólo fue positiva en 1 callo (Figura 3a). A partir de los 50 explantes sometidos a transformación con la construcción de silenciamiento (SYSRF), se obtuvieron 5 callos tolerantes a bialafos, de los cuales sólo 2 resultaron positivos al confirmar por PCR la incorporación del gen *bar*, así como de un fragmento de la construcción correspondiente a una sección del promotor 35S y uno de los repetidos invertidos de la prosistemia (Figura 3b). No se observaron alteraciones fenotípicas en los callos transformados, aunque en ningún caso se logró una regeneración hasta planta. La eficiencia de transformación en ambos casos es baja (menor al 5%). Estos resultados coinciden con lo reportado por Assad-García *et al.* (1992) y Martínez-Oceguera *et al.* (2006) también en “tomate de cáscara”.

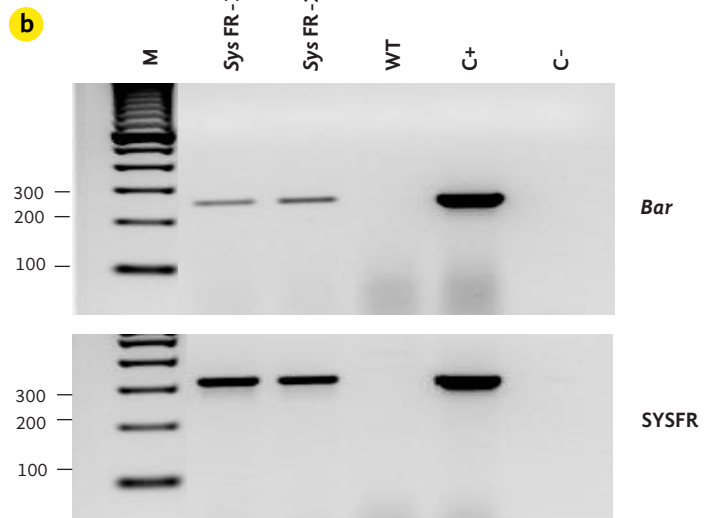


Figure 3. Confirmation of the transformation by PCR amplification. Detection of the amplification product of a fragment of the *Bar* gene (242 pb) in calluses transformed with the plasmid pFGC5941 (to). Detection of the amplification product of a fragment of the *Bar* gene and of a fragment of the silencing construction (SYSFR), that includes part of the sequence of the 35S promoter and one of the inverted repeats of the prosystemin sequence (319 pb) in calluses transformed with the pFGC5941SYS plasmid (b). M: Marker of molecular weight of 100 pb (Invitrogen), WT: Non-transformed calluses, C: Technical controls (+ and -), SysFR-1 and SysFR-2: Clones transformed by the silencing construction, pFGC5941: Clone transformed with the empty plasmid.

tion of the incorporation of the gene *bar* by PCR, together with one fragment of the construction that corresponded to a section of the 35S promoter, and one of the inverted repeats of prosystemin (Figure 3b). No phenotypical alterations were observed in the transformed calluses, but in no case was regeneration to a plant achieved. Transformation efficiency in both cases was low (below 5%). These results coincide with those reported by Assad-García *et al.* (1992) and Martínez-Oceguera *et al.* (2006) also using “tomatillo”.

In the non-transformed “tomatillo” plants, the levels of expression of prosystemin increased notably in foliar tissue in response to treatment with JA. The accumulation of transcript began 2 h after treatment, reaching maximum levels at 24 h (Figure 4). Similar results were reported for the prosystemin of “tomatillo” in response to mechanical damage (McGurl *et al.* 1992). The expression pattern observed in plants was modified in the calluses transformed with the plas-

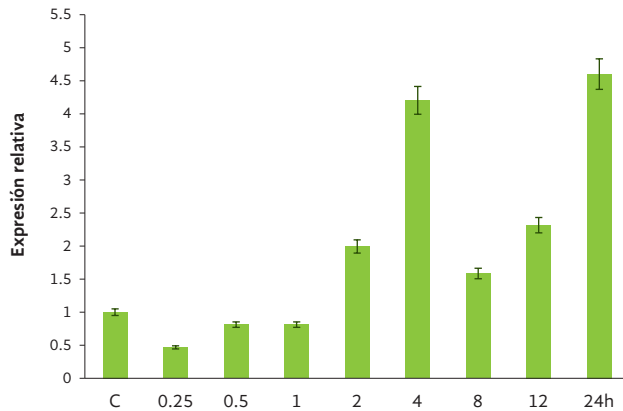


Figura 4. Cinética de expresión del gen de la prosisteminina en plantas de tomate de cáscara tratadas con ácido jasmónico 1mM. C: Control (tratamiento 0h).

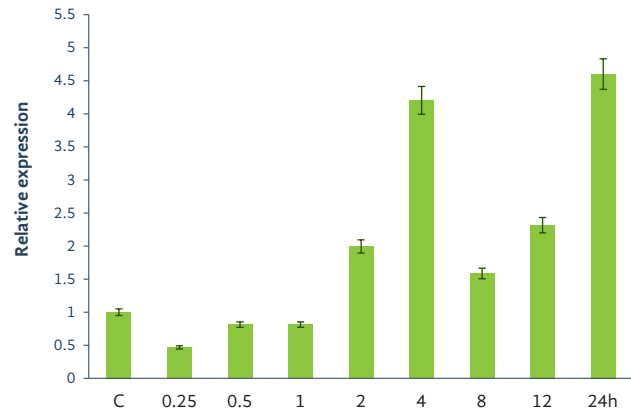


Figure 4. Kinetics of the expression of the prosystemin gene in tomatillo plants treated with 1mM of jasmonic acid. C: Control (0h treatment).

En plantas de “tomate de cáscara” no transformadas, se incrementan notablemente en tejido foliar los niveles de expresión de la prosisteminina en respuesta al tratamiento con AJ. La acumulación de transcrito comienza 2 h posterior al tratamiento, llegando a niveles máximos a las 24 h (Figura 4). Se reportaron resultados similares para la prosisteminina de “jitomate” en respuesta a daño mecánico (McGurl *et al.* 1992). El patrón de expresión observado en plantas se modifica en los callos transformados con el plásmido pFGC5941 en donde prevalece el incremento de la prosisteminina pero se observa hasta las 12 h. Como era de esperarse, en los callos silenciados (SysFR-1) no se observa ningún incremento en los niveles de transcrito, con lo cual se confirma el silenciamiento del gen de la prosisteminina (Figura 5a). La clona SysFR-2 se perdió por problemas de contaminación durante un subcultivo y no fue posible continuar con su análisis.

Los incrementos de la actividad enzimática de inhibidores de proteasas, polifenol oxidasa y peroxidasa en plantas de “tomate de cáscara” expuestas a herbivoría o tratadas con AJ (Medina-Andrade 2012) y el análisis de expresión de los genes aislados a partir de una biblioteca sustractiva de plantas sometidas a herbivoría por larvas de *Manduca sexta* (Quezada-Camargo 2015) indican que la respuesta defensiva presente en esta planta comparte elementos con la ruta de señalización mediada por sisteminina en “jitomate”. De acuerdo con lo anterior, la respuesta defensiva de *Physalis philadelphica* involucra la regulación

mid pFGC5941 where what prevailed was an increase in prosystemin that was observed up to 12 h. As was expected, no increase in the levels of transcript were observed in the silenced calluses (SysFR-1), a finding that confirms the silencing of the gene of prosystemin (Figure 5a). The clone SysFR-2 was lost due to problems of contamination during the sub-culture, so it was not possible to continue with its analysis.

The increases in the enzymatic activity of the protease inhibitors, polyphenol oxidase and peroxidases in “tomatillo” plants exposed to herbivory or treated with JA (Medina-Andrade 2012) and the analysis of the expression of the genes isolated from a subtractive library of plants subjected to herbivory by the larvae of *Manduca sexta* (Quezada-Camargo 2015) indicate that the defensive response present in this plant shares elements with the systemin-mediated signaling pathway in “tomatillo”. Accordingly, the defensive response of *Physalis philadelphica* entails the positive regulation of genes that codify for trypsin, lipoxygenase and *threonine deaminase* inhibitors, among others. To determine whether accumulation of these genes depends on prosystemin levels in the plant, we decided to analyze their expression patterns in the silenced calluses. Unfortunately, it was not possible to determine the levels of any trypsin or *threonine deaminase* inhibitors, perhaps because the degree of differentiation present in the calluses did not favor their expression (data not shown). However, upon evaluating the expression of the *Lox* gene

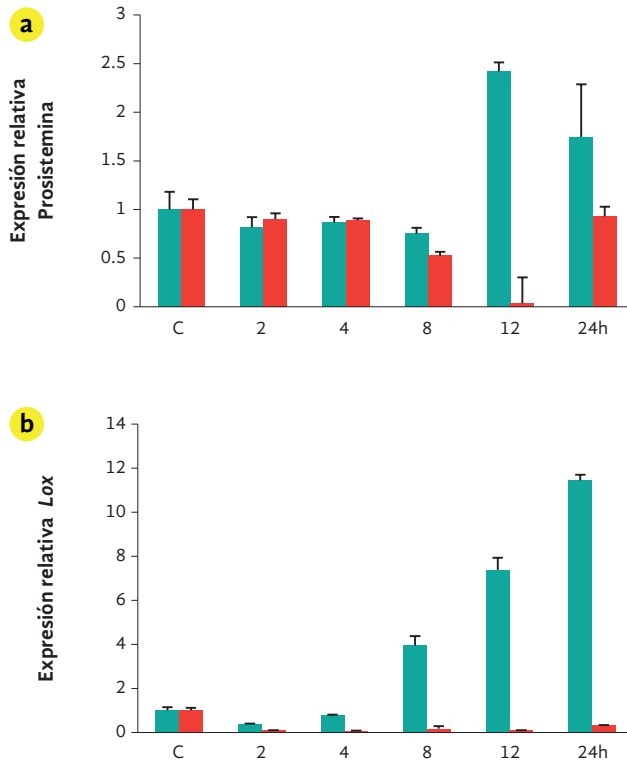


Figura 5. Cinéticas de expresión de los genes prosistemina (a) y lipoxigenasa (b) en callos de tomate de cáscara tratados con ácido jasmónico 1mM. *SysFR-1* (■): Clona transformada con la construcción de silenciamiento, pFGC5941 (■): Clona transformada con el plásmido vacío, C: Control (tratamiento 0h).

positiva de genes que codifican para inhibidores de tripsina, lipoxigenasa y treonina desaminasa, entre otros. Para determinar si la acumulación de estos genes depende de los niveles de prosistemina en la planta, se decidió analizar sus patrones de expresión en los callos silenciados. Infortunadamente, no fue posible determinar los niveles de ningún inhibidor de tripsina, ni de la treonina desaminasa, tal vez debido a que el grado de diferenciación presente en el callo no favorece su expresión (datos no mostrados). Sin embargo, al evaluar la expresión del gen *lox* que codifica para una lipoxigenasa indispensable e involucrada en la síntesis de AJ (Yan *et al.* 2013), se observó, exclusivamente en los callos transformados con el plásmido pFGC5941, un incremento de transcrito en respuesta a AJ, 8 h posteriores al estímulo (Figura 5b). La ausencia de mensajero en los callos silenciados (*SysFR-1*) confirma la regulación de la prosistemina en la expresión del gen *Lox* en *P. philadelphica*.

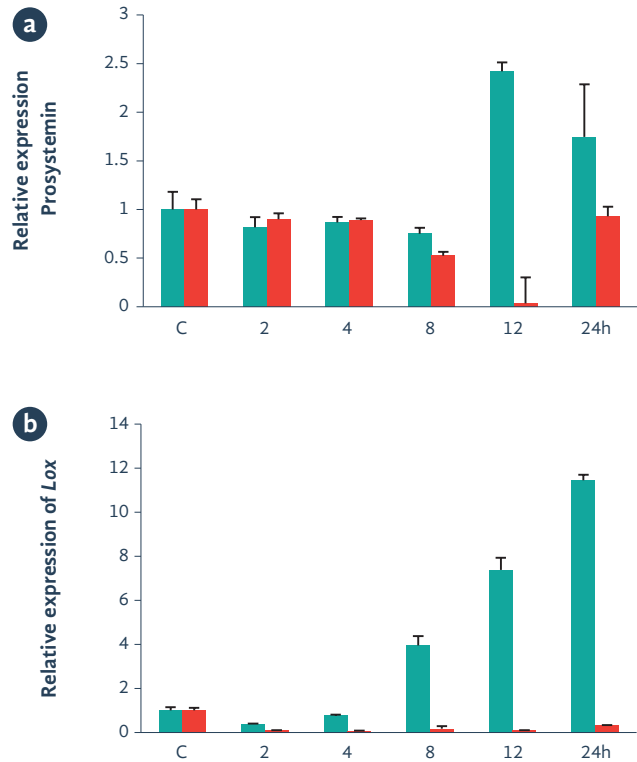


Figure 5. Kinetics of the expression of the prosystemin genes (a) and lipoxigenase (b) in calluses of tomatillo treated with 1mM of jasmonic acid. *SysFR-1* (■): Clone transformed with the silencing construction, pFGC5941 (■): Clone transformed with the empty plasmid, C: Control (0h treatment).

that codifies for a lipoxigenase that is indispensable for, and involved in, JA synthesis (Yan *et al.* 2013), the study found, only in the calluses transformed with the pFGC5941 plasmid, an increase of the transcript in response to JA, 8 h after stimulation (Figure 5b). The absence of a messenger in the silenced calluses (*SysFR-1*) confirms the regulation of prosystemin in the expression of the *Lox* gene in *P. philadelphica*.

These observations allow us to suggest that the prosystemin present in “tomatillo” is functional and regulates defensive responses through JA, in a manner similar to the model posited for “tomato”, where the release and recognition of systemin promote accumulation of JA that, in turn, induces the expression of various genes that codify for a variety of related defense proteins (Ryan 2000). This suggestion is strengthened by identification of the systemin receptor (SR160) in the transcriptional analysis of plants of *Physalis philadelphica* exposed to treatments with JA (Mario Arteaga, pers. comm.).

Lo anterior permite sugerir que la prosistemina presente en tomate de cáscara es funcional y regula las respuestas defensivas a través del AJ, en forma similar al modelo planteado en “jitomate” donde la liberación y reconocimiento de sistemina promueve la acumulación de AJ, que a su vez induce la expresión de varios genes que codifican para una diversidad de proteínas de defensa relacionadas (Ryan 2000). Esta sugerencia se fortalece por la identificación del receptor de la sistemina (SR160) en el análisis transcripcional de plantas de *Physalis philadelphica* expuestas a tratamientos con AJ (Mario Arteaga, comunicación personal).

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACyT por el financiamiento otorgado (Proyecto CB-83859) y por la beca otorgada a MFES (No. 273962). ❖

Acknowledgments

The authors thank CONACyT for the funding provided (Proyecto CB-83859) and the scholarship granted to MFES (No. 273962). ❖

Bibliografía | Bibliography

ANDRADE-MEDINA MARIANA. 2012.

Determinación de la actividad de proteínas de defensa en tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam.) y su inducción por herbivoría, daño mecánico y moléculas señales. Director: Carla Vanessa Sánchez Hernández. Tesis Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

ASSAD-GARCÍA, N., N. OCHOA-ALEJO, E. GARCÍA-HERNÁNDEZ, L. HERRERA-ESTRELLA & J. SIMPSON. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem.) and tissue specific and developmental

expression of the CaMV 35S promoter in transgenic tomatillo plants. *Plant Cell Reports* **1**: 558–562. [ISSN (Print) 0721-7714; (Online) 1432-203X]

CONSTABEL, C.P., L. YIP & C.A. RYAN. 1998. Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Molecular Biology* **36**: 55–62. [ISSN (Print) 0167-4412; (Online) 1573-5028]

DELLAPORTA, S.L., J. WOOD & J.B. HICKS. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 19–21. [ISSN: 0735-9640]

LI, L., C. LI & G.A. HOWE. 2001. Genetic analysis of wound sig-

naling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiology* **127**: 1414–1417. [ISSN: 0032-0889]

LI, L., C. LI, G.I. LEE & G.A. HOWE. 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemin wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 6416–6421. [ISSN: 0027-8424]

LIVAK, K.J. & T.D. SCHMITTGEN. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* **25**: 402–408. [(ISBN: 978-0-12-181887-6)]

MARTÍNEZ-OCEGUERA, J.M., R. GUTIÉRREZ-CAMPOS & E. GARCÍA-PINEDA. 2006. Transfor-

- mación de plantas de tomate verde (*Physalis ixocarpa* var. *rendidora*) con el gen *oc-I* (Orizacistatina I). *Revista Mexicana de Fitopatología* **24**: 13–19. [ISSN: 0185-3309]
- MCGURL, B., M. OROZCO-CARDENAS, G. PEARCE & C.A. RYAN. 1994.** Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 9799–9802. [ISSN: 0027–8424]
- MCGURL, B., G. PEARCE, M. OROZCO-CARDENAS & C.A. RYAN. 1992.** Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* **255**: 1570–1573. [ISSN: 0036-8075]
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962.** A revised medium for growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497. [ISSN: 1399-3054]
- OROZCO-CARDENAS, M., B. MCGURL & C.A. RYAN. 1993.** Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 8273–8276. [ISSN: 0027-8424]
- PEARCE, G. & C.A. RYAN. 2003.** Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 30044–30050. [ISSN (Print) 0021-9258; (Online) 1083-351X]
- PEARCE, G., D. STRYDOM, S. JOHNSON & C.A. RYAN. 1991.** A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895–898. [ISSN: 0036-8075]
- QUEZADA-CAMARGO VÍCTOR URIEL. 2015.** Análisis de la expresión de genes implicados en defensa de *Physalis philadelphica* en respuesta a herbivoría y ácido jasmónico. Director: Carla Vanessa Sánchez Hernández. Tesis Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- ROSALES-CAMPOS, A.L., J. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. DÉLANO-FRIER & C. SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ. 2008.** Identificación del gen de la prosistemina en *Physalis ixocarpa*. En: Carvajal, Servando & Enrique Pimienta Barrios (eds.), *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA* (Zapopan, Jalisco, 24–28 de noviembre de 2008). Universidad de Guadalajara. Pp. 71–74. [ISBN: 978-607-00-2083-4]
- RYAN, C.A. 2000.** Review: The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**: 112–121. [ISSN: 0006-3002]
- SCHILLMILLER, A. & G. HOWE. 2005.** Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369–377. [ISSN (Print) 1369-5266; (Online) 1879-0356 (Electronic) 1369-5266].
- SCHMIDT, S. & I.T. BALDWIN. 2006.** Systemin in *Solanum nigrum*. The tomato-homologous polypeptide does not mediate direct defense responses. *Plant Physiology* **142**: 1751–1758. [ISSN: 0032-0889]
- SUN, J.Q., H.L. JIANG & C.Y. LI. 2011.** Review: Systemin/Jasmonate-mediated systemin defense signaling in tomato. *Molecular Plant* **4**: 607–615. [ISSN: 1752-9867]
- WAR, A.R., M.G. PAULRAJ, T. AHMAD, A.A. BUHROO, B. HUSSAIN, S. IGNACIMUTHU & H.C. SHARMA. 2012.** Mechanism of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal and Behavior* **7**: 1306–1320. [ISSN: 1559-2324]
- YAN, L., Q. ZHAI, J. WEI, S. LI, B. WANG, T. HUANG, M. DU, J. SUN, L. KANG, C.B. LI & C. LI. 2013.** Role of tomato lipoxigenase D in wound-induced jasmonate biosynthesis and plant immunity to insect herbivores. *PLOS Genetics* **9**: e1003964. [ISSN (Print) 1553-7390; (Online) 1553-7404]

Evaluación de sustratos y el efecto de algas marinas en el desarrollo y rendimiento de *Capsicum annuum* (Solanaceae)

Evaluation of substrates and the effect of marine algae on the development and yield of *Capsicum annuum* (Solanaceae)

María Luisa García Sahagún[✉], Luis Eduardo Durán Meza, Ricardo Ulises Cárdenas Rodríguez, Alicia De Luna Vega, Eduardo Rodríguez Díaz y Juan Pedro Corona Salazar

Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, La Venta del Astillero, 45221, Zapopan, Jalisco, México.

✉ mgarcia@cucba.udg.mx

Citar

Resumen

Con el propósito de evaluar el efecto de mezclas de sustratos (mineral y orgánica) y algas marinas en el desarrollo y el rendimiento de “chile pimiento” (*Capsicum annuum* L.), se llevó a cabo un experimento que se estableció bajo invernadero, en las instalaciones del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias durante el periodo 2014-2015. Se utilizaron como tratamientos doce mezclas de sustratos en diversos porcentajes que incluyeron Tezontle : Estopa de coco; Arena : Vermicomposta; Composta Bocashi : Suelo : Jal, en los que fueron evaluadas un total de 120 plantas de “pimiento naranja”, variedad “orange victory” de la empresa Enza Zaden. A 60 plantas se les aplicaron algas marinas en “drench” al sustrato, siguiendo las recomendaciones del producto comercial *Alga 600*; además de los testigos. Las algas se aplicaron en el trasplante y cada 15 días durante seis ocasiones. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones; se elaboró un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.01$) mediante el paquete estadístico NCSS. Las variables evaluadas fueron: longitud y grosor de tallo, nú-

mero de hojas y rendimiento. Los valores más altos para la longitud y grosor de tallo, y número de hojas se obtuvieron en la quinta fecha de evaluación (febrero de 2015) y la sexta (marzo de 2015). Los tratamientos que generaron mayor longitud de tallo, número de hojas y rendimiento fueron 70 % Vermicomposta 30 % Arena y 70 % Bocashi 20 % Suelo 10 % Jal. El mayor rendimiento se presentó en los tratamientos de 50 % Arena 50 % Vermicomposta y 50 % Tezontle 50 % Estopa. En el caso del grosor de tallo, el tratamiento que generó valores más altos fue la mezcla de 50 % Bocashi 40 % Suelo 10 % Jal. La aplicación de algas marinas no tuvo efecto en la longitud de tallo, grosor de tallo número de hojas y rendimiento en las plantas de pimiento.

Palabras clave: Sustratos, tezontle, vermicomposta, bocashi, algas, rendimiento.

Abstract

With the objective of evaluating the effect of substrate mixtures (mineral and organic) and marine algae on the development and yields of bell peppers (*Capsicum annuum* L.) an experiment was conducted under greenhouse conditions at the Centro Universitario

de Ciencias Biológicas y Agropecuarias in 2014-2015. The 12 treatments used consisted of substrate mixtures with different percentages of the following substances: tezontle : coconut coir; sand : vermicompost; bokashi compost : soil:jal. A total of 120 “Orange Victory” plants supplied by the Enza Zaden Company were evaluated: 60 received an application of marine algae by “drench” following the recommendations of the commercial product *Alga 600*; as well as the witnesses. Algae were applied during transplanting and then every 15 days up to a total of 6 occasions. Treatments were distributed in a completely random design with 5 repetitions. An analysis of variance was conducted with comparisons of means using a Tukey test ($p \leq 0.01$), all with the NCSS statistical package. The variables evaluated were: stem length and thickness, number of leaves,

and yields. The highest values for stem length and thickness, and number of leaves were obtained on the 5th (February 2015) and 6th (March 2015) evaluation dates. The treatments that generated the greatest stem length and the highest number of leaves and yields were 70% vermicompost/30% sand/70% bokashi 20% soil 10% jal. The highest yield was produced by the treatments with 50% sand 50% vermicompost and 50% tezontle 50% coir. For stem thickness, the treatment that generated the highest values was the mixture of 50% bokashi 40% soil 10% jal. The application of marine algae had no effect on the stem length, stem thickness, number of leaves, or yields of these pepper plants.

Key words: substrates, tezontle, vermicompost, bokashi, algae, yield.

Introducción

El cambio climático que se asocia al calentamiento global, ha ocasionado la perturbación de los ciclos naturales de las principales variables climáticas, lo que afecta de manera negativa en la producción de hortalizas, por lo que una opción a esta problemática lo constituyen la siembra y el cultivo en condiciones protegidas con sistemas hidropónicos en diferentes sustratos (Mata *et al.* 2010).

Reportes de SAGARPA (2012) señalan que en México existen alrededor de 20 000/ha con agricultura protegida, de las cuales alrededor de 12 000 ha son de invernadero y el resto de malla sombra y macrotúnel. Los principales cultivos que se producen mediante esta técnica son “tomate” (70 %), “pimiento” (16 %) y “pepino” (10 %). La exportación de chile pimiento es una

Introduction

Climate change associated with global warming has caused perturbations in the natural cycles of the principle weather variables with negative effects on fruit and vegetable production. One option for dealing with this problem is to seed and cultivate plants under protected conditions using hydroponic systems in different substrates (Mata *et al.* 2010).

Reports by SAGARPA (2012) indicate that Mexico has around 20,000 hectares (49,420 acres) of protected agriculture, of which some 12,000 (29,650 acres) are in greenhouses and the rest under shade cloth or in macro-tunnels. The principle cultivars produced with such techniques are tomatoes (70%), peppers (16%) and cucumbers (10%). The exportation of bell peppers is an important economic activity in

actividad de importancia económica en México. Durante 2014 se generaron 745 millones de dólares por el comercio exterior (INEGI 2014). Lo anterior dio lugar a un incremento en la demanda de sustratos, porque proporcionan un medio ambiente ideal para el crecimiento de las raíces (aportar agua, aire y nutrientes), construir una base adecuada para el anclaje y soporte a la raíz (Abad & Noguera 2000). La finalidad de los sustratos es producir planta y cosecha de calidad, en corto tiempo y bajos costos, sin provocar un impacto ambiental grave (Abad *et al.* 2005).

La elección del material como sustrato según Abad & Noguera (2000), se basa en:

- a) Suministro y homogeneidad (los cambios en la calidad del sustrato pueden ocasionar pérdidas graves en la producción),
- b) Costo (parámetro significativo que nos permite reducir riesgos),
- c) Finalidad de la producción (de ello dependerá el manejo y la calidad del producto),
- d) Propiedades (determinan el manejo del cultivo),
- e) Impacto ambiental (Nivel de contaminación del sustrato) y
- f) Ausencia de sustancias tóxicas para el cultivo (Abad & Noguera 2000).

Los sustratos deben ser caracterizados y clasificados para su manejo, al igual que los suelos. En el suelo la caracterización química es primordial y se le asigna una menor importancia a sus propiedades físicas. En el caso de los sustratos, la caracterización física es fundamental (Verdonck & Demeyer 2004) y la caracterización química es menos relevante, porque a través de la solución nutritiva se añaden los nutrientes, aunque del conocimiento de las propiedades físicas y químicas dependerá el riego y la fertilización (Burés 1998).

Las propiedades que caracterizan a un buen sustrato se relacionan con su capacidad para propiciar la germinación, el enraizamiento y el desarrollo de las plantas. Las propiedades físicas consideran una elevada capacidad de retención de agua fácilmente disponible, suficiente suministro de aire, distribución del tamaño de las partículas adecuado para que mantenga las condiciones anteriores, baja densidad aparente,

Mexico that, in 2014, generated \$745 million USD in foreign trade (INEGI 2014). This production triggered an increase in the demand for substrates that provide ideal environments for root growth by supplying water, air and nutrients, while also establishing a suitable base to anchor and support them (Abad & Noguera 2000). The goal of using substrates is to produce high-quality plants and harvests in shorter times and at lower costs without causing any severe environmental impact (Abad *et al.* 2005).

Abad & Noguera (2000) suggest that the choice of substrate materials is based on:

- a) Supplies and homogeneity (variations in substrate quality can result in serious production losses);
- b) Cost (a significant parameter in relation to reducing risk);
- c) Product destination (which determines product quality and handling);
- d) Properties (which determine product management);
- e) Environmental impact (level of contamination of substrates); and
- f) Absence of substances toxic to the cultivar.

All substrates and soils must be characterized and classified for their management. While the chemical composition of soil is primordial and less important than its physical properties; the physical characterization of substrates is fundamental (Verdonck & Demeyer 2004) and chemical composition less significant. This is because nutrients are added by a nutritious solution, though knowledge of both physical and chemical properties is necessary to adequately program irrigation and fertilization (Burés 1998).

The properties that characterize a good substrate relate to its capacity to propitiate germination and root and plant development. Important physical properties include a high capacity for retaining readily-available water, sufficient air supply, adequate particle size distribution to maintain the aforementioned conditions, low apparent density, high total porosity, and a stable structure that impedes contraction. Desirable chemical properties are low or sufficient capacity for cationic exchange as a function of appropriate fertilization, suitable levels of assimilable

elevada porosidad total y estructura estable que impida la contracción del sustrato. Las propiedades químicas incluyen baja o suficiente capacidad de intercambio catiónico, en función de la fertilización apropiada, suficiente nivel de nutrientes asimilables, baja salinidad, elevada capacidad tampón y pH ligeramente ácido y mínima velocidad de descomposición (López Cuadrado & Masaguer 2006).

Las partículas de tamaño uniforme contenidas en el sustrato, de acuerdo con Gislerod *et al.* (1997), mejoran el suministro de oxígeno a las raíces en comparación con mezclas de partículas de diferentes dimensiones. Sin embargo, Vargas-Canales (2014) reportó la evaluación de mezclas (v/v) de tezontle con aserrín nuevo y reciclado en la producción y extracción nutrimental de jitomate. Los resultados mostraron que las mezclas tezontle/aserrín reciclado producen el mismo rendimiento de fruto y eficiencia en la absorción de nutrientes que el tezontle y mezclas de tezontle/aserrín nuevo. En consideración a lo anterior, se evaluó el efecto de mezclas de sustratos (mineral y orgánica) y algas marinas en el desarrollo y el rendimiento de chile pimiento.

Materiales y métodos

Descripción de la zona de estudio, del material vegetativo, el sustrato de crecimiento y el tratamiento aplicado

La presente investigación se realizó en las instalaciones del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), de la Universidad de Guadalajara, en un invernadero tipo túnel de 8 m de ancho por 21 de largo con ventilación cenital, que se ubica en las coordenadas 20° 44' 47" N, 103° 30' 43" W. En el invierno del 2014, se sembraron semillas de pimiento morrón naranja "Orange victory" de la casa comercial Enza Zaden, que proporcionó la empresa Agrimac. Se colocaron en charolas de germinación en las que utilizó como sustrato el producto *sunshine* (musgo fermentado). Una vez que se desarrollaron las plántulas, se trasplantaron en macetas de 15 litros, con las mezclas de sustratos que se presentan en el Cuadro 1. A los sustratos evaluados se les determinó la densidad aparente (Figura 1) y la granulometría (Cuadros 2, 3, y 4).

nutrients, low salinity, high buffering capacity, and a slightly-acid pH with a minimum velocity of decomposition (López Cuadrado & Masaguer 2006).

According to Gislerod *et al.* (1997), uniform particle size in the substrate improves the supply of oxygen to the roots compared to mixtures with particles of different dimensions. However, Vargas-Canales (2014) reported an evaluation of mixtures (v/v) of tezontle with fresh and recycled sawdust in the production and nutrimental extraction of tomatoes. Those results showed that the mixtures of tezontle/recycled sawdust produced the same fruit yield and the same efficiency in nutrient absorption as tezontle and mixtures of tezontle/fresh sawdust. Considering these antecedents, the present study was designed to evaluate the effect of different substrate mixtures (mineral and organic) and marine algae on the development and yield of bell peppers.

Materials and Methods

Description of the study area, vegetable material, growing substrate, and treatments applied

Research was conducted at the *Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias* (CUCBA), University of Guadalajara, in a tunnel-type greenhouse 8 m wide by 21 m long with aerial ventilation, located at coordinates 20° 44' 47" N, 103° 30' 43" W. In winter 2014, bell pepper seeds of the "Orange Victory" variety provided by *Agrimac* through the *Enza Zaden Company* were planted in germination trays using the product *Sunshine* (fermented moss) as substrate. As the seedlings developed, they were transplanted in 15-liter plantpots with the substrate mixtures shown in Table 1. The apparent density (Figure 1) and granulometry of all substrates evaluated were determined (Tables 2, 3, 4). Also, analyses of the substrates were conducted in the soil laboratory. Results are shown in Tables 5 and 6.

It is important to clarify that before transplanting, the seedlings received one application of the fungicide *Benomil* 50 (1 g/L), and that in addition to evaluating the effect of the 12 sub-

Cuadro 1. Mezclas de sustratos evaluados.

Tratamiento	Descripción	Algas marinas
1	Testigo Tezontle	Sin aplicación de alga 600
2	70%Tezontle 30%Estopa	
3	50%Tezontle 50%Estopa	
4	70% Estopa 30% Tezontle	
5	Testigo Arena	
6	70% Arena 30% Vermicomposta	
7	50% Arena 50% Vermicomposta	
8	70% Vermicomposta 30% Arena	
9	Testigo Suelo	
10	30% Bocashi 60% Suelo 10% Jal	
11	50% Bocashi 40%Suelo 10% Jal	
12	70%Bocashi 20%Suelo 10% Jal	
1	Testigo Tezontle	Con aplicación de alga 600
2	70%Tezontle 30%Estopa	
3	50%Tezontle 50%Estopa	
4	70% Estopa 30% Tezontle	
5	Testigo Arena	
6	70% Arena 30% Vermicomposta	
7	50% Arena 50% Vermicomposta	
8	70% Vermicomposta 30% Arena	
9	Testigo Suelo	
10	30% Bocashi 60% Suelo 10% Jal	
11	50% Bocashi 40%Suelo 10% Jal	
12	70%Bocashi 20%Suelo 10% Jal	

Table1. Substrate mixtures evaluated.

Treatment	Description	Marine algae
1	Tezontle Witness	Without applica-tion of alga 600
2	70%Tezontle 30%Coir	
3	50%Tezontle 50%Coir	
4	70% Coir 30% Tezontle	
5	Sand Witness	
6	70% Sand 30% Vermicompost	
7	50% Sand 50% Vermicompost	
8	70% Vermicompost 30% Sand	
9	Soil Witness	
10	30% Bokashi 60% Soil 10% Jal	
11	50% Bokashi 40%Soil 10% Jal	
12	70%Bokashi 20%Soil 10% Jal	
1	Tezontle Witness	With application of alga 600
2	70%Tezontle 30%Coir	
3	50%Tezontle 50%Coir	
4	70% Coir 30% Tezontle	
5	Sand Witness	
6	70% Sand 30% Vermicompost	
7	50% Sand 50% Vermicompost	
8	70% Vermicompost 30% Sand	
9	Soil Witness	
10	30% Bokashi 60% Soil 10% Jal	
11	50% Bokashi 40%Soil 10% Jal	
12	70%Bokashi 20%Soil 10% Jal	

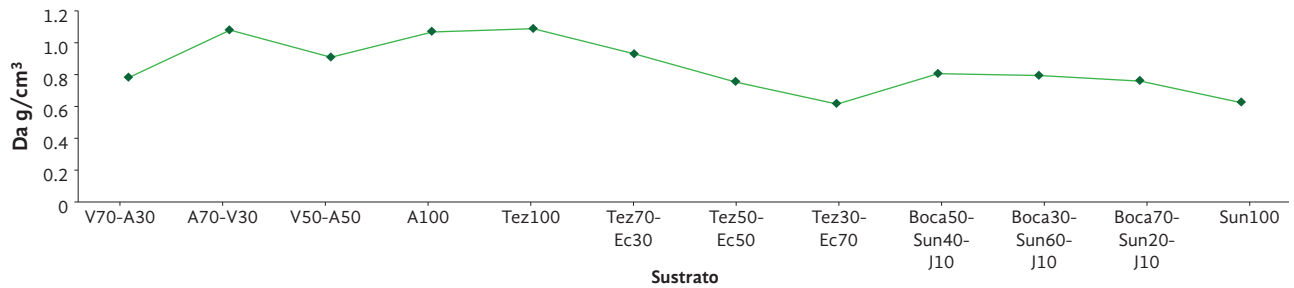


Figura 1. Resultados de la densidad aparente (Da gr/cm³) en los tratamientos utilizados. V=Vermicomposta, A=Arena, Tez=Tezontle, Ec=Estopa de coco, Boca=Bocashi, J=Jal, Sun=Sunshine.

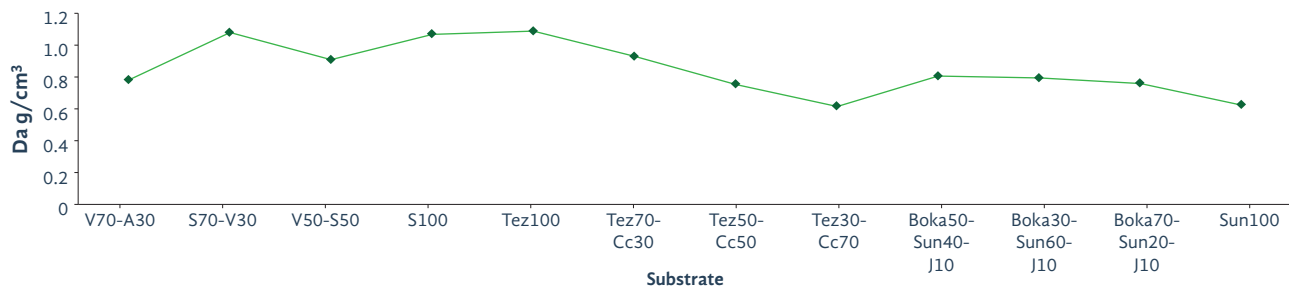


Figure1. Results for the apparent density (Da gr/cm³) of the treatments utilized. V=Vermicompost, S=Sand, Tez=Tezontle, Cc=Coconut coir, Boka=Bokashi, J=Jal, Sun=Sunshine.

Cuadro 2. Determinación de granulometría en las mezclas de sustratos (tezontle y estopa de coco).

Sustrato	Tratamiento 1 Tezontle 100 % (cm ³)	%	Tratamiento 2 Tezontle 70 % + Estopa 30% (cm ³)	%	Tratamiento 3 Tezontle 50 % + Estopa 50 % (cm ³)	%	Tratamiento 4 Tezontle 30 % + Estopa 70 % (cm ³)	%
Tamiz (mm)								
>7	88	24.86	90	23.68	95	25.20	130	30.95
7-4.86	54	15.25	58	15.26	32	8.49	32	7.62
4.86-3	80	22.60	60	15.79	38	10.08	48	11.43
3-1.5	60	16.95	52	13.68	52	13.79	58	13.81
<1.5	72	20.34	120	31.58	160	42.44	152	36.19
Total	354	100.00	380	100.00	377	100.00	420	100.00

Table 2. Granulometric determination of substrate mixtures (tezontle and coconut coir).

Substrate	Treatment 1 Tezontle 100 % (cm ³)	%	Treatment 2 Tezontle 70 % + Coir 30% (cm ³)	%	Treatment 3 Tezontle 50 % + Coir 50 % (cm ³)	%	Treatment 4 Tezontle 30 % + Coir 70 % (cm ³)	%
Screen (mm)								
>7	88	24.86	90	23.68	95	25.20	130	30.95
7-4.86	54	15.25	58	15.26	32	8.49	32	7.62
4.86-3	80	22.60	60	15.79	38	10.08	48	11.43
3-1.5	60	16.95	52	13.68	52	13.79	58	13.81
<1.5	72	20.34	120	31.58	160	42.44	152	36.19
Total	354	100.00	380	100.00	377	100.00	420	100.00

Cuadro 3. Determinación de granulometría en las mezclas de sustratos (vermicomposta y arena).

Sustrato	Tratamiento 5 Testigo Arena 100%	%	Tratamiento 6 Arena 70 % + Vermicomposta 30 % (cm ³)	%	Tratamiento 7 Vermicomposta 50 % + Arena 50 % (cm ³)	%	Tratamiento 8 Vermicomposta 70% + Arena 30%	%
Tamiz (mm)								
>7	50	10.04	50	10.20	40	8.00	30	7.65
7-4.86	40	8.03	32	6.53	44	8.80	28	7.14
4.86-3	66	13.25	68	13.88	90	18.00	60	15.31
3-1.5	84	16.87	90	18.37	94	18.80	82	20.92
<1.5	258	51.81	250	51.02	232	46.40	192	48.98
Total	498	100.00	490	100.00	500	100.00	392	100.00

Table 3. Granulometric determination of substrate mixtures (vermicompost and sand).

Substrate	Treatment 5 Sand Witness 100 %	%	Treatment 6 Sand 70 % + Ver- micompost 30% (cm ³)	%	Treatment 7 Vermicompost 50 % + Sand 50 % (cm ³)	%	Treatment 8 Vermicompost 70 % + Sand 30 %	%
Screen (mm)								
>7	50	10.04	50	10.20	40	8.00	30	7.65
7-4.86	40	8.03	32	6.53	44	8.80	28	7.14
4.86-3	66	13.25	68	13.88	90	18.00	60	15.31
3-1.5	84	16.87	90	18.37	94	18.80	82	20.92
<1.5	258	51.81	250	51.02	232	46.40	192	48.98
Total	498	100.00	490	100.00	500	100.00	392	100.00

Cuadro 4. Determinación de granulometría en las mezclas de sustratos (composta Bocashi y suelo).

Sustrato	Tratamiento 9 Suelo 100% (cm ³)	%	Tratamiento 10 Bocashi 30% + Suelo 60% + Jal 10% (cm ³)	%	Tratamiento 11 Bocashi 50% + Suelo 40% + Jal 10% (cm ³)	%	Tratamiento 12 Bocashi 70% + Suelo 20% + Jal 10% (cm ³)	%
Tamiz (mm)								
>7	24	7.10	55	16.52	48	13.11	30	7.77
7-4.86	20	5.92	50	15.02	40	10.93	26	6.74
4.86-3	34	10.06	62	18.62	62	16.94	56	14.51
3-1.5	70	20.71	42	12.61	52	14.21	70	18.13
<1.5	190	56.21	124	37.24	164	44.81	204	52.85
Total	338	100.00	333	100.00	366	100.00	386	100.00

Table 4. Granulometric determination of substrate mixtures (Bokashi compost and soil).

Substrate	Treatment 9 Soil 100 %	%	Treatment 10 Bokashi 30 % + Soil 60% + Jal 10 % (cm ³)	%	Treatment 11 Bokashi 50 % + Soil 40 % + Jal 10 % (cm ³)	%	Treatment 12 Bokashi 70 % + Soil 20 % + Jal 10% (cm ³)	%
Screen (mm)								
>7	24	7.10	55	16.52	48	13.11	30	7.77
7-4.86	20	5.92	50	15.02	40	10.93	26	6.74
4.86-3	34	10.06	62	18.62	62	16.94	56	14.51
3-1.5	70	20.71	42	12.61	52	14.21	70	18.13
<1.5	190	56.21	124	37.24	164	44.81	204	52.85
Total	338	100.00	333	100.00	366	100.00	386	100.00

También se llevaron a cabo análisis de los sustratos en el laboratorio de suelos. Los resultados se inscriben en los Cuadros 5 y 6.

Conviene aclarar que antes del trasplante, a las plántulas se les aplicó el fungicida *benomil* 50 (1 g/L). Además de evaluar el efecto de los doce sustratos en el desarrollo y el rendimiento, también se aplicó un producto comercial con algas marinas. El producto comercial utilizado fue *Alga 600*[®] de la empresa Biotropic en una dosis de 1 g /L de agua. *Alga 600* incluye una mezcla de algas marrón (*Laminaria*, *Ascophyllum* y *Sargassum*).

Soluciones nutritivas

Durante el experimento, se aplicaron soluciones nutritivas para las plantas de pimiento que se produjeron en Tezontle y mezclando con estopa de coco de acuerdo con el análisis de agua, los requerimientos del cultivo y la etapa fenológica. En el Cuadro 7 se observan los resultados fisicoquímicos del análisis de agua. En el Cuadro 8 se presentan los requerimientos del cultivo de pi-

strates on development and yield, we also applied a commercial product based on marine algae. The product utilized was *Alga 600*[®] from Biotropic, at a dose of 1 g/L of water. *Alga 600* contains a mixture of brown algae (*Laminaria*, *Ascophyllum* and *Sargassum*).

Nutritional solutions

During the experiment, nutritional solutions were applied to the pepper plants produced in tezontle and mixed with coconut coir in accordance with the water analyses, cultivar requirements, and phenological stage. Table 7 shows the physicochemical results of the water analyses, while Table 8 presents the requirements of the pepper cultivar, and Table 9 the requirements of the cultivar by phenological stage.

Variables evaluated

The variables evaluated in the plants and fruits were:

Stem length: determined with a measuring tape graduated in centimeters from the base of the stem to the apex.

Cuadro 5. Resultados de los análisis de laboratorio de las mezclas de sustratos composta bocashi, suelo y jal.

Determinación	Método	Testigo suelo	30% Bocashi+ 60%	50% Bocashi+ 40%	70% Bocashi+ 20%	
			suelo+10% Jal	suelo+10% Jal	suelo+10% Jal	
Valores						
Densidad real g/cc	Picnómetro	1.32	1.95	1.85	1.57	
Densidad aparente g/cc	Probeta	0.52	0.61	0.71	0.7	
Color (seco)	Munssel	7.5 YR 3/2	7.5 YR 3/2	7.5 YR 3/2	7.5 YR 3/2	
Color (seco)	Munssel	Café oscuro	Gris oscuro	Gris oscuro	Gris oscuro	
Color (Húmedo)	Munssel	7.5 YR 2.5/2	7.5 YR 2.5/2	7.5 YR 2.5/2	7.5 YR 2.5/2	
Color	Munssel	Café muy oscuro	Café muy oscuro	Café muy oscuro	Café muy oscuro	
Textura	Arena %	Bouyoucos	55.56	70.56	75.56	62.56
	Limo %		36.64	24.64	19.64	29.64
	Arcilla %		7.8	4.8	4.8	7.8
Clasificación textural		Fa	Fa	Af	Fa	
Agua aprovechable		12	9	8	11	
Materia orgánica %	Walkey-Black	37.75	21.74	18.14	15.3	
C.I.C. meq/100 g	Acetato de amonio	100	61.6	51.8	53.55	
Cationes intercambiables						
Ca+Mg Meq/100 g	Volumetría	10.407	14.986	13.733	13.737	
Ca Meq /100 g	Volumetría	8.326	10.407	9.574	9.158	
Mg Meq /100 g	Calculado	2.081	4.579	4.163	5.579	
Na Meq/100g	Flamometría	0.218	1.131	0.787	0.84	
K Meq/100 g	Flamometría	1.089	4.971	9.12	4.704	
Fertilidad						
pH	Potenciómetro	4.55	6.01	6.61	6.33	
Nitrógeno nítrico ppm	Morgan	12.34	24.55	24.55	24.55	
Nitrógeno amoniacal ppm	Morgan	35	35	35	35	
Fósforo ppm	Morgan	25	50	50	50	
Potasio ppm	Morgan	180	250	250	250	
Calcio ppm	Morgan	1600	1600	1600	1600	
Magnesio ppm	Morgan	50	50	50	50	
Manganeso ppm	Morgan	No detectable	No detectable	No detectable	No detectable	
Conductividad eléctrica mili-mhos/cm a 25 °C	Conductímetro	0.43	1.01	1.38	1.38	

Las determinaciones se basan en la NOM -021-SEMARNAT-2000. Fecha: 12 de junio de 2015. Laboratorio de Agrología del CUCBA.

Table 5. Results of the laboratory analyses of the substrate mixtures bokashi compost, soil and jal.

Determination	Method	Soil witness	30% Bokashi+ 60% soil+10% Jal	50% Bokashi+ 40% soil+10% Jal	70% Bokashi+ 20% soil+10% Jal	
						Values
Real density g/cc	Pycnometer	1.32	1.95	1.85	1.57	
Apparent density g/cc	Probe	0.52	0.61	0.71	0.7	
Color (dry)	Munsell	7.5 YR 3/2	7.5 YR 3/2	7.5 YR 3/2	7.5 YR 3/2	
Color (dry)	Munsell	Dark brown	Dark gray	Dark gray	Dark gray	
Color (humid)	Munsell	7.5 YR 2.5/2	7.5 YR 2.5/2	7.5 YR 2.5/2	7.5 YR 2.5/2	
Color	Munsell	Very dark brown	Very dark brown	Very dark brown	Very dark brown	
Texture	Sand % Silt % Clay %	Bouyoucos	55.56	70.56	75.56	62.56
			36.64	24.64	19.64	29.64
			7.8	4.8	4.8	7.8
Textural classification		Fa	Fa	Af	Fa	
Available water		12	9	8	11	
Organic material %	Walkey-Black	37.75	21.74	18.14	15.3	
C.I.C. meq/100 g	Ammonium acetate	100	61.6	51.8	53.55	
Exchangeable cations						
Ca+Mg Meq/100 g	Volumetric	10.407	14.986	13.733	13.737	
Ca Meq /100 g	Volumetric	8.326	10.407	9.574	9.158	
Mg Meq /100 g	Calculated	2.081	4.579	4.163	5.579	
Na Meq/100g	Flamometry	0.218	1.131	0.787	0.84	
K Meq/100 g	Flamometry	1.089	4.971	9.12	4.704	
Fertility						
pH	Potentiometer	4.55	6.01	6.61	6.33	
Nitrate nitrogen ppm	Morgan	12.34	24.55	24.55	24.55	
Ammonia nitrogen ppm	Morgan	35	35	35	35	
Phosphorus ppm	Morgan	25	50	50	50	
Potassium ppm	Morgan	180	250	250	250	
Calcium ppm	Morgan	1600	1600	1600	1600	
Magnesium ppm	Morgan	50	50	50	50	
Manganese ppm	Morgan	Not detectable	Not detectable	Not detectable	Not detectable	
Electrical conductivity mili-mhos/cm a 25 °C	Conductometer	0.43	1.01	1.38	1.38	

Determinations based on NOM -021-SEMARNAT-2000. Date: 12 June 2015.
Laboratorio de Agrología, CUCBA.

Cuadro 6. Resultados de los análisis de laboratorio de las mezclas de sustratos vermicomposta y arena.

Determinación		Método	Testigo Arena	30% Vermicomposta + 70% Arena	50% Vermicomposta + 50% Arena	70% Vermicomposta + 30% Arena
Densidad real g/cc		Picnómetro	2.2	2	2.06	2.14
Densidad aparente g/cc		Probeta	1.26	1.19	1.01	0.96
Color (seco)		Munssel	2.5 Y 3/7	2.5 Y 3/7	2.5 Y 5/1	2.5 Y 5/1
Color (seco)		Munssel	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Gris	Gris
Color (Húmedo)		Munssel	2.5 Y 4/3	2.5 Y 4/3	2.5 Y 3/1	2.5 Y 3/1
Color		Munssel	Café oscuro	Café oscuro	Gris muy oscuro	Gris muy oscuro
Textura	Arena %	Bouyoucos	82.56	82.56	84.56	87.56
	Limo %		10.64	12.64	10.64	9.64
	Arcilla %		6.8	4.8	4.8	2.8
Clasificación textural			Af	Af	Af	A
Agua aprovechable			7	7	7	6
Materia orgánica %		Walkey-Black	0.69	2.06	6.77	12.5
C.I.C. meq/100 g		Acetato de amonio	7	4.5	22.75	36.75
Cationes intercambiables						
Ca+Mg Meq/100 g		Volumetría	2.914	6.244	10.407	15.403
Ca Meq /100 g		Volumetría	0.832	3.33	5.411	6.244
Mg Meq /100 g		Calculado	2.081	2.914	4.995	9.158
Na Meq/100g		Flamometría	0.247	0.279	0.503	0.686
K Meq/100 g		Flamometría	0.787	1.481	2.613	3.626
Fertilidad						
pH		Potenciómetro	6.65	7.34	7.29	7.28
Nitrógeno nítrico ppm		Morgan	4.15	4.15	24.55	24.55
Nitrógeno amoniacal ppm		Morgan	12	12	35	35
Fósforo ppm		Morgan	25	50	50	25
Potasio ppm		Morgan	180	250	250	250
Calcio ppm		Morgan	500	1200	1600	1600
Magnesio ppm		Morgan	50	50	50	50
Manganeso ppm		Morgan	5	No detectable	No detectable	No detectable
Conductividad eléctrica mili-mhos/cm a 25° C		Conductímetro	0.1	0.3	0.75	1.04

Table 6. Results of the laboratory analyses of the substrate mixtures vermicompost and sand.

Determination		Method	Sand witness	30% Vermicompost + 70% Sand	50% Vermicomposta + 50% Sand	70% Vermicompost + 30% Sand
Real density g/cc		Pycnometer	2.2	2	2.06	2.14
Apparent density g/cc		Test tube	1.26	1.19	1.01	0.96
Color (dry)		Munssel	2.5 Y 3/7	2.5 Y 3/7	2.5 Y5/1	2.5 Y 5/1
Color (dry)		Munssel	Pale yellow	Pale yellow	Gray	Gray
Color (humid)		Munssel	2.5 Y 4/3	2.5Y 4/3	2.5 Y 3/1	2.5 Y 3/1
Color		Munssel	Dark brown	Dark brown	Very dark gray	Very dark gray
Texture	Sand %	Bouyoucos	82.56	82.56	84.56	87.56
	Silt %		10.64	12.64	10.64	9.64
	Clay %		6.8	4.8	4.8	2.8
Textural classification			Af	Af	Af	A
Available water			7	7	7	6
Organic material %		Walkey-Black	0.69	2.06	6.77	12.5
C.I.C. meq/100 g		Ammonium acetate	7	4.5	22.75	36.75
Exchangeable cations						
Ca+Mg Meq/100 g		Volumetric	2.914	6.244	10.407	15.403
Ca Meq /100 g		Volumetric	0.832	3.33	5.411	6.244
Mg Meq /100 g		Calculated	2.081	2.914	4.995	9.158
Na Meq/100g		Flamometry	0.247	0.279	0.503	0.686
K Meq/100 g		Flamometry	0.787	1.481	2.613	3.626
Fertility						
pH		Potentiometer	6.65	7.34	7.29	7.28
Nitrate nitrogen ppm		Morgan	4.15	4.15	24.55	24.55
Ammonia nitrogen ppm		Morgan	12	12	35	35
Phosphorus ppm		Morgan	25	50	50	25
Potassium ppm		Morgan	180	250	250	250
Calcium ppm		Morgan	500	1200	1600	1600
Magnesium ppm		Morgan	50	50	50	50
Manganese ppm		Morgan	5	Not detectable	Not detectable	Not detectable
Electrical conductivity mili-mhos/cm a 25° C		Conductometer	0.1	0.3	0.75	1.04

Cuadro 7. Resultados fisicoquímicos del análisis de agua.

Parámetro	Resultados	Clasificación
Conductividad eléctrica	0.138	
pH	6.8	
Calcio (meq/L)	0.128	
Magnesio (meq/L)	0.120	
Potasio (meq/L)	0.027	
Sodio (meq/L)	1.070	
NH ₄ (meq/L)	0.0005	
Hierro (meq/L)	0.0011	
Cobre (meq/L)	0.0009	
Manganeso (meq/L)	0.00004	
Zinc (meq/L)	0.0003	
Boro (meq/L)	0.032	
RAS	3.040	
Salinidad efectiva (meq/L)	1.097	BUENA
Salinidad potencial (meq/L)	0.340	BUENA
Carbonato de Sodio Residual	0.550	BUENA
Sólidos totales disueltos (mg/L)	88.32	
Sulfatos (meq/L)	0.410	
Cloruros (meq/L)	0.135	
Nitratos (meq/L)	0.031	
Fosfatos (meq/L)	0.004	
Carbonatos (meq/L)	0.0	
Bicarbonatos (meq/L)	0.80	

miento y en el Cuadro 9 los requerimientos del cultivo por etapa fenológica.

Variables evaluadas

Las variables que se evaluaron en las plantas y los frutos fueron:

Longitud de tallo. Se determinó mediante un flexómetro graduado en centímetros, a partir de la base del tallo hasta el ápice.

Grosor de tallo. Se midió con un vernier digital modelo 3416, marca *Control Company*, que se colocó a la mitad de la longitud total del tallo. Los valores se expresaron en milímetros.

Número de hojas. Se contaron las hojas formadas a partir del ápice y hasta la base del tallo.

Rendimiento. Se pesaron los frutos producidos por cada planta con la balanza “Adventurer” modelo Ohaus. El peso se determinó en gramos.

Table 7. Physicochemical results of water analysis.

Parameter	Results	Classification
Electrical Conductivity	0.138	
pH	6.8	
Calcium (meq/L)	0.128	
Magnesium (meq/L)	0.120	
Potassium (meq/L)	0.027	
Sodium (meq/L)	1.070	
NH ₄ (meq/L)	0.0005	
Iron (meq/L)	0.0011	
Copper (meq/L)	0.0009	
Manganese (meq/L)	0.00004	
Zinc (meq/L)	0.0003	
Boron (meq/L)	0.032	
RAS	3.040	
Effective salinity (meq/L)	1.097	GOOD
Potential salinity (meq/L)	0.340	GOOD
Residual sodium carbonate	0.550	GOOD
Total dissolved solids (mg/L)	88.32	
Sulfates (meq/L)	0.410	
Chlorides (meq/L)	0.135	
Nitrates (meq/L)	0.031	
Phosphates (meq/L)	0.004	
Carbonates (meq/L)	0.0	
Bicarbonates (meq/L)	0.80	

Stem thickness: measured with a *Control Company* model 3416 digital vernier placed at the halfway point of the stem; values expressed in millimeters.

Number of leaves: all leaves formed from the apex to the base of the stem were counted.

Yield: the fruits produced by every plant were weighed on an *Ohaus Adventurer* model balance; all weights were recorded in grams.

Experimental design

A completely randomized experimental design was used. An analysis of variance was conducted with comparison of means using a Tukey test ($p \leq 0.01$). In all cases, the statistical package *Number Cruncher Statistical System* version 2007 was employed (NCSS, UTA, USA).

Cuadro 8. Requerimientos nutricionales para pimiento morrón.

Elemento	ppm
Nitrógeno	200
Fósforo	80
Potasio	160
Calcio	280
Magnesio	50
Fierro	0.56
Manganeso	0.56
Cobre	0.03
Zinc	0.26
Boro	0.22
Molibdeno	0.05

Fuente: Sánchez del Castillo y Escalante, 1988.

Cuadro 9. Fertilizantes aplicados de acuerdo con las etapas fenológicas de pimiento morrón.

Fertilizante	Etapa inicial	Etapa vegetativa	Etapa fructificación
	Cubeta de 19 L.	Tanque 200 litros	Tanque 200 litros
H ₃ PO ₄	gramos o ml	gramos o ml	gramos o ml
H ₃ PO ₄	16.1 ml	50 ml	50 ml
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	23.31 g	245.25 g	161.25 g
NO ₃ K	21.6 g	227.35 g	365 g
(NO ₃) ₂ Ca . 4H ₂ O	35.9 g	377.8 g	516 g
Fierro	1.5 ml	31.57 ml	31.00 ml
Micronutrientes Co, B, Mo, Mn, Zn	1.5 ml	31.57 ml	31.00 ml

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza y como prueba de comparación de medias se usó Tukey ($p \leq 0.01$). En todos los casos se manejó el paquete estadístico *Number Cruncher Statistical System* (NCSS, UTA, USA), versión 2007.

Resultados y discusión

En el Cuadro 10 se presentan los resultados del análisis de varianza. En todos los casos hubo diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en las F calculadas de las fuentes de variación fecha de evaluación, tratamiento y aplicación de algas marinas, en el efecto sobre las variables longitud de tallo,

Table 8. Nutritional requirements of bell peppers.

Element	ppm
Nitrogen	200
Phosphorus	80
Potassium	160
Calcium	280
Magnesium	50
Iron	0.56
Manganese	0.56
Copper	0.03
Zinc	0.26
Boron	0.22
Molybdenum	0.05

Source: Sánchez del Castillo and Escalante, 1988.

Table 9. Fertilizers applied according to phenological stages of bell peppers.

Fertilizer	Initial astage	Vegetative stage	Fructification stage
	19-liter bucket	200-liter tank	200-liter tank
Fertilizer	grams or ml	grams or ml	grams or ml
H ₃ PO ₄	16.1 ml	50 ml	50 ml
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	23.31 g	245.25 g	161.25 g
NO ₃ K	21.6 g	227.35 g	365 g
(NO ₃) ₂ Ca, 4H ₂ O	35.9 g	377.8 g	516 g
Iron	1.5 ml	31.57 ml	31.00 ml
Micronutrients Co, B, Mo, Mn, Zn	1.5 ml	31.57 ml	31.00 ml

Results and Discussion

Table 10 presents the results of the analysis of variance. Significant differences were found in all cases ($p \leq 0.01$) of F calculated for the sources of variation, evaluation date, treatment, and application of marine algae, in the effect on the variables stem length and thickness, and number of leaves. Data represent 6 evaluation dates.

Table 11 shows the mean results of the effect of evaluation date on the variables evaluated. Stem length was greater on dates 5 and 6, while values for stem thickness increased from dates 3 to 6. Number of leaves was higher on dates 3 and 5, but it is important to note that the lower values on dates 4 and 6 were due to sanitary

Cuadro 10. Resultados del análisis de varianza para las fuentes de variación fecha de evaluación, tratamiento y algas marinas en la evaluación de sustratos en pimiento.

Fuentes de variación	Longitud de tallo F calculada	Grosor de tallo F calculada	Número de hojas F calculada
Fecha de evaluación	228.35 **	21.94 **	138.8 **
Tratamiento	41.52 **	2.85 **	16.29 **
Aplicación de algas	2.44	2.38	3.41

** significativo ($p \leq 0.01$)

Cuadro 11. Prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.01$) para el efecto de las fechas de evaluación en las variables de desarrollo de plantas pimiento.

Fechas de evaluación	Longitud de tallo (cm)	Grosor de tallo (mm)	Número de hojas
1	11.92 c	4.15 b	13.22 c
2	12.28 c	4.19 b	11.76 d
3	15.14 b	5.20 a	20.56 b
4	22.41 b	5.79 a	13.61 c
5	26.48 a	6.24 a	27.51 a
6	26.94 a	6.24 a	11.34 d
Tukey ($p \leq 0.01$)	4.75	2.57	4.75

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.01$).

grosor de tallo y número de hojas. Lo datos se corresponden a seis fechas de evaluación.

En el Cuadro 11 se aprecian los resultados promedio del efecto de las fechas de evaluación sobre las variables evaluadas. La longitud de tallo fue mayor en las fechas número cinco y seis. En el caso del grosor de tallo, a partir de la tercera fecha y hasta la sexta se observó un incremento en los valores. El número de hojas resultó mayor en la tercera y quinta fecha; cabe aclarar que los valores menores de la cuarta y sexta fecha se debieron a que se realizaron podas sanitarias de hojas para el control de *Cenicilla*. En el caso de longitud y grosor de tallo, los valores fueron incrementándose conforme avanzaron las fechas de evaluación durante el desarrollo de las plantas.

En el Cuadro 12 y Figuras 2–8, se observó el efecto de los tratamientos sobre las variables que se evaluaron. Los tratamientos que generaron mayor longitud de tallo y número de hojas fueron el número 8 (70 % Vermicomposta 30 % Arena)

Table 10. Results of variance analysis for sources of variation, evaluation date, treatment, and marine algae in the evaluation of substrates with peppers.

Sources of variation	Stem length F calculated	Stem thickness F calculated	Number of leaves F calculated
Evaluation date	228.35 **	21.94 **	138.8 **
Treatment	41.52 **	2.85 **	16.29 **
Application of algae	2.44	2.38	3.41

** significant ($p \leq 0.01$)

Table 11. Comparison of means with Tukey test ($p \leq 0.01$) for the effect of evaluation dates on the variables of pepper plant development.

Evaluation dates	Stem length (cm)	Stem thickness (mm)	Number of leaves
1	11.92 c	4.15 b	13.22 c
2	12.28 c	4.19 b	11.76 d
3	15.14 b	5.20 a	20.56 b
4	22.41 b	5.79 a	13.61 c
5	26.48 a	6.24 a	27.51 a
6	26.94 a	6.24 a	11.34 d
Tukey ($p \leq 0.01$)	4.75	2.57	4.75

Means with the same letter are statistically equal (Tukey $p \leq 0.01$).

pruning conducted to control for *Cenicilla*. In the cases of stem length and thickness, values increased as plant development advanced through the evaluation dates.

Table 12 and Figures 2-8 show the effect of treatments on the variables evaluated. The treatments that generated greatest stem length and number of leaves were #8 (70% vermicompost 30% sand), and #12 (70% bokashi 20% soil 10% jal). For stem thickness, the treatment that produced the highest values was #11 (50% bokashi 40% soil 10% jal). It is highly likely that these results were obtained because the aforementioned treatments had values of organic material of 12.5-to-15.3% (Tables 5, 6), a capacity for cationic exchange of 36.7-to-53.33 meq/100 g, exchangeable cations Ca + Mg of 13.73-to-15.40 meq/100 g, K between 3.62 and 4.70, pH of 6.33-to-7.28, and electrical conductivity between 1.04 and 1.38 milimhos/cm at 25 °C. With regard to the percentages of particle size, for the substrate of treatment 8 (70% vermicompost 30% sand) the study found <1.5 mm = 48.98%

Cuadro 12. Prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.01$) para el efecto de los tratamientos en las variables de desarrollo de plantas de pimiento.

Tratamiento	Descripción del tratamiento	Longitud de tallo (cm)	Grosor de tallo (mm)	Número de hojas
1	Testigo Tezontle	16.5 b	5.38 ab	16.08 d
2	70%Tezontle 30%Estopa	17.2 b	5.33 ab	15.27 d
3	50%Tezontle 50%Estopa	16.7 b	5.44 ab	12.38 f
4	70% Estopa 30% Tezontle	15.9 c	5.19 ab	12.30 f
5	Testigo Arena	16.1 b	5.16 ab	12.77 e
6	70% Arena 30% Vermicomposta	21.5 b	5.67 ab	16.72 c
7	50% Arena 50% Vermicomposta	18.7 b	5.83 ab	16.28 d
8	70% Vermicomposta 30% Arena	25.8 a	5.06 ab	21.5 a
9	Testigo Suelo	13.10 c	4.75 b	14.8 d
10	30% Bocashi 60% Suelo 10% Jal	21.6 b	4.56 b	18.72 b
11	50% Bocashi 40% Suelo 10% Jal	19.7 b	6.34 a	17.94 b
12	70%Bocashi 20%Suelo 10% Jal	27.0 a	4.93 b	21.16 a
Tukey ($p \leq 0.01$)		4.75	4.75	5.29

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.01$).

Table 12. Comparison of means with Tukey test ($p \leq 0.01$) for the effect of treatments on the variables of pepper plant development.

Treatment	Description of treatment	Stem length (cm)	Stem thickness (mm)	Number of leaves
1	Tezontle Witness	16.5 b	5.38 ab	16.08 d
2	70%Tezontle 30%Coir	17.2 b	5.33 ab	15.27 d
3	50%Tezontle 50%Coir	16.7 b	5.44 ab	12.38 f
4	70% Coir 30% Tezontle	15.9 c	5.19 ab	12.30 f
5	Sand Witness	16.1 b	5.16 ab	12.77 e
6	70% Sand 30% Vermicompost	21.5 b	5.67 ab	16.72 c
7	50% Sand 50% Vermicompost	18.7 b	5.83 ab	16.28 d
8	70% Vermicompost 30% Sand	25.8 a	5.06 ab	21.5 a
9	Soil Witness	13.10 c	4.75 b	14.8 d
10	30% Bokashi 60% Soil 10% Jal	21.6 b	4.56 b	18.72 b
11	50% Bokashi 40% Soil 10% Jal	19.7 b	6.34 a	17.94 b
12	70%Bokashi 20%Soil 10% Jal	27.0 a	4.93 b	21.16 a
Tukey ($p \leq 0.01$)		4.75	4.75	5.29

Means with the same letter are statistically equal (Tukey $p \leq 0.01$).

y el número 12 (70 % Bocashi 20 % Suelo 10 % Jal). En el caso del grosor de tallo el tratamiento que generó valores más altos fue el número 11 (50 % Bocashi 40 % Suelo 10 % Jal). Los resultados obtenidos es muy probable que se haya producido a causa que los tratamientos mencionados presentaron valores (Cuadro 5 y 6) de materia orgánica entre 12.5 % y 15.3 %, una capacidad de intercambio catiónico entre 36.7 meq/100 g y 53.33 meq/100 g, cationes intercambiables Ca + Mg entre 13.73 y 15.40 meq/100 g, K entre 3.62 y 4.70, un pH entre 6.33 y 7.28 y una conducti-

and 3-to-1.5 mm = 20.92%; in treatment 12 (70% bokashi 20% soil 10% jal) findings were <1.5 mm = 52.85% and 3-to-1.5 mm = 18.13%; and in treatment 11 (50% bokashi 40% soil 10% jal), <1.5 mm = 44.81% and 3-to-1.5 mm = 14.21%. According to Ansorena (1994), the optimal particle size for horticultural substrates is 0.25-to-2.5 mm, while Baldomero (2007) points out that the presence of small particles reduces total porosity while increasing the amount of retained water due to a higher number of micropores or small hollows where water can be retained. Also, this condition



Figura 2. Plantas de pimiento en mezclas de sustrato con tezontle y estopa de coco.



Figure 2. Bell pepper plants in substrate mixtures with tezontle and coconut coir.



Figura 3. Plantas de pimiento en el sustrato de arena.



Figure 3. Bell pepper plants in the substrate of sand.



Figura 4. Plantas de pimiento en mezclas de sustrato con arena y vermicomposta.



Figure 4. Bell pepper plants in substrate mixtures with sand and vermicompost.



Figura 5. Plantas de pimiento en suelo.



Figure 5. Bell pepper plants in soil.



Figura 6. Plantas de pimiento en mezcla de composta Bocashi y suelo.



Figure 6. Bell pepper plants in the mixture of bokashi compost and soil.



Figura 7. Plantas de pimiento desarrollándose en mezclas de sustratos (tezontle y estopa de coco, arena y vermicomposta, suelo y composta Bocashi).



Figure 7. Bell pepper plants developing in substrate mixtures (tezontle and coconut coir, sand and vermicompost, soil and bokashi compost).



Figura 8. Plantas de pimiento fructificando en mezclas de sustratos (tezontle y estopa de coco, arena y vermicomposta, suelo y composta Bocashi).



Figure 8. Bell pepper plants fructifying in substrate mixtures (tezontle and coconut coir, sand and vermicompost, soil and bokashi compost).

vidad eléctrica entre 1.04 y 1.38 milimhos/cm a 25 °C. También el porcentaje de partículas en el sustrato del tratamiento 8 (70 % Vermicomposta 30 % Arena) fue de tamaño < 1.5 mm = 48.98 % y de entre 3 y 1.5 mm = 20.92 %; en el 12 (70 % Bocashi 20 % Suelo 10 % Jal) fueron < 1.5 mm = 52.85 % y de entre 3 y 1.5 mm = 18.13 %; en el 11 (50 % Bocashi 40 % Suelo 10 % Jal) fueron < 1.5 mm = 44.81 % y de entre 3 y 1.5 mm = 14.21 %. Según Ansorena (1994), el tamaño óptimo de partículas para sustratos hortícolas

reduces the porosity occupied by air by decreasing the volume of the hollows between particles or macropores, which are larger. Principle characteristics include the medium-to-high capacity of easily-available water, a high specific surface, low permeability, high micro-porosity, and high humidity retention energy (Masaguer 2007).

Table 13 shows the results of the application of marine algae. Values for the variables stem length and thickness, and number of leaves re-

Cuadro 13. Prueba de comparación de medias para el efecto de la aplicación de algas marinas en las variables de desarrollo de plantas de pimiento.

Bioestimulante	Longitud de tallo (cm)	Grosor de tallo (mm)	Número de hojas
Con algas	18.99 a	5.19 a	15.28 a
Sin algas	20.20 a	5.41 a	17.38 a
Tukey (p≤0.01)	2.57	3.64	3.64

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey p≤0.01).

Cuadro 14. Resultados del análisis de varianza de la variable rendimiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
Tratamiento	11	506734.3	46066.76	5.26 **
Aplicación de algas	1	386442.1	386442.1	44.14 **
Interacción	11	465082.1	42280.19	4.83 **
Error	48	420201.2	8754.191	
Total	72	1778460		

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey p≤0.01).

se ubica entre 0.25 y 2.5 mm. Baldomero (2007) por su parte, señaló que la presencia de partículas pequeñas hace que disminuya la porosidad total y aumente la cantidad de agua retenida, ya que crece del número de microporos o huecos pequeños, que son los que retienen agua. También se reducirá la porosidad ocupada por el aire, al disminuir el volumen de los huecos entre partículas o macroporos, que son los de mayor tamaño. Entre las principales características destacan una capacidad de agua fácilmente disponible de media a alta, alta superficie específica, baja permeabilidad, alta microporosidad y elevada energía de retención de humedad (Masaguer 2007).

En el Cuadro 13 se muestran los resultados de la aplicación de algas marinas. Los valores de las variables longitud y grosor de tallo, y número de hojas no presentaron diferencias estadísticas con la aplicación de algas marinas. Si se considera que la aplicación de las algas marinas se hizo en drench, valdría la pena hacer evaluaciones con aplicaciones foliares. Fajardo (2011) reportó que al aplicar algas marinas vía foliar observó un incremento en la longitud de hoja de lechuga; mientras Miller (2003) lo mismo, pero en pepino.

Table 13. Comparison of means for the effect of application of marine algae on the variables of pepper plant development.

Bio-stimulant	Stem length (cm)	Stem thickness (mm)	Number of leaves
With algae	18.99 a	5.19 a	15.28 a
Without algae	20.20 a	5.41 a	17.38 a
Tukey (p≤0.01)	2.57	3.64	3.64

Means with the same letter are statistically equal (Tukey p≤0.01).

Table 14. Results of variance analysis for the variable yield.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F calculated
Treatment	11	506734.3	46066.76	5.26 **
Application of algae	1	386442.1	386442.1	44.14 **
Interaction	11	465082.1	42280.19	4.83 **
Error	48	420201.2	8754.191	
Total	72	1778460		

Means with the same letter are statistically equal (Tukey p≤0.01).

vealed no statistically-significant differences with the application of marine algae. Considering that marine algae were applied in drench form, it would be worthwhile conducting evaluations using foliar applications, as Fajardo (2011) reported that applying algae via foliar increased the length of lettuce leaves, and Miller (2003) had similar findings with cucumbers.

Table 14 presents the results of the analysis of variance for the variable yield. The F values calculated for the sources of variation in treatment, application of algae, and the interaction of these two factors (treatment × algae) produced differences that were highly statistically-significant.

Table 15 includes the results of the comparison of means using a Tukey test ($p \leq 0.01$) for the effect of treatments on the variable yield. The highest yields were produced by the plants with the treatments of 70% vermicompost 30% sand, 70% bokashi 20% soil 10% jal, 50% sand 50% vermicompost and 50% tezontle 50% coir.

When applied to soil vermicompost increased organic material and improved some physical characteristics, such as the amount of hydro-sta-

Cuadro 15. Prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.01$) para el efecto de tratamientos en la variable rendimiento.

Tratamiento	Descripción del tratamiento	Rendimiento (g)
1	Testigo tezontle	118.815 d
2	70%Tezontle 30%estopa	206.61 c
3	50%Tezontle 50%estopa	310.77 a
4	70% Estopa 30% tezontle	184.18 c
5	Testigo arena	107.11 d
6	70% Arena 30% vermicomposta	202.89 c
7	50% Arena 50% vermicomposta	319.07 a
8	70% Vermicomposta 30% arena	393.73 a
9	Testigo suelo	245.38 b
10	30% Bokashi 60% suelo 10% jal	248.00 b
11	50% Bokashi 40% suelo 10% jal	238.85 b
12	70%Bokashi 20% suelo 10% jal	348.04 a
Tukey ($p \leq 0.01$)		5.68

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.01$).

En el Cuadro 14 se observan los resultados del análisis de varianza para la variable rendimiento. Los valores de la F calculada para las fuentes de variación tratamiento, aplicación de algas y la interacción (tratamiento \times algas) presentaron diferencias altamente significativas.

En el Cuadro 15 se incluyen los resultados de la prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.01$) para el efecto de tratamientos en la variable rendimiento. Los rendimientos más altos los produjeron las plantas con los tratamientos de 70 % Vermicomposta 30 % Arena, 70 % Bokashi 20 % Suelo 10 % Jal, 50 % Arena 50 % Vermicomposta y 50 % Tezontle 50 % Estopa.

La Vermicomposta aplicada al suelo aumenta la materia orgánica y mejora algunas de sus características físicas, como la cantidad de agregados hidro-estables, la densidad aparente y la porosidad, que favorecen el flujo de aire y agua y el desarrollo radicular de las plantas (Azarmi 2008). Benítez *et al.* (2012) reportaron un incremento del 15 % en el número de vainas de frijol, debido al contenido de Vermicompost (3 %). Fernández-Luqueño *et al.* (2010) señalaron que la adición de Vermicompost al suelo aumentó la cosecha de frijol, lo que estuvo relacionado positivamente con la producción de biomasa y el aumento de N disponible. El aumento en el rendimiento obtenido en pimiento puede explicarse

Table 15. Comparison of means with Tukey test ($p \leq 0.01$) for the effect of treatments on the variable yield.

Treatment	Description of treatment	Yield (g)
1	Tezontle Witness	118.815 d
2	70%Tezontle 30%Coir	206.61 c
3	50%Tezontle 50%Coir	310.77 a
4	70% Coir 30% tezontle	184.18 c
5	Sand Witness	107.11 d
6	70% Sand 30% Vermicompost	202.89 c
7	50% Sand 50% Vermicompost	319.07 a
8	70% Vermicompost 30% Sand	393.73 a
9	Soil Witness	245.38 b
10	30% Bokashi 60% Soil 10% jal	248.00 b
11	50% Bokashi 40% Soil 10% jal	238.85 b
12	70%Bokashi 20% Soil 10% jal	348.04 a
Tukey ($p \leq 0.01$)		5.68

Means with the same letter are statistically equal (Tukey $p \leq 0.01$).

ble aggregates, apparent density and porosity, thus favoring the flow of air and water and the radicular development of the plants (Azarmi 2008). Benítez *et al.* (2012) reported an increase of 15% in the number of bean pods due to vermicompost content (3%). Fernández-Luqueño *et al.* (2010) pointed out that adding vermicompost to soil increased bean harvests through a positive relation with the production of biomass and an increase in the amount of N available. The increase in yield obtained in peppers can be explained as the result of the contribution of humic acids and phytohormones (Aracon *et al.* 2006) that promote plant growth and development (Roy *et al.* 2010). The dehydrogenase activity of the microbial population of the vermicompost accelerates the degradation of organic material, thus contributing to increasing yields (Aracon *et al.* 2005).

According to Cavender *et al.* (2003), organic products incorporated into the soil improve fertility in general. Girón *et al.* (2012) reported increased yields of zucchini and chard, lettuce and beets with the application of bokashi compost, stating that this incorporates organisms that help decompose organic material by generating a larger availability of nutrients for the crop. Álvarez *et al.* (2010) reported increased yields of corn due to the effect of applying organic fertilizers (compost, bokashi and lombriabono) and the

como el resultado de su aporte de ácidos húmicos y fitohormonas (Aracon *et al.* 2006) que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas (Roy *et al.* 2010). La actividad deshidrogenasa de la población microbiana de la Vermicomposta, acelera la degradación de la materia orgánica, lo que contribuye a incrementar el rendimiento de los cultivos (Aracon *et al.* 2005).

Según Cavender *et al.* (2003), los productos orgánicos incorporados al suelo en general mejoran la fertilidad del suelo. Girón *et al.* (2012) reportó incremento en el rendimiento de calabacín, acelga, lechuga, remolacha, por la aplicación de composta Bocashi y señala que incorpora organismos que ayudan a la descomposición de la materia orgánica produciéndose una mayor disponibilidad de nutrientes para el cultivo. Álvarez *et al.* (2010) reportaron un incremento en el rendimiento de maíz por efecto de aplicación de abonos orgánicos (Composta, Bocashi y Lombrianono) y la actividad ureasas y fosfatasas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos y de nutrición, ya que liberan el ión ortofosfato de compuestos orgánicos e inorgánicos quedando disponible para las plantas.

El Tezontle es un material considerado como inerte desde el punto de vista químico, cuyo extracto de saturación tiene un pH próximo a la neutralidad, su capacidad de intercambio catiónico es muy baja, buena aireación, retención de humedad que varía con el diámetro de las partículas, está libre de sustancias tóxicas y tiene buena estabilidad física (Bastida 1999). La determinación de nutrimentos en la solución de suelo (Castellanos 2004), así como la concentración de nutrimentos en solución nutritiva de suministro y drenaje en el caso del Tezontle, y el manejo hídrico, son estrategias fundamentales para maximizar rendimientos. Al respecto Ojodeagua *et al.* (2008) reportaron un rendimiento similar entre Suelo y Tezontle para el cultivo de "jitomate" que osciló entre 30.4 y 34.1 kg m⁻² respectivamente. Los frutos pequeños y medianos presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Aunque el tratamiento de Suelo obtuvo el porcentaje más alto de frutos extra grandes y el menor en tamaños medianos, no hubo diferencias significativas con los tratamientos de Tezontle.

activity of ureas and phosphates related to the biogeochemical and nutrition cycles, since they release the orthophosphate ion of organic and inorganic compounds, thus making it available to the plants.

Tezontle is a material considered chemically inert with a saturation extract whose pH is near neutral. Its capacity for cationic exchange is very low, it has good aeration and humidity retention that varies with particle diameter, is free of toxic substances, and has good physical stability (Bastida 1999). Fundamental strategies for maximizing yields include determining the nutrients in the soil solution (Castellanos 2004) and the concentration of nutrients in the nutritional solution administered, as well as drainage, in the case of tezontle, together with hydric management. In this regard, Ojodeagua *et al.* (2008) reported similar yields with soil and tezontle for a crop of tomatoes that varied from 30.4-to-34.1 kg m⁻² respectively. The small and medium-sized fruits showed significant differences between treatments. Although the soil treatment produced the highest percentage of extra-large fruits and the lowest percentage of medium-sized ones, there were no significant differences with the tezontle treatments.

Table 16 presents the results of the comparison of means for the effect of the application of marine algae on yields of pepper plants. Here, the plants that did not receive marine algae had the highest yields. These results coincide with those reported by Mazuela (2012) for cherry tomatoes in that no significant differences were obtained from the plants grafted with the application of the product *Fartum*[®] that contains marine algae. Goykovic and Saavedra (2007) indicated that this may be due to the reduced accumulation of water in the fruit, because upon increasing the concentration of solutes in the irrigation water the hydric potential is reduced and the plants have difficulty in absorbing it.

Conclusions

These results lead to the following conclusions:

Cuadro 16. Prueba de comparación de medias para el efecto de la aplicación de algas marinas en el rendimiento de plantas de pimiento.

Bioestimulante	Rendimiento (g)
Con algas	170.36 b
Sin algas	316.88 a
Tukey ($p \leq 0.01$)	3.79

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.01$).

En el Cuadro 16 se incluyen los resultados de la prueba de comparación de medias para el efecto de aplicación de algas marinas en el rendimiento de las plantas de pimiento. Las plantas a las que no se aplicaron algas marinas presentaron los mayores rendimientos. Los resultados coinciden con lo reportado por Mazuela (2012) en tomate cherry en los que no se obtuvieron diferencias significativas en plantas injertadas con la aplicación del producto Fartum®, que contiene algas marinas. Goykovic y Saavedra (2007) indicaron que esto tal vez se debió a la disminución en la acumulación de agua en el fruto, ya que al incrementarse la concentración de solutos en el agua de riego el potencial hídrico se reduce y las plantas experimentan dificultades para absorberla.

Conclusiones

Por lo anterior, se puede concluir que:

Las mezclas de sustratos generaron los valores más altos para la longitud de tallo, grosor de tallo y número de hojas durante la quinta y sexta fecha de evaluación.

Los tratamientos que generaron mayor longitud de tallo, número de hojas y rendimiento fueron la mezcla de 70 % Vermicomposta 30 % Arena, 70 % Bocashi 20 % Suelo 10 % Jal.

El rendimiento también resultó elevado en los tratamientos de 50% Arena 50% vermicomposta y 50% tezontle 50% Estopa de coco. En el caso del grosor de tallo el tratamiento que generó valores más altos fue la mezcla de 50 % Bocashi 40 % Suelo 10 % Jal.

Table 16. Comparison of means for the effect of the application of marine algae on the yield of pepper plants.

Bio-stimulant	Yield (g)
With algae	170.36 b
Without algae	316.88 a
Tukey ($p \leq 0.01$)	3.79

Means with the same letter are statistically equal (Tukey $p \leq 0.01$).

The substrate mixtures generated the highest values for stem length and thickness, and number of leaves on evaluation dates 5 and 6.

The treatments that generated the greatest stem length, number of leaves, and yields were the mixture of 70% vermicompost 30% sand, 70% bokashi 20% soil 10% jal.

Yields were also higher with the treatments of 50% sand 50% vermicompost and 50% tezontle 50% coconut coir. For stem thickness, the highest values were found for the mixture of 50% bokashi 40% soil 10% jal.

Applying marine algae had no effect on stem length or thickness, number of leaves, or yield in the pepper plants.

Acknowledgments

The authors thank PROFOCIE 2014 and PRO-DEP for financing this research, and the support provided by the *Fortalecimiento de Cuerpos Académicos* program (UDG-CA-55 Protected Crops, IDCA 73). Two anonymous reviewers contributed to improving the document with their observations. ❖

La aplicación de algas marinas no tuvo efecto en la longitud de tallo, grosor de tallo número de hojas y rendimiento en las plantas de pimiento.

Agradecimientos

Los autores agradecen a PROFOCIE 2014 y PRO-DEP por el financiamiento otorgado para la realización de la investigación con el apoyo recibido de Fortalecimiento de Cuerpos Académicos UDG-CA-55 Cultivos Protegidos IDCA 73. Dos revisores anónimos contribuyeron a mejorar el documento con sus observaciones. ❖

Bibliografía | Bibliography

- ABAD, M. & P. NOGUERA. 2000.** *Los sustratos en los cultivos sin suelo.* En: M. Urrestarazu (ed). *Manual de cultivo sin suelo.* 2ª ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp 137–185. [ISBN: 84-8240-239-0]
- ABAD, M., P. NOGUERA & C. CAMÓN. 2005.** *Sustratos para el cultivo sin suelo y Fertirrigación.* En: C. Cadahia (coord.). *Fertirrigación cultivos hortícolas y ornamentales.* 3ra ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp 299–352. [ISBN: 84-8476-247-5]
- ÁLVAREZ, S.J.D., D.A. GÓMEZ V., N.S. LEÓN M. & F.A. GUTIÉRREZ M. 2010.** Manejo integrado de fertilizantes y abonos orgánicos en el cultivo de maíz. *Agrociencia* **44:** 575–586. [ISSN: 1405-3195]
- ANSORENA, J. 1994.** *Sustratos. Propiedades y caracterización.* Mundi-Prensa. Madrid, España. [ISBN: 9788471144812]
- ARANCON, Q.N., C.A. EDWARDS, P. BIERMAN, J.D. METZGER & C. LUTCH. 2005.** Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. *Pedobiology* **49:** 297–306. [ISSN: 0031-4056]
- ARANCON, Q.N., C.A. EDWARDS, S. LEE & R. BYRNE. 2006.** Effects of humic acids from vermicompost on plant growth. *European Journal of Soil Biology* **45:** 65–69. [ISSN: 1164-5563]
- AZARMI, R., M. TORABI G. & R. DIDAR T. 2008.** Influence of vermicompost on soil chemical and physical properties in tomato (*Lycopersicon esculentum*) *African Journal of Biotechnology* **7(14):** 2397–2401. [ISSN: 1684-5315]
- BALDOMERO, H. Z. N. 2007.** Producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hidropónico con sustratos bajo invernaderos. Yolanda Donaji Ortiz Hernández. Maestro en Ciencias. Centro Interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional-Unidad Oaxaca. Maestría en Ciencias en Conservación y aprovechamiento de recursos naturales. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, México.
- BASTIDA, A. 1999.** El Medio de Cultivo de las Plantas. Sustratos para Hidroponía y Producción de Plantas Ornamentales. Serie de publicaciones AGRIBOT No. 4 UACH. Preparatoria Agrícola, Chapingo, Mexico 72 pp.
- BURÉS, S. 1998.** *Introducción a los sustratos. Aspectos generales.* En: J. Narciso Pastor Saenz (ed.). *Tecnología de sustratos. Aplicación a la producción viverística ornamental, hortícola y forestal.* Universitat de Lleida. pp 19–31.
- CASTELLANOS, J.Z. 2004.** *Manejo de la fertirrigación en suelo.* En: J.Z. Castellanos (ed.). *Manual de Producción Hortícola en Invernadero.* 2ª ed. INTAGRI. México. Pp 103–123.
- CAVENDER, D., N. R. ATIYEH M. & M. KNEE. 2003.** Vermicompost stimulates mycorrhizal colonization of roots of Sorghum bicolor at the expense of plant growth. *Pedobiology* **47:** 85–89. [ISSN: 0031-4056]

- FAJARDO, A.R., F.MARTÍNEZ, L. H.RAMOS, M. CABRERA & Y. BORRERO. 2011.** Efecto del bioestimulante (fitomas) y el biofertilizante (bioplasma) en el rendimiento de la lechuga variedad Anaida bajo condiciones de organoponía semi-protegida. *Agrotecnia de Cuba* 35(1): 54–60. [ISSN: 2079-3472]
- FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F., V. REYES-VARELA, C. MARTÍNEZ-SUÁREZ, G. SALOMÓN-HERNÁNDEZ, J. YAÑEZ-MENESES, J. M. CEBALLOS-RAMÍREZ & L. DENDOOVEN. 2010.** Effect of different nitrogen source on plant characteristics and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioresource Technology* 101: 396–403. [ISSN: 0960-8524]
- GIRÓN, C.E.C., C.E.F. MARTÍNEZ O. & M.P. MONTERROZA D. 2012.** Influencia de la aplicación de Bocashi y Lombriabono en el rendimiento de calabacín (*Cucurbita pepo* L., espinaca (*Spinacia oleracea* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y remolacha (*Beta vulgaris* L.), bajo el método de cultivo biointensivo, San Ignacio, Chalatenengo. Ing. Carlos Alberto Aguirre Castro, Manuel de Jesús Hernández Juárez y Dr. Francisco Lara Ascencio. Departamento de recursos naturales y medio ambiente, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de el Salvador. Ciudad Universitaria.
- GISLEROD, H.R., R. BAAS, M. WAR-MENHOVEN & D. BERG. 1997.** Effect of aeration on rooting of growth of roses. *Acta Horticulturae* 450: 113–122. [ISSN Print: 0567-7572; Online: 2406-6168]
- GOYKOVIC, V. & G. SAAVEDRA. 2007.** Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *Idesia* 25(3): 47–58. [ISSN: 0718-3429.]
- INEGI. 2014.** Boletín de información oportuna del sector alimentario. No. 347. Pág.: 96. Grupo de Trabajo de Estadísticas de Comercio Exterior integrado por el Banco de México, INEGI, Servicio de Administración Tributaria y Secretaría de Economía. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/> [ISSN: en trámite] (12 de diciembre de 2014).
- MATA-VÁZQUEZ, H., R.A. ANGUAINO-AGUILAR, E. VÁZQUEZ-GARCÍA, J. GAZANO-IZQUIERDO, D. GONZÁLEZ FLORES, M. RAMÍREZ-MERAZ, E. PADRÓN-TORRES, R. BASANTA-CORNIDE, M.A. GARCÍA-DELGADO & J.E. CERVANTES-MARTÍNEZ. 2010.** Revista Ciencia UAT Jun 10 Unidad académica multidisciplinaria Mante-Centro, UAT. pp 50–54. <http://intranet.uat.edu.mx/cienciauat/ediciones/Edici%C3%B3n%20No.%2016,%20Junio%202010/Producci%C3%B3n%20de%20tomate%20sistema%20hidrop%C3%B3nico%20con%20soluci%C3%B3n%20nutritiva%20reciclable%20en%20sustrato%20de%20Tezontle.pdf> . [ISSN: 2007-7858]. Fecha de consulta 03/06/2015.
- MASAGUER A. & M. CRUZ LÓPEZ-CUADRO. 2006.** Sustratos para viveros: Conocer sus propiedades ayuda a su correcta utilización. *Horticultura*, vol. extra, pág. 44–50. [www.horticom.com/pd/article.php?sid=63226]
- MASAGUER A. & M. CRUZ LÓPEZ-CUADRO. 2007.** *Avances en sustratos para cultivos hortícolas: caracterización y manejo.* 4ª Curso internacional de actualización en horticultura protegida. Universidad Politécnica de Madrid, España, 44 pp. [ISSN electrónico: 2007-4034 ISSN impreso: 1027-152X]
- MAZUELA, P.A., B. CEPEDA & V. CUBILLOS. 2012.** Efecto del injerto y del bioestimulante Fartum® sobre la producción y calidad en tomate cherry. *Idesia* 30(3): 77–81. [ISSN: 0718-3429]
- MAZUELA, P., TREVIZAN, J. & URRESTARAZU M. 2012.** A comparison of two types of agrosystems for the protected soilless cultivation of tomato crops in arid zones. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10(1): 338–341. [ISSN (Online): 1097-0010]
- OJODEAGUA, A.J.L., J.Z. CASTELLANOS R., J.J.MUÑOZ R., G. ALCÁNTAR G., L. TIJERINA CH., P. VARGAS T. & S. ENRÍQUEZ R. 2008.** Eficiencia de suelo y tezontle en sistemas de producción de tomate en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4): 367–374. [ISSN: 0187-7380]
- ROY, S., K. ARUNACHALAM, B. KUMAR D. & A. ARUNACHALAM. 2010.** Effect of organic amendments of soil on growth and productivity of three common crops viz. *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* and *Abelmoschus esculentus*. *Applied Soil Ecology* 45: 78–84. [ISSN: 0929-1393]

SAGARPA (SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN). 2012. México. URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura-prottegida2012.aspx>. Fecha de consulta 12/07/2012.

VARGAS-CANALES, J.M., A.M. CASTILLO-GONZÁLEZ, J. PINEDA-PINEDA, J.A. RAMÍREZ A. & E. AVITIA G. 2014. Extracción nutrimental de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en mezclas de tezontle con aserrín nuevo y reciclado. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 20(1) Chapingo ene./abr.p.1-23.

[ISSN (impreso): 1027-152X; (electrónico): 2007-4034]
<http://dx.doi.org/10.5154/rchsh.2013.02.005>

Verdonck, O. & P. Demeyer. 2004. The influence of the particle sizes on the physical properties of growing media. *Acta Horticulturae* **644**: 99–101. [ISSN: 0567-7572]

El aislamiento social después del destete altera el desarrollo de los índices conductuales de maduración sexual y produce déficits en la conducta sexual de ratas machos

Post-weaning social isolation alters the development of behavioral indices of sexual maturation and leads to deficits in the sexual behavior of male rats

Marisela Hernández-González[✉], Miguel Ángel Guevara, Mayra Liliana Ramírez-Rentería y Enrique Hernández-Arteaga

Instituto de Neurociencias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Francisco de Quevedo 180, Colonia Arcos Vallarta, Guadalajara 44130, Jalisco, México.

✉ mariselh@cencar.udg.mx

Citar

Resumen

En ratas machos, el acicalamiento genital (AG) y las erecciones peneanas espontáneas (EPE) se incrementan sustancialmente en el periodo alrededor de la pubertad y muestran un patrón de desarrollo característico en este periodo. Estos índices de maduración sexual, que desempeñan un papel importante en la preparación de la rata macho para la reproducción, son influidas por diferentes factores, tales como las drogas, baja nutrición, cuidado maternal e interacción social. Si se considera que el aislamiento social afecta la conducta sexual, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el patrón de desarrollo del AG, EPE y conducta sexual en ratas machos que fueron hospedadas individualmente del día 22 al 77 postnatal. Aunque los valores de frecuencia y duración del AG y EPE presentaron un aumento gradual conforme los sujetos se acercaban a la pubertad (40 días de edad), la privación social alteró la relación de la ocurrencia de AG y EPE y la eficacia de la conducta sexual. Los sujetos

hospedados individualmente después del destete no mostraron una correlación directa entre una mayor frecuencia y duración de AG y EPE con una mejora ejecución de la conducta sexual, como se reporta que ocurre en ratas macho socialmente hospedados. Estos resultados esclarecen el papel de la experiencia social post-destete en el desarrollo de los índices conductuales de maduración sexual y sugieren un importante efecto a largo término del aislamiento sobre la ejecución de la conducta sexual en la rata macho.

Palabras clave: aislamiento social, acicalamiento genital, erecciones peneanas, conducta sexual, desarrollo, ratas.

Abstract

In male rats, genital grooming (GG) and spontaneous penile erections (SPE) increase substantially between weaning and the peripubertal period, and show a characteristic development pattern around the time of puberty. These indices of sexual maturation, which play

an important role in rearing adult male rats for reproduction, are influenced by several factors, such as drugs, undernutrition, maternal care, and social interaction. Considering that post-weaning social isolation affects sexual behavior, the aim of this work was to characterize the development pattern of GG, SPE and sexual behavior in male rats that were housed individually from 22-to-77 days of age. Although the values for the frequency and duration of GG and SPE showed a gradual increase as puberty approached (40 days old), social deprivation altered the relation of the occurrence of GG and SPE and the efficacy of sexual be-

havior. The subjects housed individually after post-weaning did not show a direct correlation between a higher frequency and duration of GG and SPE and improved performance of sexual behavior, as has been reported to occur in socially-housed male rats. These findings highlight the role of post-weaning social experience in the development of behavioral indices of sexual maturation, and suggest an important long-term effect on the performance of sexual behavior in the male rat.

Keywords: Social isolation; Genital grooming; Penile erections; Sexual behavior; Development; Rat.

Introducción

La interacción social, sobre todo durante la pubertad, es esencial para la expresión y comprensión de muchas señales de comunicación (Meaney & Stewart 1981; Takahashi 1986). El aislamiento, en contraste, provoca diversos cambios conductuales y fisiológicos en diferentes especies, incluyendo los humanos (Mason 1960; Novak 1979; Christie & Johnsen 1983; Hofer 1987; Knowles *et al.* 1989; Ikemoto & Panksepp 1992; Wongwitdecha & Marsden 1996). Diferentes estudios han descrito que los efectos del aislamiento dependen del periodo en que esta privación ocurra. En este sentido, la pubertad es uno de los periodos más sensibles en los mamíferos. Este se caracteriza por el inicio de la maduración sexual en el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG), y por lo tanto, por cambios interactivos y rápidos a nivel neural, endocrino y morfológico (Ojeda 1994).

Después de periodos cortos de aislamiento social post-destete, las ratas muestran cambios a largo plazo, tales como disminución de la tem-

Introduction

Social interaction, especially during puberty, is essential for the expression and comprehension of many communications signals (Meaney & Stewart 1981; Takahashi 1986). Isolation, in contrast, results in diverse behavioral and physiological changes in different species, including humans (Mason 1960; Novak 1979; Christie & Johnsen 1983; Hofer 1987; Knowles *et al.* 1989; Ikemoto & Panksepp 1992; Wongwitdecha & Marsden 1996). Studies have described that the effects of isolation depend on the period in which this social deprivation takes place. In this respect, puberty is one of the most sensitive periods in mammals. It is characterized by the onset of sexual maturation in the hypothalamic-hypophyseal-gonadal (HHG) system and, hence, by rapid interactive neural, endocrine, and morphologic changes (Ojeda 1994).

After short periods of post-weaning social isolation, rats show long-lasting changes including decreases in body temperature, sleep, and growth-hormone secretion along with increase

peratura corporal, sueño y secreción de la hormona de crecimiento, junto con incremento en activación cerebral, reactividad conductual y reducción del volumen y tamaño de neuronas en algunas estructuras cerebrales, como la amígdala (Hennessy 1997; Panksepp *et al.* 1997; Cooke *et al.* 2000). El aislamiento social durante el desarrollo también afecta las funciones reproductivas, induciendo una conducta copulatoria deficiente (Gerall *et al.* 1967; Bakker *et al.* 1995; Brotto *et al.* 1998; Cooke *et al.* 2000; Kerckmar *et al.* 2014), síntesis anormal de esteroides gonadales (Fulgheri *et al.* 1975; Lupo *et al.* 1978; Amistislavskaya *et al.* 2013) y reducción de erecciones sin contacto (Cooke *et al.* 2000).

El auto-acicalamiento es un acto motor complejo, que las ratas ejecutan desde la infancia y se continúa a lo largo de la vida adulta. Durante el curso del periodo predestete, la extensión de la superficie que es acicalada aumenta de modo gradual, al añadir regiones corporales en una progresión más o menos cefalocaudal. El acicalamiento genital aparece tarde en la ontogenia, ocurre con poca frecuencia entre animales jóvenes y por tanto, es improbable que ejecuten secuencias completas de acicalamiento (Sachs 1988; Sachs *et al.* 1988).

Se ha sugerido que el AG puede producir efectos a largo plazo en el desarrollo. El auto-acicalamiento genital se asocia con el crecimiento puberal de la próstata y vesículas seminales en ratas juveniles, así las ratas machos promueven su preparación para la reproducción mediante la autoestimulación por acicalamiento genital (Moore & Rogers 1984). Las ratas machos que reciben menos lamido ano-genital maternal, desarrollan vesículas de menor tamaño y copulan menos robustamente que otros machos (Moore 1984; 1992). Así, el nivel de estimulación ano-genital que reciben durante su periodo de desarrollo puede tener un papel importante en la conducta copulatoria de la rata macho adulta (Moore 1984; 1988; 1992).

El auto-acicalamiento genital en ratas ocurre en conjunto con erecciones penianas, movimientos pélvicos y emisión seminal fuera del contexto de la copula (Sachs *et al.* 1988). Estas erecciones penianas causadas en ratas aisladas

in brain arousal, behavioral reactivity, and reduction of the volume and size of neurons in some brain structures, such as the amygdala (Hennessy 1997; Panksepp *et al.* 1997; Cooke *et al.* 2000). Social isolation during development also affects reproductive functions, inducing deficient copulatory behavior (Gerall *et al.* 1967; Bakker *et al.* 1995; Brotto *et al.* 1998; Cooke *et al.* 2000; Kerckmar *et al.* 2014), abnormal gonadal steroid synthesis (Fulgheri *et al.* 1975; Lupo *et al.* 1978; Amistislavskaya *et al.* 2013) and reduced induction of noncontact erections (Cooke *et al.* 2000).

Although several studies indicate that post-weaning social isolation has negative consequences on the adult sexual behavior, there has been relatively little investigation of the effects of social isolation on the developmental pattern of behavioral indices of sexual maturation, such as the genital grooming (GG) and spontaneous penile erection (SPE).

Self-grooming is a complex motor act, which in rats is performed initially by infants and is continued throughout adult life. During the course of preweaning period, the extent of the body surface covered by grooming gradually enlarges, with body regions added in a roughly cephalocaudal progression. Genital-grooming appear relatively late in ontogeny, and this occurs with low frequency among young animals, which are unlikely to complete full grooming sequences (Sachs 1988; Sachs *et al.* 1988).

It has been suggested that GG may produce long-term effects in the development. Genital self-grooming has been linked to the pubertal growth of prostate glands and seminal vesicles in juvenile rats so that male rats promote their readiness for reproduction by self-stimulation genital grooming (Moore & Rogers 1984). Males rats that receive less maternal anogenital licking develop lighter-weight seminal vesicles and copulate less robustly than other males (Moore 1984; 1992). Thus, the level of anogenital stimulation that receives during their developing period may have an important role on the copulatory behavior of the adult male rat (Moore 1984; 1988; 1992).

es decir, cuando no hay hembras presentes, son llamadas también “erecciones peneanas espontáneas” (EPE), las cuales se caracterizan por la extensión del glande por fuera del prepucio, y el acicalamiento genital coincide con o sigue rápidamente a la erección (Meisel & Sachs 1994). En ocasiones ligeros movimientos de cadera pueden también acompañar la erección, pero este patrón motor completo tiene poca similitud con aquel que ocurre durante la copula.

Se ha descrito que el AG muestra un patrón de desarrollo característico alrededor de la pubertad, al incrementarse de manera substancial entre el destete y la post-pubertad temprana (Moore & Rogers 1984) alcanzando su más alta manifestación cerca de los días 35–47 postnatal, es decir en el periodo peri-puberal de los machos (Hernández-González 2000). Las EPE muestran un patrón de desarrollo característico alrededor de la pubertad, incrementándose alrededor del día 43 de edad, y alcanzando su más alta manifestación cerca del día 47 post-natal (Hernández-González 2000).

Se sabe que el contexto social tiene un importante efecto sobre la manifestación del acicalamiento y las erecciones peneanas (Meisel *et al.* 1984; Moore 1986; Holmes & Sachs 1992), así, aunque el acicalamiento es un evento relativamente frecuente en las actividades diarias de la rata (Bolles 1960), es más probable observarlo cuando las ratas son hospedadas individualmente en un ambiente novedoso (Colbern *et al.* 1978; Jolles *et al.* 1979a). Sin embargo, en la rata macho este incremento es restringido solo al acicalamiento genital, pero no a otras partes del cuerpo (Moore 1986). Por otro lado, las EPEs muestran una muy baja incidencia en contextos no copulatorios: una ocurrencia del 30 % y una frecuencia promedio de 0.3 erecciones/h fueron reportadas por Bertolini *et al.* (1978) en experimentos donde los animales adultos fueron observados en aislamiento durante dos horas.

Si se considera el importante papel que se asigna a la interacción social y al contexto sobre la expresión de diferentes conductas, el objetivo de este estudio fue caracterizar el patrón de desarrollo del AG, EPE y conducta sexual en ratas machos adultos que fueron privadas de la opor-

Genital self-grooming in rats also occurs in conjunction with penile erection, pelvic thrusts and seminal emission outside the context of copulation (Sachs *et al.* 1988). This penile erections caused in isolated rats i.e, with no female present are also called “spontaneous penile erection” (SPE) which are usually characterized by extension of the engorged glans beyond the sheath, and genital grooming coincides with or quickly follows erection (Meisel & Sachs 1994). Occasionally slight hip movements may also accompany erection, but these movements and the whole motor pattern bear little similarity to those occurring during copulation.

It has been described that GG show a characteristic development pattern around the puberty, increasing substantially between weaning and early post-puberty (Moore & Rogers 1984) and reaching their highest manifestation about 35–47 days postnatal, i.e., in the peri-pubertal period of males (Hernández-González 2000). The SPE also shows a characteristic development pattern around puberty, increasing substantially between 43 days of age and reaching highest manifestation about 47 days of age (Hernández-González 2000).

It is known that social context have an important effect on the manifestation of grooming and penile erections (Meisel *et al.* 1984; Moore 1986; Holmes & Sachs 1992), thus, although grooming is a relatively frequent event in the rat's daily activities (Bolles 1960), it is more reliably observed when rats are placed alone into a novel environment (Colbern *et al.* 1978; Jolles *et al.* 1979a). However, in the male this increase is restricted only to genital grooming, but not other body regions (Moore 1986). On the other hand, the SPE show a very low incidence in noncopulatory contexts: an occurrence of 30 % and an average frequency of 0.3 erections/h were reported by Bertolini *et al.* (1978) from experiments in which the adult animals were observed alone during two hours.

Considering the important role that has been assigned to social interaction and context on the expression of different behaviors, the aim of this study was to characterize the developmental pattern of GG, SPE and sexual behavior in adult

tunidad de interactuar con sus compañeros durante la pubertad.

Método

Sujetos

Se sometieron diez ratas macho y hembras de la cepa Wistar. Los sujetos se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 12 × 12 h y a 22–23 °C, con comida y agua *ad libitum* durante la gestación y la lactancia de las crías. Todas las ratas pre-púberes de este estudio (n = 16) fueron progenie de los animales mencionados. El destete se realizó el día 22 (día de nacimiento = 1), después de lo cual los animales fueron sexados y mantenidos en aislamiento social (hospedados individualmente) en cajas de plástico (32 × 47 × 20 cm de policarbonato) con cama de aserrín y tapa de acero. Los sujetos se mantuvieron en una sala de pruebas durante todo el experimento bajo temperatura ambiente de 22–23 °C, de tal manera que los animales no fueran perturbados durante la observación. Para minimizar la comunicación visual, olfativa y auditiva entre los sujetos, entre cada caja habitación se mantuvo al menos 1 m de distancia.

Procedimiento

La presencia del acicalamiento genital y erecciones peneanas se registró desde los 25 hasta los 47 días de edad, cada tercer día, de las 18:00 a las 20:00 h. Los datos conductuales se registraron en tiempo real durante dos horas diarias por los experimentadores, quienes permanecieron sentados a 0.5 m de cada caja habitación en la sala de pruebas. El acicalamiento genital se registró cada vez que el sujeto se lamía los testículos o el pene. Las erecciones peneanas fueron identificadas cuando el sujeto realizaba una serie de movimientos pélvicos seguidos por la adopción de una postura sentada que permitió la visualización del glande por fuera del prepucio, seguido de un acicalamiento genital sujetando su pene con las patas delanteras. Los parámetros evaluados de cada conducta fueron la frecuencia y la duración.

Las pruebas de conducta sexual se realizaron entre las 17:00 y 21:00 h cada tercer día a partir del día 42 hasta el 77 de edad. Cada macho

male rats that were deprived of the opportunity to interact with their peers during the puberty.

Method

Subjects

Ten males and females Wistar rats were used. Subjects were maintained under a 12/12 h light/dark cycle at 22–23 °C, with food and water *ad libitum* throughout gestation and lactation of the pups. All prepubescent rats used in this study (n = 16) were progeny of these animals. Weaned occurred on days 22 (day of birth = 1), after which the animals were sexed and maintained in social isolation (individually housed) in plastic cages (32 × 47 × 20 cm polycarbonate cage) with sawdust bedding and wire top. The subjects were kept in a testing room during all experiment under room temperature of 22–23 °C, thus, the animals were mildly disturbed at the time of observation. To minimize the visual, olfactory and auditory communication between the subjects, at least a distance of 1 m was maintained between each home cage.

Procedure

The occurrence of genital grooming and penile erections was observed from 25 to 47 days of age on every second day from 18:00 to 20:00 h. Behavioral data were recorded in real time during two hours daily by the experimenters who remained seated at 0.5 m from the test cage in the testing room. Genital grooming was recorded when each male self-licking their testicles or penis. An erection was identified when pelvic thrusts were followed by seated upright stance, the emergence of the engorged glans penis and distal penile shaft with penile grooming. Frequency and duration were recorded for each bout of each behavior.

Sexual behavior tests were performed between 17:00 and 21:00 hours on every second day, from 42 to 77 days of age. After each male was placed in the test cage, 5-min and then they were permitted for adaptation before the introduction of a receptive female. Stimulus females of the same strain were rendered sexually receptive by subcutaneous injection of 5 µg of estradiol benzoate 36 h before the sexual test and then with 500 µg

permaneció por 5 min en una caja de acrílico para su adaptación antes de la introducción de la hembra receptiva. Las hembras estímulo de la misma cepa fueron inducidas a estar sexualmente receptivas mediante la inyección subcutánea de 5 µg/0.05 ml de benzoato de estradiol 36 h antes de la prueba sexual, y 500 µg de progesterona 3 h antes de la prueba. Se midieron las siguientes variables del comportamiento: a) monta (M), monta con movimientos pélvicos sin penetración vaginal; b) latencia de monta (LM), el tiempo desde la entrada de la hembra receptiva a la caja de observación a la primera monta; c) intromisión (I), monta con patrones conductuales de penetración vaginal; d) latencia de intromisión (LI) el tiempo desde la entrada de la hembra receptiva en la caja de observación a la primera intromisión; e) eyaculación (E), monta con patrones conductuales de expulsión seminal; f) latencia de eyaculación (LE), tiempo desde la primera intromisión hasta el patrón de eyaculación; g) intervalo post-eyaculatorio (IPE), tiempo desde el patrón eyaculatorio a la primera intromisión de la segunda serie de copulación y; h) hit rate (HR) número de I/(número de M + número de I). Cada prueba se dio por terminada después de 1) un máximo de 15 minutos sin monta o intromisión; 2) un máximo de 30 minutos después de la primera intromisión sin eyaculación; 3) la primera intromisión después de la eyaculación inicial; o 4) un máximo de 15 minutos sin intromisión después de la eyaculación.

Análisis estadístico

Para comparar los parámetros de frecuencia y duración del AG y las EPE a través de los días de registro, los datos totales de las 2 h de registro correspondientes a cada tercer día (25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 y 47) fueron comparados con una prueba estadística de Friedman seguida por una prueba *post hoc* de Wilcoxon.

Además, se calculó la mediana de las medias individuales de frecuencia y duración del AG a partir de los primeros tres días de registro (25, 27 y 29 días de edad) y los tres últimos días de registro (43, 45 y 47 días de edad); de manera similar se obtuvo la mediana de las medias individuales de frecuencia y duración de las EPE de los dos primeros días (37 y 39 días de edad) y de los dos últimos días en que se observaron las EPE

of progesterone 3 h before the test. The following behavioral variables were measured: a) mount (M), mount with pelvic thrusting without vaginal penetration; b) mount latency (ML), time from the entrance of the receptive female into the observation cage to the first mount; c) intromission (I), mount with behavioral signs of vaginal penetration; d) intromission latency (IL), time from the entrance of the female into the observation cage to the first intromission; e) ejaculation (E), mount with behavioral signs of seminal expulsion; f) ejaculation latency (EL), time from the first intromission to the ejaculatory pattern, g) postejaculatory interval (PEI), time from ejaculatory pattern to the first intromission of the second copulatory serie, and the intromission ratio (IR) number of I/(number of M + number of I). Each test was ended after either 1) a maximum of 15 min without mount or intromission; 2) a maximum of 30 min after the first intromission without ejaculation; 3) the first intromission following the initial ejaculation; or 4) a maximum of 15 min without intromission after ejaculation.

Statistics

To compare the frequency and duration of GG and SPE throughout recording days, the total data of 2 h corresponding to each recording days (25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 and 47) were compared with a Friedman test followed by the Wilcoxon *post hoc* test.

In addition, median of individual means of frequency and duration of GG were calculated from the three first (25, 27 and 29 days of age) and three last (43, 45 and 47 days of age) days of testing; similarly, median of individual means of frequency and duration of SPE were calculated from the two first days in which SPE were observed (37 and 39 days of age) and from the two last days of testing (45 and 47 days of age). These initial vs. final values of frequency and duration of GG and SPE were compared by using a Wilcoxon test.

The mean age at the beginning of the copulatory responses (IL, EL, PEI, and IR) of subjects, categorized in two groups according to whether they showed a frequency lower or higher than four SPE from 37 to 47 days of age, were com-

(45 y 47 días de edad). Estos valores iniciales vs los finales de frecuencia y duración del AG y las EPE fueron comparados mediante una prueba de Wilcoxon.

La edad de inicio promedio de las respuestas copulatorias (LI, LE, IPE y HR) de los sujetos, clasificados en dos grupos de acuerdo a si mostraban una frecuencia menor o mayor que cuatro EPE de los 37–47 días de edad, se compararon con una prueba de U de Mann-Whitney. En este análisis, los sujetos que no presentaron ninguna respuesta copulatoria, se asignaron al rango de la categoría superior. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo.

Para correlacionar la edad de inicio, así como la frecuencia total y la duración total de AG y EPE con el inicio de las respuestas copulatorias (I o E), se utilizó el coeficiente de correlación (r) producto-momento de Pearson. Se consideró significativo el valor de r si el valor de p fue < 0.05 .

Resultados

El acicalamiento genital presentó un aumento gradual de la frecuencia y duración conforme se alcanzó la pubertad. La frecuencia de esta conducta se incrementó desde los 27 días de edad con respecto al primer día de registro, pero los valores máximos fueron alcanzados a los 35 ($t = 13.00$; $p < 0.005$), 37 ($t = 15.0$; $p < 0.005$), 41 ($t = 14.00$; $p < 0.005$), 43, 45 y 47 días de edad ($t = 14.0$; $p < 0.005$) (Figura 1A). La duración de esta conducta también mostró un aumento desde el día 27; los valores máximos se obtuvieron a los 35 días ($t = 15.0$; $p < 0.005$) y este incremento fue mantenido hasta los 47 días de edad ($t = 14.0$; $p < 0.05$) con respecto al primer día de registro (Figura 1B).

La ocurrencia de las EPE se observó desde los 37 días de edad en 7 de los 16 sujetos alojados en aislamiento social, pero la mayor frecuencia fue alcanzada a los 43 ($t = 12.0$; $p < 0.05$, $n = 15$) y a los 47 días de edad ($t = 13.0$; $p < 0.005$, $n = 12$) (Figura 2B) con respecto a los 37 días de edad. El tiempo que permanecieron en esta conducta alcanzó los valores más altos a los 43 ($t = 25.0$; p

pared by a Mann-Whitney U test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant.

To correlate the age of onset, as well as the total frequency and total duration of GG and SPE with the beginning of the copulatory responses (I or E), the Pearson product-moment correlation coefficient was used. The r value was considered significant, if its associated p value was < 0.05 .

Results

The genital grooming showed a gradual increase of the frequency and duration as puberty was attained. The frequency of this behavior was increased from the 27 days of age respect to first recording day, but the maximum values were reaching at 35 ($T = 13.0$; $p < 0.005$), 37 ($T = 15.0$; $p < 0.005$), 41 ($T = 14.0$; $p < 0.005$), 43, 45 and 47 days of age ($T = 14.0$; $p < 0.005$) (Figure 1A). The duration of this behavior also showed an increase from 27 days of age; the maximum values were obtained at 35 days of age ($T = 15.0$; $p < 0.005$), and this increase was maintained until 47 days of age ($T = 14.0$; $p < 0.005$) with respect to the first recording days (Figure 1B).

The occurrence of spontaneous penile erections was observed from 37 days of age in 7 of the 16 subjects alone housed, but the major frequency was reached at 43 ($T = 12.0$; $p < 0.05$, $n = 15$) and 47 days of age ($T = 13.0$; $p < 0.005$, $n = 12$) (Figure 2A) with respect to 37 days of age. The time spent in this behavior reached the highest values at 43 ($T = 25.0$; $p < 0.05$) and 45 days of age ($T = 22.0$; $p < 0.05$) with respect to 37 days of age (Figure 2B).

The median frequency and duration of GG and SPE at both initial and last days of testing are showed in the table 1. In general terms, an increase in these parameters was observed at last days of testing, both in GG and SPE. Only the duration of SPE showed a decrease at last days as compared to initial days of testing ($T = 6.0$; $p < 0.05$).

Table 2 shows the median age to the onset of the different behavioral patterns. Isolated male

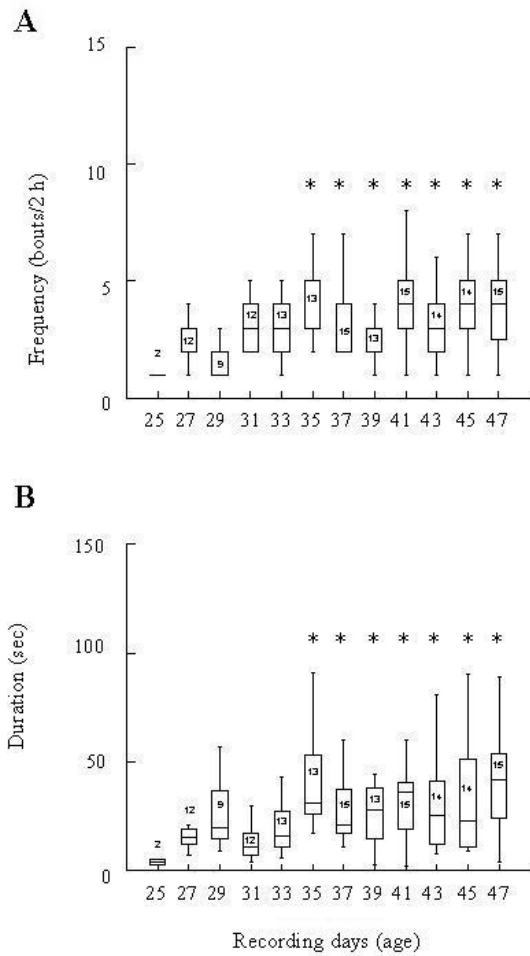
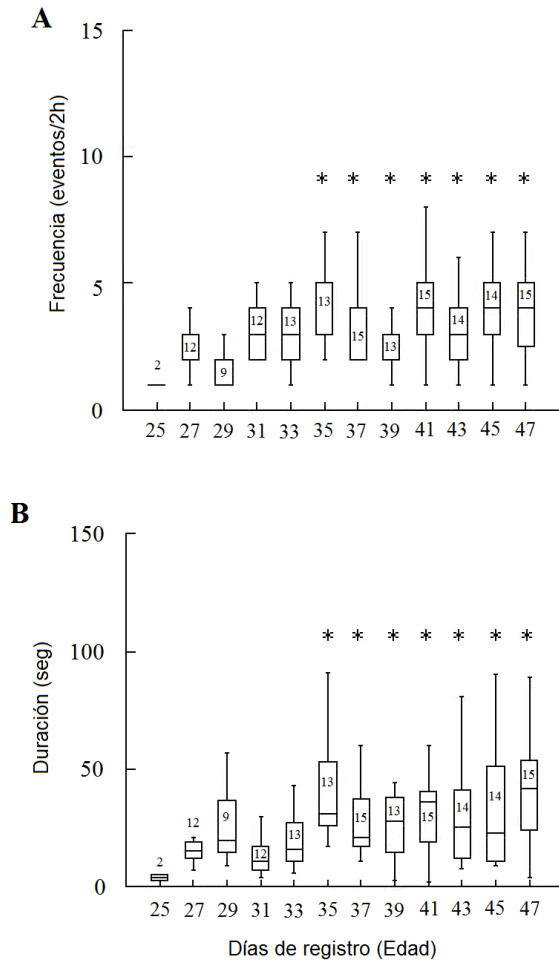


Figura 1. Secuencia temporal de la frecuencia (A) y duración (B) del acicalamiento genital a través de los días de registro. Se muestran medianas, rangos inter-cuartiles y rangos máx-mín. El número dentro de la caja indica el número de sujetos con los que se calcularon los valores. Se utilizó la prueba de Friedman seguida de la prueba de Wilcoxon como prueba post-hoc. * $p < 0.05$ respecto al primer día de registro.

Figure 1. Temporal sequence of the genital grooming frequency (A) and duration (B) throughout recording days. Medians, inter-quartile ranges and max-min ranges are shown. Number inside the box indicate the number of subjects on which were calculated. Friedman test followed by Wilcoxon post-hoc test. * $p < 0.05$ respect to first recording days.

< 0.05) y 45 días de edad ($t = 22.0$; $p < 0.05$) con respecto al día 37 de edad (Figura 2A).

La mediana de la frecuencia y la duración del AG y EPE en los días iniciales y finales de prueba se muestran en el Cuadro 1. En términos generales, se observó un aumento de estos parámetros en los últimos días de registro, tanto en el AG como en las EPE. Solo la duración de las EPE mostró una disminución en los últimos días respecto a los días iniciales del registro ($t = 6.00$; $p < 0.05$).

En Cuadro 2 muestra la mediana de la edad de inicio de los diferentes patrones del comportamiento. Las ratas macho aisladas mostraron AG

rats showed GG from day 27, SPE from 41 days of age and copula until ejaculation from 71 days of age. Although SPE were sometimes observed in the absence of GG, the major proportion of SPE was observed in association to GG bouts. The major percentage of SPE was observed at 43 days of age (Table 3).

The correlation obtained between the age at the beginning of genital grooming and penile erections with the age to reach the first I or E responses was not significant, similarly, none correlation was obtained at compare the total frequency as well as total duration of the GG and SPE that showed each subject with the age to onset the sexual behavior (Table 4).

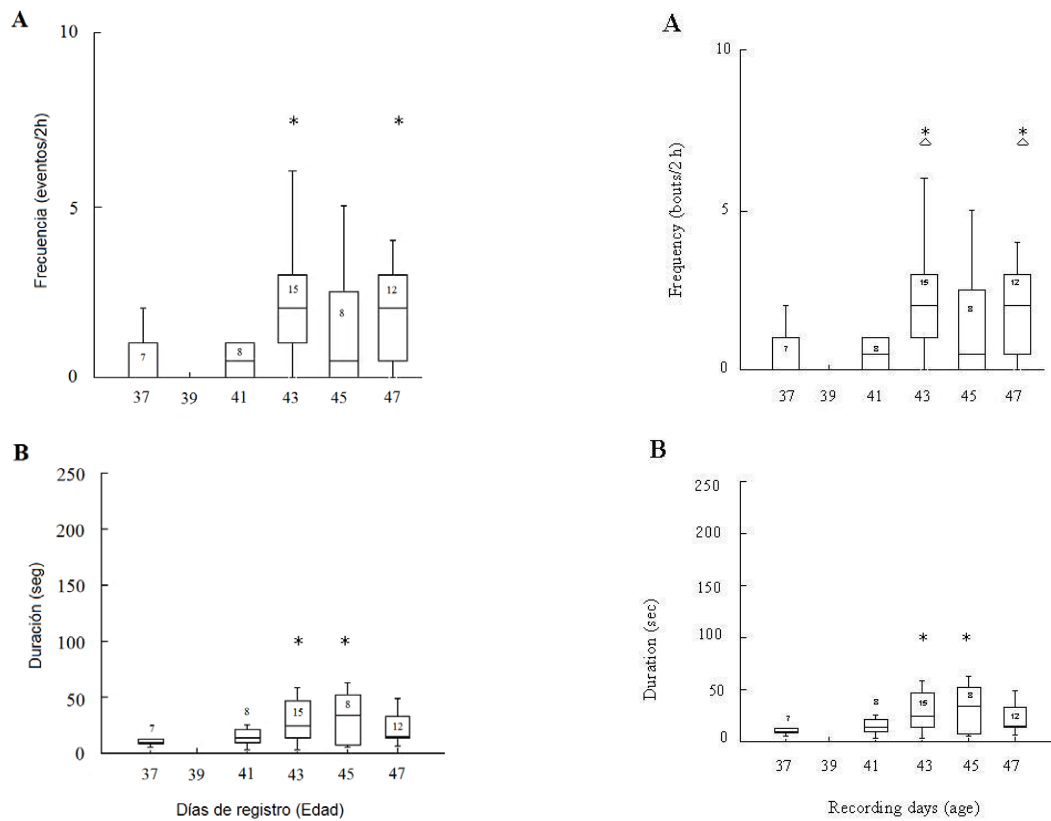


Figura 2. Secuencia temporal de la frecuencia (A) y duración (B) de las erecciones peneanas espontáneas a través de los días de registro. Se muestran medianas, rangos intercuartiles y rangos máx-mín. Se realizó la prueba de Friedman seguida de la prueba de Wilcoxon como prueba post-hoc. * $p < 0.05$ respecto al primer día de registro.

Figure 2. Temporal sequence of the spontaneous penile erections frequency (A) and duration (B) throughout recording days. Medians, inter-quartile ranges and max-min ranges are shown. Number inside of box indicate the number of subjects on which were calculated. Friedman test followed by Wilcoxon post-hoc test. * $p < 0.05$ respect to first recording days.

Cuadro 1. Medianas \pm rango inter-cuartil de la frecuencia y duración (segundos) del acicalamiento genital (AG) y erecciones peneanas espontáneas (EPE) que mostraron los machos aislados socialmente al día inicial y al final del registro. Las diferencias significativas se obtuvieron de una prueba de Kruskal-Wallis

Conducta	Día inicial	Ultimo día
Acicalamiento genital (n = 14)		
Frecuencia	0.66 eventos/h	1.66 eventos/h **
Duración	8.0 sec	9.4 sec **
Erecciones peneanas espontaneas (n =6)		
Frecuencia	0.25 erecciones/h	0.62 erecciones/h &
Duración	11.0 seg	7.0 seg ¶¶

** $p < 0.008$ significativamente mayor con respecto a los días iniciales.
 & $p < 0.05$ significativamente mayor con respecto a los días iniciales.
 ¶¶ $p < 0.05$ significativamente menor con respecto a los días iniciales.

Table 1. Medians of the frequency and duration (sec) of the genital grooming (GG) and spontaneous penile erections (SPE) bouts that showed the males isolated housed at initial and last days of testing. Significant differences were obtained from Kruskal-Wallis test.

Behavior	Initial days	Last days
Genital grooming (n = 14)		
Frequency	0.66 bouts/h	1.66 bouts/h **
Duration	8.0 sec	9.4 sec **
Spontaneous penile erections (n = 6)		
Frequency	0.25 erections/h	0.62 erections/h &
Duration	11.0 sec	7.0 sec ¶¶

** $p < 0.008$ significantly higher than initial days.
 & $p < 0.05$ significantly higher than initial days.
 ¶¶ $p < 0.05$ significantly lower than initial days.

Cuadro 2. Edad de la ocurrencia de las diferentes respuestas de comportamiento mostrada por los machos aislados socialmente.

Parámetros copulatorios	Mediana \pm rango intercuartil	
Acicalamiento genital	27.0 \pm 0	(16)
Erecciones peneanas	41.0 \pm 4	(16)
Monta	54.5 \pm 21	(14)
Intromisión	71.0 \pm 24	(13)
Eyaculación	71.0 \pm 15	(12)

Los números entre paréntesis corresponden al número de sujetos de los cuales se calcularon las medianas.

Cuadro 3. Proporción y porcentaje de la aparición del AG seguidos por EPE a lo largo de los días de registro.

Edad (días)	Proporción	%
41	13/80	16.2
43	38/89	42.6
45	22/80	27.5
47	33/90	36.6

Cuadro 4. Los valores de correlación (r de Pearson) entre la aparición, frecuencia y duración de AG y EPE, con la aparición de las conductas de intromisión y eyaculación.

	Primera intromisión	Primera eyaculación
Ocurrencia del AG	0.290	0.417
Frecuencia total	0.410	0.265
Duración total	0.316	0.227
Ocurrencia de las EPE	0.029	0.094
Frecuencia total	0.454	0.344
Duración total	0.462	0.347

desde los 27 días, EPE desde los 41 días de edad y cópula hasta eyaculación desde los 71 días de edad. Aunque algunas EPE se observaron en ausencia de AG, la mayor proporción de las EPE se observó en asociación con AG. El mayor porcentaje de EPE se obtuvo a los 43 días de edad (Cuadro 3).

La correlación obtenida entre la edad de inicio del acicalamiento genital y las erecciones peneanas con la edad de ocurrencia de las primeras respuestas de I o E no fue significativa, de manera similar, no se encontró ninguna correlación al comparar la frecuencia total, así como la duración total del AG y las EPE que mostró cada sujeto con la edad de inicio de la conducta sexual (Cuadro 4).

Table 2. Age at the first occurrence of the different behavioral responses showed by males isolated housed.

Copulatory parameter	Median \pm interquartile range	
Genital grooming	27.0 \pm 0	(16)
Penile erections	41.0 \pm 4	(16)
Mount	54.5 \pm 21	(14)
Intromission	71.0 \pm 24	(13)
Ejaculation	71.0 \pm 15	(12)

Numbers in parentheses correspond to the number of subjects upon which medians were calculated.

Table 3. Proportion and percentages of GG bouts followed by SPE throughout the recording days.

Age (days)	Proportion	%
41	13/80	16.2
43	38/89	42.6
45	22/80	27.5
47	33/90	36.6

Table 4. Correlation values (r Pearson) among onset, frequency and duration of GG and SPE, with the onset of intromission and ejaculation behavior.

	First intromission	First ejaculation
Onset GG	0.290	0.417
Total frequency	0.410	0.265
Total duration	0.316	0.227
Onset SPE	0.029	0.094
Total frequency	0.454	0.344
Total duration	0.462	0.347

Subjects were categorized in two groups according to whether they showed a frequency lower or higher than four SPE from 37 to 47 days of age and their performance of copulatory behavior was evaluated at first day in which subjects reached the ejaculation and at 77 days of age (when the highest proportion of subjects reached the E response). The quality of performance of the copulatory behavior in this group individually housed was similar between those subjects with higher or lower frequency of SPE, only the IR (main index of the copulatory efficiency) showed a decrease at day 77 as compared to day of first E response in both groups ($U = 6$; $p < 0.05$) (Table 5).

Cuadro 5. Parámetros copulatorios (Latencia de intromisión (LI), latencia de eyaculación (LE), intervalo posteyaculatorio (IPE), relación de intromisión (RI) con respecto al primer día en que los sujetos llegaron a la eyaculación dentro de los 77 días de edad. Los machos se clasificaron por su frecuencia de EPE.

Parámetros copulatorios	Sujetos con alta frecuencia de EPE (n = 8)		Sujetos con baja frecuencia de EPE (n = 5)	
	Primer día de E	Día 77	Primer día de E	Día 77
LI (s)	325 ± 117	248 ± 179	276 ± 344	198 ± 120
LE (s)	1215 ± 1034	972 ± 633	1148 ± 1196	1311 ± 1091
IPE (s)	378 ± 141	353 ± 158	441 ± 293	398 ± 377
RI	0.50 ± 0.14	0.42 ± 0.1 *	0.40 ± 0.13	0.32 ± 0.06 *

Medianas ± rangos intercuartil. Prueba U de Mann-Witney.

* p < 0.05 Significativamente más bajo que RI con respecto al primer día de E.

Table 5. Copulatory parameters (intromission latency IL, ejaculation latency EL, postejaculatory interval PEI, and intromission ratio IR) at first day in which subjects reached the ejaculation and at 77 days of age. The males were categorized by their frequency of SPE.

Copulatory parameter	Subjects with higher frequency of SPE (n = 8)		Subjects with lower frequency of SPE (n = 5)	
	Day at first E	Day 77	Day at first E	Day 77
IL (s)	325 ± 117	248 ± 179	276 ± 344	198 ± 120
EL (s)	1215 ± 1034	972 ± 633	1148 ± 1196	1311 ± 1091
PEI (s)	378 ± 141	353 ± 158	441 ± 293	398 ± 377
IR	0.50 ± 0.14	0.42 ± 0.1 *	0.40 ± 0.13	0.32 ± .06 *

Medians ± interquartile ranges. Mann-Witney U test.

* p < 0.05 Significantly lower than IR at day of first E.

Los sujetos fueron clasificados en dos grupos de acuerdo a si mostraban una frecuencia mayor o menor a cuatro EPE desde los 37 a los 47 días de edad y su ejecución copulatoria fue evaluada el primer día en que los sujetos lograron eyacular y a los 77 días de edad (cuando la mayor proporción de los sujetos alcanzó la respuesta de E). La eficiencia copulatoria de los sujetos hospedados individualmente, fue similar entre los grupos de mayor y menor frecuencia de EPE, solo el HR (mayor índice de eficiencia copulatoria) mostró una disminución en el día 77 a comparación con los días de la primera respuesta de E en ambos grupos ($t = 6$; $p < 0.05$) (Cuadro 5).

Discusión

Este estudio demostró que la privación social post-destete altera la relación de ocurrencia del AG y EPE en ratas juveniles, y disminuye la eficiencia sexual de los machos adultos.

Se ha reportado que en la rata, la privación social y/o de comida, entre otros efectos, pue-

Discussion

This study demonstrated that post-weaning social deprivation altered the relation of the occurrence of GG and SPE in juvenile rats, and decreased the sexual efficiency of the adult males.

It has been reported that in the rat, early social and/or food deprivation, among other lacks, may interfere with the ontogeny of mechanisms underlying self-grooming activity (Bindra & Spinner 1958; Franková 1973; Salas *et al.* 1991) and noncontact erections (Cooke 2000). The male rats are more fearful and less exploratory than females when placed in a novel environment (Beatty 1979) which leads to an increased level of self-grooming (Colbern *et al.* 1978) that in the male is restricted only to genital grooming (Moore 1986). On the other hand, grooming induced by novelty or social isolation is often described as “displacement activity” for lowering a high arousal state (Bindra & Spinner 1958; Franková 1973; Bertolini *et al.* 1978; Beatty 1979; Jolles *et al.* 1979a; Jolles *et al.* 1979b; Salas *et al.* 1991). Although the grooming is a behavior that

de interferir con la ontogenia de los mecanismos que subyacen la actividad del auto-acicalamiento (Bindra & Spinner 1958; Franková 1973; Salas *et al.* 1991) y erecciones sin contacto (Cooke 2000). Las ratas machos son más miedosos y presentan menos conductas exploratorias que las hembras cuando se les presenta un ambiente novedoso (Beatty 1979), lo cual los lleva a una mayor frecuencia de auto-acicalamiento (Colbern *et al.* 1978) que en los machos se restringe sólo al acicalamiento genital (Moore 1986). Por otra parte, el acicalamiento inducido por novedad o aislamiento social se describe como una “actividad de desplazamiento” para aminorar el estado de sobreactivación (Bindra & Spinter 1958; Franková 1973; Bertolini *et al.* 1978; Beatty 1979; Jolles *et al.* 1979a; Jolles *et al.* 1979b; Salas *et al.* 1991). Aunque el acicalamiento es una conducta que puede ser inhibida por altos grados de activación, a intensidades moderadas de activación, el acicalamiento puede facilitar una “desactivación” (Delius 1967). Así, el incremento gradual de AG en este contexto podría desempeñar un papel importante como una actividad de desplazamiento para compensar la necesidad de interacción social con sus pares y actuar como un mecanismo para disipar el estrés que podrían tener los machos en esta situación.

En este estudio, la ocurrencia de acicalamiento genital se asoció con un mayor número de erecciones penianas siguiendo la tendencia normal de esta conducta que ocurre después en un evento de acicalamiento caracterizado por una progresión cefalocaudal (Sachs 1988). La proporción de EPE no presentó un incremento con la edad (el mayor porcentaje ocurrió a los 43 días de edad), y aunque los machos aislados mostraron una mayor frecuencia de EPE en ambos días de registro, iniciales y finales, también mostraron una menor duración de EPE en los días de registro iniciales (11 segundos) comparado con días finales (7 segundos). Por tanto, es posible sugerir que la privación social post-destete altera la relación de ocurrencia entre AG y EPE en ratas juveniles y disminuye la duración de EPE.

Leipheimer & Sachs (1993) demostraron que los mecanismos efectores vasculares responsables de iniciar las erecciones son sensibles a los andrógenos. El hecho en que en este traba-

may be inhibited by high degrees of arousal, at moderate intensities of arousal grooming may act to facilitate de-arousal (Delius 1967). Thus, the gradual increase of GG in this context could be play an important role as a displacement activity to compensate the need of social interaction with their peers and act as a mechanism to dissipate the stress that could be have the males in this condition.

In this study, the occurrence of genital grooming was associated with the major number of penile erections following the normal tendency for this behavior to occur last in a bout of grooming that reliably follows a cephalocaudal progression (Sachs 1988), however, the proportion of SPE not followed an increase with the age (the major percentage occurred at 43 days of age) and, although isolated males showed a higher frequency of SPE in both, initial and final recording days, they showed a minor duration of the SPE from initial (11.0 sec) to final (7.0 sec) recording days. Thus, it is possible suggest that post-weaning social deprivation alters the relation of occurrence between the GG and SPE in juvenile rats and decrease the duration of the SPE.

Leipheimer and Sachs (1993) demonstrated that the vascular effector mechanisms responsible for initiating erections are androgen sensitive. The fact that in this work the socially isolated animals showed a major frequency but a minor duration of the SPE could be consistent with the notion that isolation-induced stress can decrease the production of androgens in gonadally intact males (Fulgheri *et al.* 1975; Lupo *et al.* 1978; Amistislavskaya *et al.* 2013), which could be result in the altered occurrence and decreased duration of SPE.

It has been reported that Wistar socially housed rats start displaying copulatory behavior at a later age than other strains of rats. While intromission and ejaculation responses are shown by Long-Evans rats at 44 and 48 days of age, respectively (Sachs & Meisel 1979), Wistar rats do not show these responses until 55 and 59 days (Hernández-González 2000), or at a larger age (Goldfoot & Baum 1972). Despite many variations on the social deprivation procedure, most studies report impairment in subsequent sexual

jo los animales socialmente aislados mostraron una mayor frecuencia pero una menor duración de EPE podría ser consistente con la noción de que el estrés provocado por el aislamiento puede disminuir la producción de andrógenos en machos gonadalmente intactos (Fulgheri *et al.* 1975; Lupo *et al.* 1978; Amistislavskaya *et al.* 2013), lo cual podría resultar en la ocurrencia alterada y menor duración del EPE.

Se reportó que ratas Wistar socialmente hospedadas comienzan a ejecutar la conducta copulatoria en una edad más tardía comparada con otras cepas de ratas. Mientras que las ratas Long-Evans muestran una respuesta de intromisión y eyaculación desde los días 44 y 48 de edad, respectivamente (Sachs & Meisel 1979), las ratas Wistar no muestran estas respuestas hasta los días 55 y 59 (Hernández-González 2000), o en una edad más tardía (Goldfoot & Baum 1972). A pesar de muchas variaciones en el procedimiento de privación social, muchos estudios reportan daños subsecuentes en la conducta sexual de las ratas machos (Gerall *et al.* 1967; Larsson 1978; Bakker *et al.* 1995; Cooke *et al.* 2000). En el presente trabajo, las ratas Wistar hospedadas individualmente alcanzaron las respuestas de I y E hasta el día 71 de edad, y aunque la edad de inicio de estos parámetros copulatorios no se vio afectada, el índice de eficacia copulatoria (HR) disminuyó en ambos, sujetos con alta y baja frecuencia de EPE.

Se demostró que tanto el AG como las EPE desempeñan un papel importante en la preparación para la reproducción de la rata macho adulta (Moore 1984; 1988; Hernández-González 2000). Los sujetos que muestran una mayor frecuencia y/o una mayor duración de AG y EPE también presentan respuestas de I y E más tempranas y tienen una menor LE y un mayor HR (Hernández-González 2000). En este trabajo, sin embargo, ni la edad de inicio de AG o EPE, ni la frecuencia o duración de estas conductas se correlacionaron con un inicio más temprano y/o una mejor ejecución de la conducta sexual. Tanto los sujetos con una mayor como con una menor frecuencia de EPE mostraron altos valores de LI (mayor a 190 segundos) y un menor valor de HR (< 0.50). El hecho de que los valores de HR fueran menores al día 77 de edad

behavior of male rats (Gerall *et al.* 1967; Larsson 1978; Bakker *et al.* 1995; Cooke *et al.* 2000). In the present work, Wistar rats individually housed reach the I and E responses until at 71 days of age and, although the onset age of these copulatory parameters was not affected, the index of copulatory efficiency (IR) was decreased in both, subjects with higher and lower frequency of SPE.

It has been shown that both, GG and SPE play an important role in the readiness of adult male rats for reproduction (Moore 1984; 1988; Hernández-González 2000). Subjects that showed a higher frequency and/or a longer duration of GG and SPE also shown early I and E responses and had shorter EL and higher IR (Hernández-González 2000). In this work, however, neither the age at the onset of GG or SPE nor frequency or duration of these behaviors were correlated with the early onset and/or best performance of sexual behavior. Both, subjects with higher and lower frequency of SPE showed higher values of IL (higher than 190 sec) and decreased values of the IR (< 0.50). The fact that IR values were minor at 77 days of age as compared to the day when the males reached the first E response, shown that neither age nor sexual experience improve the performance of their sexual behavior.

The social interaction with partners of the same age functions as a practice for adult skills and has been suggested that deprivation of juvenile social interaction (main of play fighting) leads to severe psychosocial impairments in adulthood (van den Berg *et al.* 1999; Einon *et al.* 1978), thus, is probably that this minor copulatory efficiency result as consequence of two aspects: the decreased skill to perform an adequate copulation as a result of social deprivation, the minor self-stimulation as a result of the minor time spent in SPE behavior, or a combination of both.

It has been suggested that social interaction during puberty is important to the development of different brain structures, such as the medial prefrontal cortex and the amygdala. Similarly, it has been shown that social isolation can produce changes in the functioning and neuro-

respecto al día cuando los machos alcanzaron la primer respuesta E, muestran que ni la edad ni la experiencia sexual facilita la ejecución de su conducta sexual.

La interacción social con compañeros de la misma edad funciona como una práctica para las habilidades del adulto y se ha sugerido que la privación de interacción social juvenil (principalmente la conducta de juego-pelea) produce daños psico-sociales severos en la etapa adulta (van den Berg *et al.* 1999; Eino *et al.* 1978), así, es probable que esta menor eficacia copulatoria resulte como una consecuencia de dos aspectos: la menor habilidad para ejecutar una adecuada interacción copulatoria como resultado de la privación social, la menor auto-estimulación como resultado de la menor duración de EPE, o una combinación de ambos.

Se ha sugerido que la interacción social durante la pubertad es importante para el desarrollo de diferentes estructuras cerebrales, como la corteza prefrontal medial y la amígdala. De manera similar, se ha observado que el aislamiento social puede producir cambios en la funcionalidad y modulación neuroquímica de estas estructuras (Cooke *et al.* 2000; Ferdman *et al.* 2007; Han *et al.* 2011). Debido a que estas estructuras cerebrales se han visto implicadas en la motivación sexual y el procesamiento de estímulos sexualmente relevantes (Ágmo *et al.* 1995; Hernández-González & Guevara 2009), es probable que esta reducida eficiencia copulatoria sea el resultado del funcionamiento alterado de estos núcleos cerebrales.

En conclusión, nuestros resultados muestran que el aislamiento social post-destete altera la relación de ocurrencia de AG y EPE, y disminuye la duración de EPE en el periodo juvenil; mientras que en la edad adulta, disminuye la eficacia copulatoria de las ratas machos. Es probable que esta falta de interacción social durante el periodo preadolescente afecte el procesamiento de información sensorial, los niveles hormonales o neuroquímicos, y/o el funcionamiento de ciertas estructuras cerebrales, aunque substancialmente la relación causal implicada en esta interpretación requiere de más investigación. Estos datos esclarecen el papel de la experiencia social post-destete sobre el desarrollo de los índices conduc-

chemical modulation of these structures (Cooke *et al.* 2000; Ferdman *et al.* 2007; Han *et al.* 2011). Since these cerebral areas have been implicated in sexual motivation and the processing of sexually-relevant stimuli (Ágmo *et al.* 1995; Hernández-González & Guevara 2009), it is likely that this reduced copulatory efficiency is the result of the altered functioning of these brain nuclei.

In conclusion, our findings show that post-weaning social isolation altered the relation of the occurrence of GG and SPE, and decreased the duration of SPE in the juvenile period; while in adult age, it decreased the copulatory efficiency of male rats. It is probable that this lack of social interaction during the preadolescent period affects the processing of sensory information, hormonal or neurochemical levels, and/or the functioning of certain brain structures, although substantiating the causal relationship implied in this interpretation will require further research. These data highlight the role of post-weaning social experience in the development of behavioral indices of sexual maturation, and suggest an important long-term effect on the performance of sexual behavior in male rats. ❖

tuales de maduración sexual, y sugieren un importante efecto a largo plazo sobre la ejecución de la conducta sexual en ratas machos. ❖

Referencias | References

- BAKKER, J. J. VAN OPHEMERT & A.K. SLOB. 1995.** Postweaning housing conditions and partner preference and sexual behavior of neonatally ATD-treated male rats. *Psychoneuroendocrinology* **20**: 299–310. [ISSN: 0306-4530]
- BEATTY, W.W. 1979.** Gonadal hormones and sex differences in non-reproductive behaviors in rodents. Organizational and activational influences. *Hormones and Behavior* **12**: 112–163. [ISSN: 0018-506X]
- BEATTY, W.W., A.M. DODGE, L.J. DODGE, K. WHITE & J. PANKSEPP. 1982.** Psychomotor stimulants, social deprivation and play in juvenile rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **16**: 417–422. [ISSN: 0091-3057]
- BERRIDGE, K.C. & J.C. FENTRESS. 1987.** Disruption of natural grooming chains after striato-pallidal lesions. *Psychobiology* **15**(4): 336–342. [ISSN: 0889-6313]
- BERTOLINI, A., S. GENEDANI & M. CASTELLI. 1978.** Behavioral effects of naloxone in rats. *Experientia* **34**: 771–772. [ISSN: 0014-4754]
- BINDRA, D. & N. SPINNER. 1958.** Responses to different degree of novelty. The incidence of various activities. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* **1**: 341–350. [ISSN: (Print) 0022-5002; (Online) 1938-3711]
- BOLLES, R.C. 1960.** Grooming behavior in the rat. *Journal of Comparative Physiology* **53**: 306–310. [ISSN: (Print) 0174-1578; (Online) 1432-136X]
- BROTTO, L. A., B.B. GORZALKA & L.A. HANSON. 1998.** Effects of housing conditions and 5HT2A activation on male rat sexual behavior. *Physiology & Behavior* **63**: 475–479. [ISSN: 0031-9384]
- CHRISTIE, J.F. & E.P. JOHNSEN. 1983.** The role of play in social-intellectual development. *Review of Educational Research* **53**: 93–115. [ISSN: 1990-3839]
- COLBERN, D.L., R.L. ISAACSON, E.J. GREEN & W.H. GISPEN. 1978.** Repeated intraventricular injections of ACTH 1-24: The effects of home or novel environments on excessive grooming. *Behavioral Biology* **23**: 38–1387. [ISSN: 0197-9922]
- COOKE, B.M., W. CHOWANADISAI & S.M. BREEDLOVE. 2000.** Post-weaning social isolation of male rats reduces the volume of the medial amygdala and leads to deficits in adult sexual behavior. *Behavioral Brain Research* **117**: 107–113. [ISSN: (Print) 0166-4328; (Online) 1872-7549]
- DELIUS, J. 1967.** Displacement activities and arousal. *Nature* **214**: 1259–1260. [ISSN: 0028-0836]
- EINON, D.F., M.J. MORGAN & C.C. KIBBLER. 1978.** Brief periods of socialization and later behavior in the rat. *Developmental Brain Research* **11**: 213–225. [ISSN: 0165-3806]
- FRANKOVÁ, S. 1973.** Effects of protein-calorie malnutrition on the development of social behavior in rats. *Developmental Psychobiology* **6**: 33–43. [ISSN: 1939-0599]
- FULGHERI, F., C.L. DI PRISCO & P. VERDARELLI. 1975.** Influence of long-term isolation on the production and metabolism of gonadal sex steroids in male and female rats. *Physiology & Behavior* **14**: 495–499. [ISSN: 0031-9384]
- GERALL, H.D., I.L. WARD & A.A. GERALL. 1967.** Disruption of the male rat's sexual behavior induced by social isolation. *Animal Behaviour* **15**: 54–58. [ISSN: 0003-3472]
- GOLDFOOT, D.A. & M.J. BAUM. 1972.** Initiation of mating behavior in developing male rats following peripheral electric shock. *Physiology & Behavior* **8**: 857–863. [ISSN: 0031-9384]
- HENNESSY, M.B. 1997.** Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* **21**: 11–29. [ISSN: 0149-7634]
- HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. 2000.** Prepubertal genital grooming and penile erections in rela-

- tion to sexual behavior of rats. *Physiology & Behavior*. **71**: 51–56. [ISSN: 0031-9384]
- HOFER, M.A. 1987.** Early social relationships: A psychobiologist's view. *Child Development*. **58**: 633–347. [ISSN: 1467-8624]
- HOL, T., C.L. VAN DEN BERG, J.M. VAN REE & B.M. SPRUIJT. 1999.** Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behavioral Brain Research*. **100**: 91–97. [ISSN: (Print) 0166-4328; (Online) 1872-7549]
- HOLMES, G.M. & B.D. SACHS. 1992.** Erectile function and bulbospongiosus EMG activity in estrogen-maintained castrated rats vary with behavioral context. *Hormones and Behavior*. **26**: 406–419. [ISSN: 0018-506X]
- IKEMOTO, S. & J. PANKSEPP. 1992.** The effects of early social isolation on the motivation for social play in juvenile rats. *Developmental Psychobiology*. **25**: 261–274. [ISSN: 1939-0599]
- JOLLES, J., J. ROMPA-BARENDREGT & W.H. GISPEN. 1979B.** Novelty and grooming behavior in the rat. *Behavioral and Neural Biology*. **25**: 563–572. [ISSN: 0163-1047]
- JOLLES, J., J. ROMPA-BARENDREGT & W.H. GISPEN. 1979A.** ACTH induced excessive grooming in the rat: the influence of environmental and motivational factors. *Hormones and Behavior*. **12**: 160–172. [ISSN: 0018-506X]
- KNOWLES, P.A., R.L. CONNER & J. PANKSEPP. 1989.** Opiate effects on social behavior of juvenile dogs as a function of social deprivation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **33**: 533–537. [ISSN: 0091-3057]
- LARSSON, K. 1978.** Experiential factors in the development of sexual behavior. In: Hutchinson, J. B., eds. *Biological determinants of sexual behavior*. (New York). John Wiley & Sons: 55–86. [ISBN 10: 0471994901 / ISBN 13: 9780471994909]
- LEIPHEIMER, R.E. & B.D. SACHS. 1993.** Relative androgen sensitivity of the vascular and striated-muscle systems regulating penile erection in rats. *Physiology & Behavior*. **54**: 1085–1090. [ISSN: 0031-9384]
- LUPO DI PRISCO, C., N. LUCARINI & F. DESSI-FULGHERI. 1978.** Testosterone aromatization in rat brain is modulated by social environment. *Physiology & Behavior*. **20**: 345–348. [ISSN: 0031-9384]
- MASON, W.A. 1960.** The effects of social restriction on the behavior of rhesus monkeys: I Free social behavior. *Journal of comparative & physiological psychology* **53**: 582. [ISSN: 0021-9940]
- MEISEL, R.I. & B.D. SACHS. 1994.** The physiology of male sexual behavior. In: Kobil, E.; Neill, J. D., (eds). *The Physiology of Reproduction*. (New York): Raven Press, Ltd.: 3–105. [ISBN 10: 0881672815/ISBN 13: 9780881672817]
- MEISEL, R.L., J.K. O'HANLON & B.D. SACHS. 1984.** Differential maintenance of penile responses and copulatory behavior by gonadal hormones in castrated male rats. *Hormones and Behavior*. **18**: 56–64. [ISSN: 0018-506X]
- MOORE, C.L. & S.A. ROGERS. 1984.** Contribution of self-grooming to onset the puberty in male rats. *Developmental Psychobiology*. **17**: 243–253. [ISSN: 1939-0599]
- MOORE, C.L. 1984.** Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Developmental Psychobiology*. **17**: 346–356. [ISSN: 1939-0599]
- MOORE, C.L. 1986.** A hormonal basis for sex differences in the self-grooming of rats. *Hormones and Behavior*. **20**: 155–165. [ISSN: 0018-506X]
- MOORE, C.L. 1986.** Sex differences in self-grooming of rats: Effects of gonadal hormones and context. *Physiology & Behavior*. **36**: 451–455. [ISSN: 0031-9384]
- MOORE, C.L. 1988.** Maternal and self-grooming in norway rats. Mechanisms and consequences of dissociable components. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **525**: 425–427. [ISSN: 1749-6632]
- MOORE, C.L. 1992.** The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **662**: 160–177. [ISSN: 1749-6632]
- NOVAK, M. A. 1979.** Social recovery of monkeys isolated for the first year of life: II long-term assessment. *Developmental Psychobiology*. **15**: 50–61. [ISSN: 1939-0599]
- PANKSEPP, J, E. NELSON & M. BEKKEDAL. 1997.** Brain systems for the mediation of social separation-distress and social-reward. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **807**: 78–100. [ISSN: 1749-6632]
- PANKSEPP, J., N.J. BEAN, P. BISHOP, T. VILBERG & T.L. 1980.** Sahley. Opioid blockade and social

- comfort in chicks. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **13**: 673–683. [ISSN: 0091-3057]
- PELLIS, S. M. 1993.** Sex and the evolution of play fighting: A review and model based on the behavior of muroid rodents. *Play Theory and Research*. **1**: 55–75. [ISBN: 0-19-516285-4]
- SACHS, B. D. & R.L. MEISEL. 1979.** Pubertal development of penile reflexes and copulation in male rats. *Psychoneuroendocrinology* **4**: 287–296. [ISSN: 0306–4530]
- SACHS, B.D. 1988.** *The development of grooming and its expression in adult animals.* In: Colbern, D.L.; W.H. Gispen, (eds.). *Neural Mechanisms and Biological Significance of Grooming Behavior.* (New York): *Annals of the New York Academy of Sciences*. **525**: 1–17. [ISSN: 1749-6632]
- SACHS, B.D., J.T. CLARK, A.G. MOLLLOY, D. BITRAN & G.M. 1988.** Holmes. Relation of autogrooming to sexual behavior in male rats. *Physiology & Behavior*. **43**: 637–643. [ISSN: 0031-9384]
- SALAS, M., S. PULIDO, C. TORRERO & C. ESCOBAR. 1991.** Neonatal undernutrition and self-grooming development in the rat: Long-term effects. *Physiology & Behavior*. **50**: 567–572. [ISSN: 0031-9384]
- VAN DEN BERG, C.L., J.M. VAN REE, B.M. SPRUIJT, H. EVERTS & J.M. KOOLHAAS. 1999.** Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Developmental Psychobiology*. **34**: 129–138. [ISSN: 1939-0599]

e-Cucba es una revista internacional en línea, que publica artículos en cualquier aspecto de las Ciencias Naturales, Ciencias Aplicadas y Tecnología y que son sometidos a revisión por pares antes de su aceptación. Considera documentos sobre: Geociencias, Paleontología, Ciencias Biológicas, Botánica, Zoología, Tecnología y ciencias aplicadas, Ciencias médicas, Ingeniería y operaciones afines, Agricultura, Ganadería, Ciencias Florestales, Ciencia de los alimentos y tecnologías afines. Para los documentos que comprendan 60 páginas o más en la revista, se publicarán en un número especial y se le asignará además, un ISBN.

e-Cucba no tiene ningún costo por página y es una publicación de acceso libre. Todos los textos serán sometidos a revisión por dos o más árbitros anónimos antes de ser aceptados. **e-Cucba** pretende publicar cada documento en un plazo de seis meses después de la aceptación por parte de los editores. Para hacer esto posible, se aconseja en la preparación de su manuscrito leer con cuidado la información para los autores y consultar los números más recientes de **e-Cucba** en: <http://e-cucba.cucba.udg.mx>



Consejo Editorial del Cucba 2013-2016

Salvador Mena Munguía
Salvador González Luna
Servando Carvajal
Florencio Recendiz Hurtado
Daniel Ortuño Sahagún
Eduardo Ríos Jara
Rogelio Lépiz Ildefonso
Agustín Gallegos Rodríguez
Elisa Cabrera Díaz
Margarita Hernández Gallardo