



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**CAPACIDAD DE REBROTE, PRODUCCIÓN DE ÁREA FOLIAR Y CALIDAD NUTRITIVA DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Crotalaria***

**NOHEMI PARDO AGUILAR**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2019



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas  
Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz

**SADER**

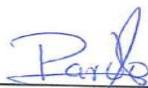
SECRETARÍA DE AGRICULTURA  
Y DESARROLLO RURAL



## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el(la) que suscribe Nohemi Pardo Aguilar, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora Luz del Carmen Lagunes Espinoza, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Capacidad de rebrote, producción de área foliar y calidad nutritiva de dos especies del género *Crotalaria*** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, la Consejera de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

H. Cárdenas, Tabasco, a 25 de septiembre de 2019.

  
Firma

  
Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza  
Vo. Bo. Profesora Consejera

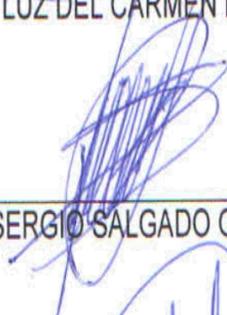
La presente tesis, titulada “**CAPACIDAD DE REBROTE, PRODUCCIÓN DE ÁREA FOLIAR Y CALIDAD NUTRITIVA DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO CROTALARIA**”, realizado por la alumna: **NOHEMI PARDO AGUILAR**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

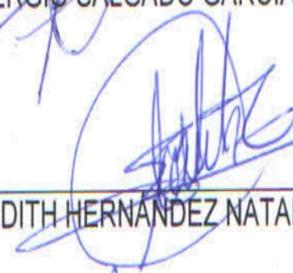
**MAESTRA EN CIENCIAS**

EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:   
DRA. LUZ DEL CARMEN LAGUNES ESPINOZA

ASESOR:   
DR. SERGIO SALGADO GARCÍA

ASESORA:   
DRA. EDITH HERNÁNDEZ NATAREN

ASESOR:   
DR. EDUARDO DANIEL BOLAÑOS AGUILAR

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 25 DE SEPTIEMBRE DEL 2019.

# CAPACIDAD DE REBROTE, PRODUCCIÓN DE ÁREA FOLIAR Y CALIDAD NUTRITIVA DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *CROTALARIA*

Nohemi Pardo Aguilar, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2019

## RESUMEN

No existen estudios sobre el efecto de diferentes condiciones de manejo en la producción de follaje y composición química de especies del género *Crotalaria* en México, particularmente del Chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), quelite nativo de Mesoamérica, del que se consumen sus hojas y brotes tiernos en el sur-sureste de México, o de especies exóticas presentes en el estado de Tabasco como es la arvense Ala de pico (*Crotalaria retusa* L.) usada en la medicina tradicional en África, y Asia de donde es originaria. Por ello, el objetivo fue evaluar la capacidad de rebrote y la calidad nutricional de la biomasa producida de Chipilín y Ala de pico en respuesta a cortes sucesivos del follaje y fertilización. A partir de tres cortes mensuales aplicados al follaje de ambas especies y dosis de fertilización (0-0-0, 100-0-0, 0-60-0 kg ha<sup>-1</sup> de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O) se determinó el número, longitud y peso de tallos secundarios, biomasa, área foliar, índice diferencial de vegetación normalizado (NDVI), concentración de pigmentos fotosintéticos, proteína, grasa, cenizas, azúcares solubles, fibra dietética total y polifenoles totales. La aleatorización de los tratamientos se realizó mediante un diseño completamente al azar con seis repeticiones, y se analizó con el modelo de medidas repetidas. El Chipilín mostró una mayor capacidad de rebrote que el ala pico, ya que la cantidad y la biomasa de rebrotes por planta aumentaron debido a los sucesivos cortes de follaje. La fertilización no tuvo efecto en el crecimiento y biomasa aérea de ambas especies, pero disminuyó la biomasa de raíz en Chipilín. La fertilización afectó negativamente la nodulación en ambas especies, principalmente la fertilización nitrogenada. El efecto de la fertilización fue no significativo para el contenido de grasa, cenizas, azúcares reductores y polifenoles totales. La fertilización fosfatada disminuyó el contenido de fibra dietética solo en hojas de Chipilín. Entre especies, el Chipilín presentó contenidos más altos de proteína, de cenizas y de fibra dietética que Ala de pico. Este es el primer estudio en México sobre el manejo del follaje de Chipilín, el cual muestra que este mejora el rendimiento y calidad de la biomasa foliar.

**Palabras clave:** Leguminosa, biomasa, fertilización, proteína, nitrógeno y fósforo

# REGROWTH CAPACITY, LEAF AREA PRODUCTION AND NUTRITIONAL QUALITY OF TWO SPECIES OF THE *CROTALARIA* GENRE

Nohemi Pardo Aguilar, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2019

## ABSTRACT

There are no studies on the effect of different management conditions on the production of foliage and chemical composition of species of the *Crotalaria* genus in Mexico, particularly of Chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), quelite native to Mesoamerica, whose tender leaves and buds are eaten in the south-southeast of Mexico, or of exotic species present in the state of Tabasco such as Ala de pico weed (*Crotalaria retusa* L.) used in traditional medicine in Africa, and Asia from where it is native. Therefore, the objective was to evaluate the regrowth capacity and nutritional quality of the biomass produced from Chipilín and Ala de pico in response to successive cuts of foliage and fertilization. From three monthly cuts applied to the foliage of both species and fertilization dose (0-0-0, 100-0-0, 0-60-0 kg ha<sup>-1</sup> of N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and K<sub>2</sub>O) the number, length and weight of secondary stems, biomass, leaf area, standardized differential vegetation index (NDVI), concentration of photosynthetic pigments, protein, fat, ash, soluble sugars, total dietary fiber and total polyphenols were determined. The randomization of the treatments was by a completely randomized design with six repetitions, and they were analyzed with the repeated measures model. The Chipilín showed a greater regrowth capacity than Ala de pico, as the shoots number and regrowth biomass per plant increased due to the successive cuts to the foliage. Fertilization had no effect on growth and aerial biomass of both species but decreased root biomass in Chipilín. Fertilization negatively affected nodulation in both species, mainly nitrogen fertilization. The effect of fertilization was not significant for fat content, ashes, reducing sugars and total polyphenols. Phosphate fertilization decreased the dietary fiber content only in Chipilín leaves. Among species, Chipilín had higher protein, ash and dietary fiber contents than Ala de pico. This is the first study in Mexico on Chipilín foliage management, which improves the yield and quality of leaf biomass.

**Key words:** Legume, biomass, fertilization, protein, nitrogen and phosphorus

## DEDICATORIA

*A ti Dios, por la vida, dones y virtudes, por lograr este éxito intelectual que tanto anhelé.*

*A mis padres Sr. Pablo Pardo Flores y Sra. Fidencia Aguilar Osorio, por su comprensión, motivación y apoyo durante mi vida, lo que ha permitido superarme cada día más.*

*A mi amado esposo Sr. Diego González Calderón, que con amor, confianza, trabajo y sacrificios me llevaste por la senda que traza mi futuro.*

*A mi amor e hijas, Diana y Daysi Marilyn González Pardo que son la fuerza que impulsa a mi corazón, les dedico este trabajo.*

*A mis hermanos (as), Raquel, Marilyn, Miguel, José Guadalupe, Didier, Josué, Pablo y Rebeca por el apoyo incondicional y estar siempre conmigo, por protegerme durante toda mi vida.*

*A mi suegra Sra. Argelia Calderón de la Cruz e hijas: Leticia y Rebeca, por el gran apoyo y cariño que me brindan.*

*A mi familia en general, Pardo y González por compartir conmigo buenos y malos momentos.*

*A mis maestros del IJAOS por brindarme su amistad y apoyo incondicional e impulsarme a continuar.*

*A mis maestros del Colegio Campus Tabasco por brindarme conocimientos y apoyo incondicional*

*A toda la gente maravillosa que me han acompañado a lo largo de este proceso, por su confianza, cariño y apoyo condicional. A quienes, de alguna u otra forma, me han ayudado a salir de apuros, dudas o crisis existenciales.*

*"Un sutil pensamiento erróneo puede dar lugar a una indagación fructífera que revela verdades de gran valor" (Asimov Isaac).*

## AGRADECIMIENTOS

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT):** Por la beca otorgada para realizar este postgrado en maestría en ciencias.

**Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco:** Por abrirme sus puertas desde el programa: Capacitación de estudiantes de alto rendimiento (CEAR) y por aceptarme en el programa de Maestría en Ciencias.

**A la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza:** Por su importante desempeño en la dedicación y dirección de este trabajo de investigación, por todo el apoyo brindado en el Laboratorio de Fisiología vegetal e invernadero, así como los consejos para mi formación, siempre estaré agradecida con usted. Muchas gracias por desempeñar tan excelente papel, siempre sea así Dra. **Bendiciones.**

**A la Dra. Edith Hernández Nataren:** Por su apoyo como asesora y compartir sus conocimientos en la integración de áreas, por su amistad. Además, de sus exhortaciones para que el trabajo sea de la mejor calidad.

**Al Dr. Eduardo Daniel Bolaños Aguilar:** Por su apoyo desde hace más de tres años en mi formación como residente en el INIFAP y por continuar en mi formación en esta investigación como asesor, gracias por compartir sus conocimientos, su amistad y orientarme a seguir adelante...**gracias.**

**Al Dr. Sergio Salgado García:** Por formar parte de mi Consejo particular y ayudarme a mejorar este trabajo de investigación.

**Al M.C. Francisco Izquierdo Reyes** por el apoyo en el análisis de datos usando medidas repetidas en SAS.

**Al M.C. Darío de la Cruz R.** que antes y durante mi estancia en el laboratorio de Fisiología Vegetal, me orientó activamente en el desarrollo de técnicas de laboratorio y de campo para realizar este estudio.

**A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Vegetal: Ligia E. Ricardez Miranda y a Sergio** por sus compañía y apoyo durante estos años en el CP.

**Al Laboratorio de LASPA: Dr. Armando Guerrero Peña y a los laboratoristas Esteban Osorio Gamas, Bernardo Gómez Torres, a Carolina, Alexandro y a Daniela** mil gracias por compartir sus conocimientos para conmigo, por su apoyo incondicional

**Al Laboratorio de Ciencia Animal: Dr. M. Emilio Aranda y al Técnico José Luis Jiménez de Dios** Gracias por su apoyo incondicional

**Al laboratorio de Instrumentación Analítica:** A la técnica Ricarda Ventura por apoyarme con el NIRs y compartir sus conocimientos en el uso, gracias por todo.

**A los compañeros de Laboratorio de Fitopatología:** Yesenia, Karina, Luis Alberto, Bismarck y Doña Isa gracias por su amistad y apoyo.

**A mis compañeros de generación: Alejandra García M., Francisco Rojas, Sergio Salgado V., Ángel Mario Domínguez,** con quienes me tocó cursar esta importante etapa en la formación académica, muchas gracias por todo, que siempre estén disponibles para mí y nos podamos apoyar unos a otros, siempre estarán en mi corazón.

**A los ahora ya M.C. Geiner Francisco Alvarez Sánchez, Lorena de la Cruz y a Oscar López Hernández** gracias por su apoyo y amistad sincera.

**A Elsy, Deyanira, Verónica, Anita y Celia:** Gracias por su amable ayuda en los trámites académicos de la maestría.

Sin ánimo de olvidar a nadie en particular, que de una u otra manera han compartido mi vida en estos últimos años, mis más sinceros agradecimientos a su comprensión, estímulo y ayuda ya que todos son parte de este éxito logrado.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Planteamiento del problema .....	1
1.1. Objetivos .....	3
1.1.1. General.....	3
1.1.2. Particulares.....	3
1.2. Hipótesis .....	4
1.3. Estructura de la tesis.....	4
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
2.1. Origen del género <i>Crotalaria</i> .....	6
2.2. Generalidades de dos especies de <i>Crotalaria</i> , una especie nativa de México ( <i>C. longirostrata</i> Hook. & Arn.) y una especie introducida ( <i>C. retusa</i> L.).....	6
2.2.2. <i>C. retusa</i> .....	9
2.3. La nodulación en las especies de <i>Crotalaria</i> .....	10
2.4. Calidad nutricional.....	12
2.4.1. Alcaloides pirrolizidínicos .....	14

2.5. Usos de <i>C. longirostrata</i> (Chipilín) y <i>C. retusa</i> (Ala de pico) .....	15
2.6. Estrategias de manejo agronómico para incrementar biomasa foliar y calidad .....	17
2.6.1. Cortes sucesivos al follaje y frecuencia de corte .....	17
2.6.2. Fertilización.....	18
2.6.3. Densidad de plantas .....	19
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
3.1. Material biológico .....	20
3.1.1. Sitio experimental .....	21
3.1.2. Diseño experimental y tratamientos.....	21
3.1.3. Manejo del experimento.....	22
3.1.4. Variables de estudio .....	22
3.2. Biomasa, área foliar y nódulos .....	22
3.3. Materia seca y humedad.....	23
3.4. Determinación de la concentración de clorofila .....	23
3.5. Índice diferencial de vegetación normalizado (NDVI).....	23
3.6. Proteína cruda (PC) .....	24
3.7. Determinación de cenizas .....	25
3.8. Determinación de grasa .....	26
3.9. Determinación de azúcares solubles totales .....	26

3.10.	Determinación de polifenoles totales, PFT.....	27
3.11.	Determinación de fibra dietética total, FDT .....	28
3.2.	Análisis estadístico.....	29
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		31
4.1.	PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ÁREA FOLIAR DE <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> EN RESPUESTA A CORTES SUCESIVOS Y FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y FOSFATADA.....	31
4.1.1.	Altura de tallo principal, longitud y diámetro de rebrotes .....	31
4.1.2.	Producción de biomasa y área foliar.....	33
4.1.2.	Pigmentos fotosintéticos y NDVI.....	35
4.1.3.	Biomasa de raíz y nodulación.....	40
4.1.4.	Plagas y enfermedades observadas durante el estudio.....	43
4.2.	CALIDAD NUTRITIVA DE <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> EN RESPUESTA A CORTES SUCESIVOS Y FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y FOSFATADA ..	47
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		65
5.1.	Conclusiones.....	65
5.2.	Recomendaciones .....	66
CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA.....		67

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Rango de composición mineral, y capacidad antioxidante de hojas de tres accesiones de <i>C. longirostrata</i> , procedentes de México y Guatemala (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015).....	12
<b>Cuadro 2.</b> Usos en medicina tradicional de <i>Crotalaria retusa</i> en diferentes partes del mundo (Nuhu, 1999).....	17
<b>Cuadro 3.</b> Concentración de ácido gálico para la curva de calibración usada en la cuantificación de Polifenoles Totales .....	28
<b>Cuadro 4.</b> Cuadrados medios del ANOVA para la altura de planta, longitud, diámetro y número de rebrotes por planta en dos especies de <i>Crotalaria</i> en estudio. ....	31
<b>Cuadro 5.</b> Medias para altura del tallo principal, número, longitud y diámetro de rebrotes en <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> .....	32
<b>Cuadro 6.</b> Cuadrado medio del análisis de varianza para la biomasa de rebrotes planta <sup>-1</sup> y el área foliar en las especies de <i>Crotalaria</i> en estudio. ....	33
<b>Cuadro 7.</b> Medias de la biomasa y área foliar de rebrotes por planta en dos especies de <i>Crotalaria</i> en estudio. ....	34
<b>Cuadro 8.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza y medias de la interacción especie*corte para la relación hoja: tallo en las especies de <i>Crotalaria</i> en estudio. ....	34
<b>Cuadro 9.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza y medias de la interacción especie*corte para la tasa relativa de crecimiento en dos especies de <i>Crotalaria</i> en estudio.....	35

<b>Cuadro 10.</b> Concentración de pigmentos fotosintéticos e índice de vegetación de la diferencia normalizada (NDVI) en hojas de <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> sometidas a cortes sucesivos del follaje.....	36
<b>Cuadro 11.</b> Cuadrados medios del Análisis de varianza en biomasa de raíz y número de nódulos plantan <sup>-1</sup> en dos especies de <i>Crotalaria</i> en estudio. ....	40
<b>Cuadro 12.</b> Medias de la biomasa de raíz y nodulación en dos especies de <i>Crotalaria</i> en estudio. ....	42
<b>Cuadro 13.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza del porcentaje de proteína, ceniza y grasa cruda de dos especies de <i>Crotalaria</i> : <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> . ....	47
<b>Cuadro 14.</b> Medias para proteína, cenizas y grasa cruda por corte en hoja y tallo de dos especies evaluadas de <i>Crotalaria</i> .....	48
<b>Cuadro 15.</b> Medias del contenido de proteína y de grasa para la interacción especie*órgano en las especies de <i>Crotalaria</i> en estudio.....	49
<b>Cuadro 16.</b> Medias del contenido de proteína, grasa y cenizas en hojas y tallo de rebrotes para la interacción especie*fertilización en <i>Crotalaria</i> .....	49
<b>Cuadro 17.</b> Cuadrados medios del análisis de la varianza para la concentración de azúcares solubles totales de dos especies de <i>Crotalaria</i> .....	52
<b>Cuadro 18.</b> Cuadrados medios de fibra dietética total y polifenoles totales en hojas de dos especies <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> .....	54
<b>Cuadro 19.</b> Medias del contenido de polifenoles y de fibra dietética total para la interacción especie*fertilización en las especies de <i>Crotalaria</i> en estudio.....	55
<b>Cuadro 20.</b> Cuadrados medios para el contenido de proteína y ceniza en semillas de cuatro especies de <i>Crotalaria</i> en estudio .....	60
<b>Cuadro 21.</b> Medias del contenido de proteína y de ceniza en semillas de cuatro especies de <i>Crotalaria</i> en estudio. ....	60

**Cuadro 22.** Cuadrados medios del análisis de varianza para los contenidos de grasa cruda, azúcares solubles, polifenoles totales y fibra dietética en semillas de cuatro especies de *Crotalaria*..... 62

**Cuadro 23.** Medias para grasa cruda, azúcares solubles totales, polifenoles totales y % fibra dietética total en semillas de cuatro especies en estudio. .... 62

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. en México. Los círculos indican sitios de presencia de esta especie. Imagen tomada de: <https://www.naturalista.mx/taxa/161144-Crotalaria-longirostrata> ..... 8
- Figura 2.** Distribución de *C. retusa* L. a nivel mundial (CABI, 2016)..... 10
- Figura 3.** Planta en floración de *C. longirostrata* procedentes del Banco de especies forrajeras INIFAP, Huimanguillo, Tabasco (a). Vainas y semillas de *C. longirostrata* extraídas en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del recinto Campus Tabasco (b)..... 20
- Figura 4.** Planta en floración de *C. retusa* L. (a). Vainas y semillas de *C. retusa*. Laboratorio de Fisiología Vegetal del recinto Campus Tabasco (b)..... 21
- Figura 5.** Vista del GreenSeeker™ y de la toma de la lectura en el experimento 24
- Figura 6.** Diámetro promedio de rebrotes después de la aplicación de los cortes sucesivos al follaje de *C. longirostrata* y *C. retusa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el error estándar. .... 32
- Figura 7.** Tasa relativa de crecimiento de la biomasa de rebrotes (A) y tasa absoluta de crecimiento de la biomasa total (B) en dos especies de *Crotalaria*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el error estándar. .... 35
- Figura 8.** Efecto de la fertilización nitrogenada y fosfatada en el NDVI en las dos especies de *Crotalaria* en estudio. Las barras indican el error estándar..... 37
- Figura 9.** Relación entre el NDVI y la biomasa de rebrotes en las especies de *Crotalaria* en estudio, con y sin fertilización nitrogenada y fosfatada. C=control, N=Nitrógeno, P=Fósforo. .... 38

<b>Figura 10.</b> Efecto de la fertilización en la relación NDVI y biomasa de rebrotes planta-1 en las especies de <i>Crotalaria</i> en estudio.....	38
<b>Figura 11.</b> Relación entre los pigmentos fotosintéticos y el NDVI con y sin fertilización en dos especies de <i>Crotalaria</i> .....	39
<b>Figura 12.</b> Efecto de la fertilización en la biomasa de raíz (A) y en la nodulación (B) de dos especies de <i>Crotalaria</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	41
<b>Figura 13.</b> Morfología de nódulos en <i>C. longirostrata</i> (a) y <i>C. retusa</i> (b). 0.65X... 42	
<b>Figura 14.</b> Presencia del gusano cortador ( <i>Spodoptera</i> sp) en <i>C. retusa</i> .....	43
<b>Figura 15.</b> Presencia de cochinilla algodonosa ( <i>Pseudococcus citri</i> ) en chipilín ( <i>C. longirostrata</i> ). .....	44
<b>Figura 16.</b> Presencia de mosquita blanca ( <i>Trialeurodes vaporariorum</i> ) en chipilín ( <i>C. longirostrata</i> ). .....	44
<b>Figura 17.</b> Presencia de gusano medidor y su efecto en hojas de <i>C. longirostrata</i> durante el mes de octubre de 2019.....	45
<b>Figura 18.</b> Presencia de cenicilla polvorienta ( <i>Oidiopsis</i> sp.) en hojas de <i>C. retusa</i> . .....	46
<b>Figura 19.</b> Efecto de la interacción corte*órgano en el contenido de proteína (%) de dos especies <i>Crotalaria</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	48
<b>Figura 20.</b> Contenido de cenizas (%) por corte en dos especies de <i>Crotalaria</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	52
<b>Figura 21.</b> Contenido de azúcares solubles totales en hoja y tallo ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ) en las especies de <i>Crotalaria</i> en estudio. Letras diferentes indican diferencias	

significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el error estándar. .....	53
<b>Figura 22.</b> Efecto del corte en el contenido de azúcares solubles totales ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) en hojas y tallos de <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	53
<b>Figura 23.</b> Efecto de la fertilización en el contenido de fibra dietética total de <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	56
<b>Figura 24.</b> Efecto del corte en el contenido de fibra dietética total de hojas de <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	57
<b>Figura 25.</b> Efecto de fertilización en el contenido de polifenoles totales en hojas de <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	58
<b>Figura 26.</b> Efecto del corte en el contenido de polifenoles totales en hoja de <i>C. longirostrata</i> y <i>C. retusa</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	59
<b>Figura 27.</b> Porcentaje de proteína en semillas de cuatro especies de <i>Crotalaria</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) .....	61
<b>Figura 28.</b> Contenido de cenizas (%) en semillas de cuatro especies de <i>Crotalaria</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	61
<b>Figura 29.</b> Contenido de grasa cruda en <i>C. longirostrata</i> , <i>C. retusa</i> , <i>C. incana</i> y <i>C. pallida</i> . Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). .....	63

**Figura 30.** Contenido en azúcares solubles totales en semillas de *C. longirostrata*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). ..... 63

**Figura 31.** Contenido de polifenoles totales en semillas de *C. longirostrata*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). ..... 64

**Figura 32.** Contenido de fibra dietética total (%) en semillas de *C. longirostrata*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). ..... 64

# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1. Planteamiento del problema

Actualmente, se conocen 30 000 especies de plantas terrestres de las que 7000 son utilizadas por los seres humanos como alimento, pero sólo 30 de ellas se cultivan de manera extensiva para alimentar al mundo (FAO, 2017). México por ser uno de los 12 países megadiversos, posee muchas especies vegetales que son utilizadas en la alimentación regional, las que podrían tener un alto impacto en la seguridad alimentaria y nutricional, si se desarrollaran en sistemas sustentables de producción (Aguilar *et al.*, 2008).

Dentro de los recursos fitogenéticos valiosos por su uso regional en la alimentación mexicana, y que han sido poco estudiados, se encuentran especies del género *Crotalaria*. En México se reportan 21 especies de este género, donde se incluye al Chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn), también conocido como chop, chipile, chepil (Soto-Estrada, 2004), quelite nativo de Mesoamérica y presente en todo el estado de Tabasco y el sur del país. El Chipilín es una planta anual de la cual se consume el follaje y es utilizada en la medicina popular; sus ramas están compuestas por tres hojas pequeñas en forma ovalada y color verde oscuro, tiene flores de color amarillo intenso y con forma de mariposa que constituyen racimos en la punta de la rama. Esta especie además del uso alimentario, tiene importancia ecológica ya que pertenece a la familia *Fabaceae*, por lo que aporta nitrógeno atmosférico al suelo a través de la fijación biológica; es atrayente de insectos como abejas productoras de miel y polinizadores. Puede ser usada en la elaboración de papel y presenta un gran potencial para inducir el sueño (Rodríguez *et al.*, 1998). El follaje de esta planta anual es rico en proteína, pero también en fibras y metabolitos secundarios como los polifenoles, flavonoides y alcaloides pirrolizidínicos, estos últimos se encuentran en mayor concentración en las semillas (Williams y Molyneux, 1987; Arias *et al.*, 2003, Juárez-Fuentes *et al.*, 2013; Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015; Pérez-Cornelio *et al.*, 2016). En el sur de Veracruz se indica su uso como forraje (Arias *et al.*, 2003). Es uno de los quelites con mayor contenido nutrimental, rico en calcio, hierro, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico

(Morton, 1994). Otras especies de *Crotalaria*, exóticas y presentes en México, son usadas en otros países en alimentación y como abonos verdes, aun cuando se reporta su toxicidad (Jaca *et al.*, 2013; Avendaño, 2011), tal es el caso de *Crotalaria retusa* L., o Ala de pico. Esta especie se planta con frecuencia en sistemas agroforestales para la producción de fibra, forraje, abono verde y cobertura (CABI, 2016; ILDIS, 2013; USDA-NRCS, 2013). Genera impactos económicos en sistemas agroforestales en los Estados Unidos, de las Indias Occidentales, Asia tropical, y en varias islas del Océano Pacífico. Una vez naturalizado crece como planta arvense y puede convertirse en invasora, desplazando la vegetación nativa (CABI, 2016). En el estado de Tabasco, ya está presente. En África, las raíces se usan contra la tos crónica, las hojas se usan para tratar la fiebre, la sarna, las enfermedades pulmonares y el impétigo (enfermedad infecciosa de la piel), además las flores y las hojas también se consumen como verdura y las semillas tostadas se consumen en Vietnam y África. Ocasionalmente, *C. retusa* se cultiva como ornamental y se usa como una planta de tinte en África Oriental (PROTA4U, 2013).

Tabasco es un estado megadiverso, donde sus habitantes han utilizado la flora presente para alimentación y medicina. Entre las 140 especies de plantas que las comunidades rurales han seleccionado a través del tiempo para su consumo como alimento o medicina está *Crotalaria longirostrata* (Centurión *et al.*, 2004). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida, principalmente, en los municipios de Cárdenas, Centro, Cunduacán, Jalapa, Huimanguillo, Macuspana, Tacotalpa y Teapa, donde se consumen las hojas y los brotes tiernos en diferentes platillos regionales; indican también su uso medicinal como antidiarreico en niños (Centurión *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005). No obstante, el arraigo del Chipilín en la cultura culinaria del sur de Veracruz, Tabasco y Chiapas, hay pocos estudios sobre su composición química, y nutricional bajo diferentes condiciones ambientales, y no existen estudios sobre su manejo agronómico, tampoco existe este tipo de estudios para otras especies de *Crotalaria* presentes en la región. Los trabajos de Juárez-Fuentes *et al.* (2013) y Pérez-Cornelio (2016) muestran el potencial que el Chipilín puede tener como fuente de proteína y de otros metabolitos en alimentación humana y animal, con lo que puede dársele valor agregado.

Para desarrollar su sistema de producción sustentable, se requiere entre otros aspectos, conocer la respuesta del Chipilín y de otras especies de *Crotalaria* a diferentes condiciones de manejo, para evaluar su capacidad de producción de follaje y la calidad del mismo. En otras leguminosas, una forma de incrementar el rendimiento de biomasa aérea es aplicando cortes sucesivos al follaje para promover el rebrote al eliminar la dominancia apical, tal es el caso de alfalfa (Salemaa y Sievänen, 2002; Dun *et al.*, 2006; Villegas *et al.*, 2006). Esta forma de manejo se ha complementado con la fertilización, aunque en alfalfa y soya dosis de 100-120 kg ha<sup>-1</sup> de N inhiben la nodulación lo que afecta el crecimiento de la planta. (Trabulsi y Abed, 1986; Zhu *et al.*, 1996). Sin embargo, fertilizaciones a dosis menores han demostrado tener un efecto sinérgico con la fijación biológica de N, lo que puede mejorar la producción de follaje (Wahab y Abd-Alla, 1996). Por lo tanto, en la presente investigación se plantearon los objetivos siguientes.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. General**

Evaluar la capacidad de rebrote de *Crotalaria* spp. y la calidad nutricional de la biomasa producida en respuesta a cortes sucesivos del follaje y fertilización.

### **1.1.2. Particulares**

- a) Determinar el número, longitud y peso de tallos secundarios, biomasa y área foliar después de la aplicación de cortes sucesivos al follaje de *C. longirostrata* y *C. retusa* con y sin fertilización nitrogenada y fosfatada.
- b) Medir el índice de vegetación de la diferencia normalizada (NDVI) antes de la aplicación de cada corte sucesivo al follaje de *C. longirostrata* y *C. retusa* con y sin fertilización nitrogenada y fosfatada, y establecer su relación con la concentración de pigmentos fotosintéticos y la acumulación de biomasa.
- c) Cuantificar la concentración de pigmentos fotosintéticos, proteína, grasa, cenizas, azúcares solubles, fibra dietética total y polifenoles totales después

de cortes sucesivos al follaje de *C. longirostrata* y *C. retusa* con y sin fertilización nitrogenada y fosfatada; y en semillas de cuatro especies: *C. incana*, *C. longirostrata*, *C. pallida* y *C. retusa* sin fertilización.

- d) Determinar el peso de raíces y número de nódulos después de cortes sucesivos en *C. longirostrata* y *C. retusa* con y sin fertilización nitrogenada y fosfatada.

## 1.2. Hipótesis

- a) El número de rebrotes y producción de biomasa foliar se reduce por efecto de los cortes sucesivos realizados a *Crotalaria* ssp. cuando no se fertiliza con nitrógeno o fósforo.
- b) La fertilización nitrogenada incrementará el número de rebrotes, producción de biomasa foliar y concentración de proteína y otros compuestos químicos, pero inhibirá la producción de nódulos.
- c) La fertilización fosfatada afectará positivamente el número de rebrotes, producción de biomasa, concentración de proteína y la producción de nódulos.
- d) El NDVI no presenta relación con la concentración de pigmentos fotosintéticos, pero si con el rendimiento en biomasa.
- e) Las especies de *Crotalaria* presentan diferencias en la composición química tanto en hojas como en semillas.

## 1.3. Estructura de la tesis

Esta tesis se divide en cinco Capítulos principales:

El **Capítulo I** está compuesto por la Introducción General, en la cual se plantea el problema de estudio, los Objetivos y las Hipótesis, del presente trabajo de investigación.

El **Capítulo II** consiste en la revisión de literatura misma que abarca el origen del género, características botánicas, usos, distribución, calidad nutricional de las especies de *Crotalaria* en estudio. Así como la importancia de la nodulación para la fijación biológica de N<sub>2</sub>, el efecto de la fertilización nitrogenada y fosfatada y los cortes sucesivos del follaje en la acumulación de biomasa y nodulación.

El **Capítulo III** describe los materiales y métodos utilizados para cumplir con los objetivos planteados.

El **Capítulo IV** consta de dos subcapítulos en los cuales se presentan los resultados y la discusión. En el primero se abordan y discuten los resultados sobre el efecto de fertilización y de los cortes sucesivos al follaje en la producción de biomasa, área foliar y nodulación en *C. longirostrata* y *C. retusa*. En el segundo subcapítulo se discuten los resultados sobre la composición química (proteína, grasa, cenizas, azúcares solubles, fibra dietética total y polifenoles totales) del follaje de *C. longirostrata* y *C. retusa* cuando se someten a cortes sucesivos del follaje y a la fertilización nitrogenada y fosfatada. En el tercer subcapítulo se muestra la composición química de semillas de cuatro especies de *Crotalaria* presentes en la región: *C. incana*, *C. longirostrata*, *C. pallida* y *C. retusa*, sin ningún tratamiento de fertilización.

El **Capítulo V** incluye las conclusiones y recomendaciones generales del presente estudio.

## CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Origen del género *Crotalaria*

*Crotalaria* es un género que comprende más de 600 especies dispersas por todo el trópico y sub-trópico (Bhatt *et al.*, 2009). La mayor distribución es en África tropical (500 especies), seguida por el sudeste de Asia y Centroamérica (Pandey *et al.*, 2010). El este de África y Madagascar son considerados el principal centro de diversificación de este género, un segundo centro de diversificación es la India, y en América hay dos centros adicionales, uno en México y otro en Brasil (Palomino y Vázquez, 1991). De Australia son originarias 19 especies, en América, 79 especies son nativas y se encuentran relativamente bien distribuidas en Guatemala, oeste y suroeste de México y del Salvador a Costa Rica. En México, se han identificado 21 especies, ocho de ellas endémicas. Nueve especies se localizan en el Valle de Tehuacán- Cuicatlán, donde se describen que *C. incana*, *C. sagittalis*, *C. vitellina* y *C. longirostrata* se localizan también en Tabasco, la última señalada como nativa de México (Soto-Estrada, 2004; Villaseñor y Espinosa, 1998).

En Tabasco también se encuentran *C. retusa*, *C. pallida* y *C. verrucosa*, la primera nativa de Asia tropical (CABI, 2016; Flora Digital: Península de Yucatán, 2010), y la segunda de África, (Cervantes, 1999). Otras dos especies, *C. cajanifolia* y *C. mucronata* se han localizado en áreas degradadas por la erosión (terrenos infértiles y de malas condiciones para el cultivo) en el estado de Campeche (Alderete-Chávez *et al.*, 2010; Flora Digital: Península de Yucatán, 2010).

### 2.2. Generalidades de dos especies de *Crotalaria*, una especie nativa de México (*C. longirostrata* Hook. & Arn.) y una especie introducida (*C. retusa* L.).

#### 2.2.1. *C. longirostrata*

Características botánicas. Hierbas subfruticosas erectas con tallos de hasta 60.0 cm de altura o más, esparcidamente seríceos; hojas trifolioladas, estípulas de hasta 2.0 mm largo, linear-triangules, persistentes; pecíolos 0.7-2.5 cm largo; folíolos 3.2 cm largo, 0.3 - 1.8 cm ancho, elípticos u obovados, base cuneada, ápice obtuso, mucronado, haz glabro y envés seríceo; inflorescencias terminales, 8-30 flores, eje

6.5 - 14.0 cm largo; brácteas 2.3 - 3.1 mm largo, linear-trianguulares, generalmente persistentes; pedicelos 2.8 - 4.2 mm largo; bractéolas en la mitad del pedicelo y en la base del cáliz, hasta 1.3 mm largo, lineares, generalmente persistentes.

Flores. Con 1.1 - 1.4 cm largo; cáliz 5.0 - 6.0 mm largo, tubo 2.1 - 2.9 mm largo, truncado, lóbulos cortos, triangular-atenuados, seríceos; corola con estandarte 1.2 cm largo, 2.0 cm ancho, ocasionalmente presenta máculas púrpuras, quilla angular, mayor que las alas, rostro torcido, prolongado y recto, margen adaxial no lanoso; ovario corto-estipitado, seríceo, hasta de 1.2 cm largo, geniculado.

Semillas. Hasta 3.2 mm largo, pardas o amarillentas en la madurez, seríceas, estípite 4.0-5.0 mm largo; Número cromosómico  $2n = 32$ . Esta especie es un taxón aislado que forma parte de un grupo que está mejor representado en el Viejo Mundo.

Son plantas vigorosas que emergen de seis a siete días después de la siembra, con altura aproximada de 1.35 a 1.75 m; florecen entre los 80 y 111 días después de la siembra y esta etapa dura de 12 a 21 días. El periodo de formación de la vaina de 93- 128 días después de la siembra y maduran de 14 - 28 días después de su formación. Cada fruto forma de 8 - 12 semillas por vaina, las semillas del Chipilín son dispersadas intencionalmente por los agricultores en los terrenos de cultivo y en barbechos, para su uso alimenticio posterior (Soto-Estrada, 2004).

Taxonomía. La clasificación taxonómica de *C. longirostrata* (Rehm, 1994), se muestra a continuación:

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Embryobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliatae</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia	<i>Faboideae</i>
Tribu	<i>Genisteae</i>
Género	<i>Crotalaria</i>
Especie	<i>longirostrata</i>
Nombre Científico	<i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. & Arn.

Distribución en México. En México se conoce en los estados de Chiapas, Chihuahua, Colima, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Tabasco y Veracruz (Figura 1). Su floración ocurre en los meses de julio y agosto y su fructificación de julio a septiembre (Soto- Estrada, 2004).



**Figura 1.** Distribución de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. en México. Los círculos indican sitios de presencia de esta especie. Imagen tomada de: <https://www.naturalista.mx/taxa/161144-Crotalaria-longirostrata>

Características agronómicas. Se ha observado latencia en sus semillas, dada por la impermeabilidad que presenta la testa, aspecto determinante en el bajo porcentaje de germinación. Para reblandecer la testa y promover la germinación se han aplicado tratamientos de escarificación física (agua caliente) o química (ácido sulfúrico durante 20, 30 y hasta 60 min) (Ayala-Herrada *et al.*, 2010; Alderete-Chávez *et al.*, 2010; Garduza-Acosta *et al.*, 2018). La escarificación mecánica (raspado de la semilla) es el tratamiento pre-germinativo que brinda los mejores resultados (Castillo, 1991), pero no es aplicable a grandes volúmenes de semilla.

La propagación se realiza por semilla, que se recolecta de forma tradicional directamente de la planta en el campo, es pequeña y de color oscuro. La

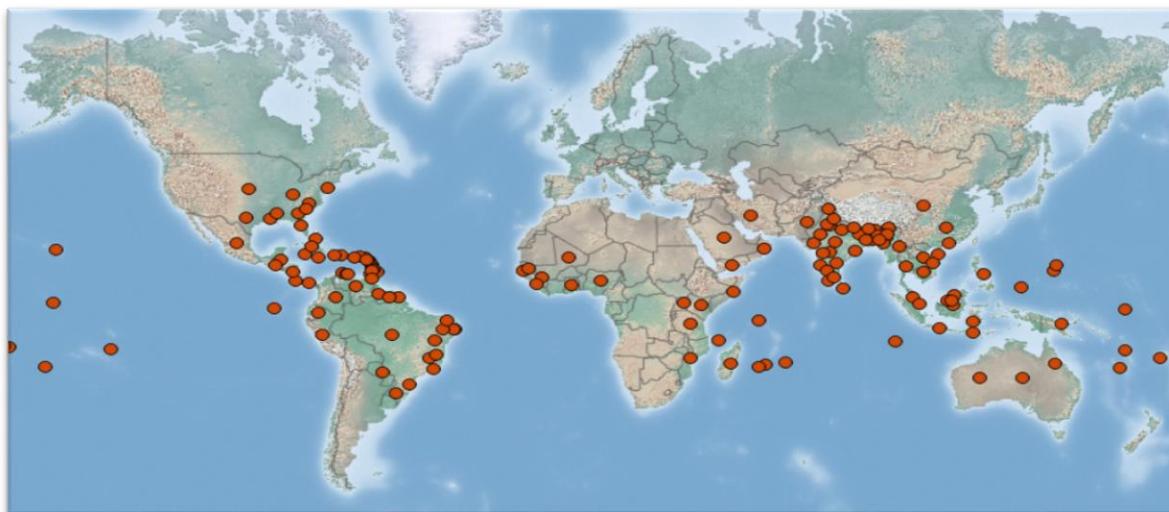
profundidad de siembra de 0.6 cm, es la que brinda los mejores resultados en el porcentaje, emergencia, altura, diámetro, peso fresco y peso seco de plántulas (Castillo, 1991).

Escasos estudios se han realizado sobre el manejo agronómico de Chipilín en diferentes estados fenológicos. Pérez-Cornelio *et al.* (2016), observó que la biomasa total de la planta durante el crecimiento se mantuvo durante los primeros 90 días, y a partir de esta edad inició un crecimiento acelerado que continuó hasta los 150 días. Observó que el punto crítico para la cosecha de hojas es a los 105 días después de siembra. Después de ésta fecha, la proporción de hojas disminuye drásticamente en beneficio del incremento de la de tallos. Alta proporción de hojas en la biomasa total se observaron durante los 60 y 90 días después de la siembra. A los 150 días después de siembra, el tallo constituyó la mayor proporción (62.4%), seguida de la de hojas (24.6%) y con la más baja proporción, la raíz (13.1%).

### **2.2.2. *C. retusa***

Generalidades botánicas. Hierba anual con tallos erectos de hasta 1.30 cm de largo, acanalados, apesados cortos pubescentes; hojas simples, oblanceoladas a espatuladas, de 3-10 o de 1-3.8 cm de superficie superior glabra y punteada, superficie inferior densamente serósica pubescente, ápice redondeado o retuso, mucronato, base cuneada, pecíolos de 2-3 mm de largo, estípulas estrechamente rómbicas-ovadas de hasta 0.5 mm de largo. Inflorescencia de 27 cm de largo, de pocas flores, brácteas estrechamente triangulares, diminutas, deciduas tempranas, cáliz en forma de campana ancha, adpresas cortas pubescentes de 12 a 14 mm de largo; pétalos de color amarillo brillante, el ovado estándar, con garras, hasta 18 mm de largo, con venas rojizas, alas y pétalos de quilla tan largos como el estándar. Vainas de color marrón oscuro a negro en la madurez, 2.5-4.5, 1.1-1.3 cm, oblongas, casi cilíndricas, glabras. 23 semillas aproximadamente por vaina, de color marrón dorado a marrón, vainas negras de 4-4.5 mm de largo (Acevedo-Rodríguez, 1996; Wagner *et al.*, 1999; Acevedo y Strong, 2012).

Distribución. La Figura 2, muestra la distribución a nivel mundial, la cual es considerada nativa de Asia tropical, África y Australia, está ampliamente naturalizada en los trópicos (ILDIS, 2013; USDA-ARS, 2013). Sánchez-Blanco *et al.* (2012), la describe como planta exótica y se reporta como invasora, en México podemos encontrarla en 11 estados incluyendo a Campeche (Alderete-Chávez *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Distribución de *C. retusa* L. a nivel mundial (CABI, 2016).

Taxonomía. La clasificación taxonómica de *C. retusa* se muestra a continuación

Reino	Plantae
Subreino	<i>Embryobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliatae</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia	<i>Faboideae</i>
Tribu	<i>Genisteae</i>
Género	<i>Crotalaria</i>
Especie	<i>retusa</i>
Nombre Científico	<i>Crotalaria retusa</i> L.

### 2.3. La nodulación en las especies de *Crotalaria*

Las deficiencias de nitrógeno son de los factores limitantes más importantes en la producción de alimentos, tienen un efecto importante en el rendimiento de los

cultivos y en la rentabilidad de la agricultura (Skalsky *et al.*, 2008). En las Fabáceas, la fijación biológica del N<sub>2</sub> es el fenómeno que consiste en pasar el nitrógeno de su forma molecular natural relativamente inerte (N<sub>2</sub>) en la atmósfera, a compuestos nitrogenados (amoníaco, nitrato y dióxido de nitrógeno) (Taiz y Zieger, 2002). Este proceso es realizado naturalmente por varias procariotas (bacterias, actinobacterias y ciertos tipos de bacterias anaerobias) (Couto, 2008) y depende de la reducción enzimática del N<sub>2</sub> a través de la enzima nitrogenasa. En nódulos maduros, las proteínas leghemoglobinas (Lb) se detectan al inicio de la fijación de nitrógeno. La Lb es una heme proteína abundante en nódulos de plantas fijadoras de nitrógeno, que se une reversiblemente al oxígeno facilitando su difusión a los bacteroides (Hardisson, 1998).

Los simbioses más comunes encontrados en las raíces de los cultivos de leguminosas son las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Hunt, 1996). Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno *Rhizobium* infectan la raíz de las plantas leguminosas, chícharos (*Pisum sativum* L.), los frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.) y el trébol (*Trifolium pretense* L.), donde forman nódulos y establecen una asociación mutuamente beneficiosa (Hogg, 2005).

Las especies de *Crotalaria* establecen asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, que pertenecen a dos géneros *Bradyrhizobium* and *Methylobacterium* (Doignon-Bourcier *et al.*, 2000; Sy *et al.*, 2001). La infección de las raíces de fabáceas por las bacterias fijadoras de nitrógeno da como resultado la formación de nódulos, donde el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio. La nodulación requiere la reprogramación de las células de la raíz para permitir que el micro simbiote entre al tejido vegetal de manera altamente controlada. Esta reprogramación en *Crotalaria* está asociada con la biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos (PAs), ya que la principal enzima involucrada en dicha biosíntesis, la homoespermidina sintasa es expresada exclusivamente en los nódulos (HSS, EC 2.5.1.45) (Irmer *et al.*, 2015).

## 2.4. Calidad nutricional

La *C. longirostrata*, pertenece al grupo de los quelites y desde el punto de vista nutricional es la especie más estudiada, comúnmente se conoce como Chipilín, chepil o chepile (Castro-Lara *et al.*, 2014), y es considerada una de las 16 especies vegetales más importantes desde el punto de vista nutricional, ya que sus hojas comestibles, presentan un alto contenido en calcio, hierro, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico (Arias *et al.*, 2003). A pesar de ello, en México los estudios sobre la composición química y nutricional de *C. longirostrata* en diferentes ambientes y manejos son escasos. Entre los pocos trabajos de investigación que muestran la composición nutricional de hojas de *C. longirostrata* está el de Jiménez-Aguilar y Grusak (2015). En el Cuadro 1 se muestra el contenido mineral, compuestos fenólicos totales, de flavonoides, vitamina C y actividad antioxidante de hojas de esta especie cosechadas cinco semanas después de siembra en invernadero.

**Cuadro 1.** Rango de composición mineral, y capacidad antioxidante de hojas de tres accesiones de *C. longirostrata*, procedentes de México y Guatemala (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015).

Componente	Rango de variación
Calcio, mg/g MF	0.82-2.18
K, mg/g MF	1.61-2.94
Mg, mg/g MF	0.61-1.00
P, mg/g MF	0.27-0.61
S, µg/g MF	0.15-1.02
Fe, µg/g MF	5.69-13.38
Vitamina C, mg AA/g MF	1.00-2.48
Compuestos fenólicos totales, mg GAE/g MF	2.68-3.38
Flavonoides totales, mg CE/g MF	115.7-178.8
Actividad antioxidante, µmol TE/g MF	52.16-60.47

MF= materia fresca; AA= aminoácidos; GAE= equivalente ácido gálico; CE= catequina equivalente; TE= Trolox equivalente.

El análisis bromatológico de diferentes partes de la planta de Chipilín reportado por Arias *et al.* (2003) indica un contenido de proteína total de 30.6% en biomasa aérea total, 36.3% para hojas con peciolo y 38.3% para hojas, mientras que el contenido de fibra fue de 22.8, 13.1 y 11.8% para tallos con hojas, hojas con peciolo y hojas, respectivamente. La determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca

(IVDMD) fue mayor para los tallos con hojas (41.8%) y menor para las hojas con pecíolo (32.1%), mientras que las hojas presentaron valores intermedios (35.3%). Los contenidos más altos de fibra detergente neutro y celulosa fueron de 33.8 y 21.5% en los tallos con hojas, seguidos por hojas con pecíolo 28.4 y 13.0%, y para las hojas fue de 22.5 y 11.1%, respectivamente. Muestras de Chipilín de diferentes procedencias de Tabasco, presentaron altos contenidos de proteína en hojas, con rango de variación de 31.2 a 37.9%, para fibra entre 24.2 y 38.8%, para grasa de 2.8 a 3.1% y en cenizas de 6.6 a 9.9%. En tallos, los contenidos de proteína fueron menores (10.2 a 13.7%) y los de fibra superiores (61.1 a 73.9%). Las semillas de Chipilín contienen niveles elevados de proteína y de fibra (29.8% y 20.4%, respectivamente). La mayor concentración de azúcares solubles y de taninos condensados se observó en hojas de Chipilín (2100 a 4216 mg g<sup>-1</sup> y 18.4 a 39.8 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente (Juárez- Fuentes *et al.*, 2013).

Por otra parte, la *C. retusa* es una especie de *Crotalaria*, misma que ha sido reportada por Nuhu (1999) quién menciona que esta especie es consumida por el ganado y por la población humana en África. Asimismo, la población general en Zaria y, por extensión, Nigeria parece desconocer la toxicidad potencial de estas plantas. Esto es importante, especialmente porque los estudios han demostrado que cantidades muy pequeñas pueden producir efectos tóxicos a veces mucho después del consumo. Estos efectos tóxicos son asociados a los alcaloides pirrolizidínicos como la monocrotalina y la retrorsina presentes en esta especie (Schoental y Head, 1995). Sin embargo, en medicina y administrados a dosis recomendadas, la monocrotalina y retrorsina han mostrado que aplicados vía piel o inyectadas a ratas y ratones ayudan a la regeneración de los hepatocitos trasplantados al hígado llevando a la repoblación de estas células transplantadas y regenerando el hígado dañado (Shafritz, 2015). En algunas investigaciones sugieren que la hoja de *C. retusa* es una fuente de compuestos fenólicos con importantes propiedades antioxidantes. El extracto del tallo de *C. retusa* es eficaz para inhibir el crecimiento de células cancerosas Jurkat, MCF 7 y PC 3. Sin embargo, su citotoxicidad hacia las células normales (WRL 68) lo convierte en una alternativa quimioterapéutica menos deseable (Anim *et al.*, 2016). Por otro lado, el

alcaloide monocrotalina ha mostrado alta toxicidad para células cancerosas VERO (riñón) y HeLa (cervical) a dosis que no pueden ser explotadas para aplicación terapéutica debido a su alta toxicidad (Srinivas *et al.*, 2014), por lo que moléculas *in silico* se están tratando de diseñar para reducir la toxicidad de este alcaloide sin afectar su actividad biológica.

#### **2.4.1. Alcaloides pirrolizidínicos**

Los alcaloides son bases nitrogenadas orgánicas, comúnmente con un anillo heterocíclico, con características tóxicas y efectos farmacológicos en humanos y animales. Son derivados de los productos originados en el metabolismo secundario, siendo los principales precursores aminoácidos como fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y), triptófano (Trp, W), ornitina (Orn), y lisina (Lys, K). El término de alcaloides pirrolizidínicos (AP) se refiere a un grupo de más de 350 compuestos individuales con presencia restringida en ciertas familias, que contienen un núcleo pirrolizidínicos. La base del sistema es un amino alcohol (necina) que se origina de la ornitina o arginina vía la putrescina, y puede ser esterificado con ácidos necico o alcaloides de óxidos de N (Dreger *et al.*, 2009). Los alcaloides pirrolizidínicos básicos, se acumulan más en las semillas mientras que los óxidos-N de estos alcaloides se concentrarían en las partes verdes de las plantas. Por otra parte, más de 6000 especies de plantas son productoras de AP; sin embargo, son pocas las familias botánicas que en general los producen, ya que estas sustancias se encuentran principalmente en las familias *Boraginaceae* (varios géneros), *Asteraceae* (tribus *Senecioneae* y *Eupatorieae*), *Orchidaceae* (9 géneros) y *Fabaceae* (género *Crotalaria*); sólo es ubicuo género *Senecio*, representa más de 3000 especies distribuidas en todo el globo (Elika, 2013). Los AP, en áreas naturales se encuentran entre las toxinas más ampliamente distribuidos que afectan a la vida silvestre y ganado. Sin embargo, las intoxicaciones agudas causadas por los AP son raros (EFSA, 2007). Están considerados como hepatotoxinas, pneumotoxinas o genotoxinas. A nivel mundial no existe un límite legal para la presencia de los AP en los alimentos para consumo humano y animal. Las posibles rutas de exposición a los AP en los humanos serían la ingestión de plantas y granos que contiene AP,

el consumo de miel contaminada con AP, y la exposición a alimentos de origen animal contaminados (leche y huevos). En algunos países se ha observado que el consumo de té, hierbas medicinales, hojas, condimentos de especies que contienen AP, de lotes de granos contaminados con semillas que los contienen o del consumo de mieles contaminadas con polen de estas especies, aun a dosis bajas, es el origen del síndrome de obstrucción sinusoidal hepática, necrosis hemorrágica y una rápida falla del hígado, especialmente si está presente el alcaloide 1,2-dehidropirrolizidina, de ahí la importancia de conocer el tipo de alcaloide presente y su concentración en los alimentos para tomar iniciativas que reduzcan su nivel (Edgar *et al.*, 2015). En el caso de *Crotalaria* spp., los principales AP son la monocrotalina y la tricodesmina (Elika, 2013). No fue posible encontrar información sobre contenido de alcaloides pirrolizidínicos (AP) en hojas de *C. longirostrata*. En semillas, la evaluación de AP de 41 especies de *Crotalaria* mostró un rango de variación de 0 a 3.85%, con un contenido de sólo 0.37% en las semillas de *C. longirostrata* (Williams y Molyneux, 1987). En contraste se registró un alto contenido de AP en las semillas de *C. spectabilis* Roth # 3 CVTSP (3.85%), *C. retusa* L. (2.69%), *C. alata* Leveille (1.60%), *C. quinquefolia* L. (1.19%) y *C. argyrolobioides* Bak. (1.01%). El uso de semillas de *Crotalaria* con altos contenidos de AP puede provocar la muerte. Las semillas de *C. argyrolobioides* produjeron signos de toxicidad, pero no la muerte, cuando se alimentaron pollos a una dosis de 10 mg g<sup>-1</sup> peso vivo, mientras que las semillas de las otras especies fueron 100% letales cuando los pollos se alimentaron con dosis de 2 a 6 mg g<sup>-1</sup> de peso vivo. Las semillas de las otras especies como *C. longirostrata* que presentaron menos de 0.6% de AP no fueron tóxicas para los pollos en dosis de 10 mg g<sup>-1</sup> de peso vivo.

## **2.5. Usos de *C. longirostrata* (Chipilín) y *C. retusa* (Ala de pico)**

### **a. Uso en alimentación**

Se consumen las hojas y los brotes tiernos en diferentes formas tanto de Chipilín como de Ala de pico (Bautista-Cruz *et al.*, 2011; Castro-Lara *et al.*, 2014). La hoja de Chipilín es rica en proteína con un rango que va de 23.1 a 38.3%, dependiendo de las condiciones ambientales, del sitio de recolecta y estado de madurez de la

planta (Arias *et al.*, 2003; Juárez-Fuentes *et al.*, 2013; Pérez-Cornelio, 2016). Presenta también alto contenido en lisina, por esta razón es un excelente complemento de los cereales. Además, posee un elevado contenido de carotenos con alta biodisponibilidad (Cobon, 1988). Por sus características, las hojas de chipilín se usan en la elaboración de tamales (Fernández *et al.*, 2013), también se puede utilizar un 5% de Chipilín en forma deshidratada, para fabricar galletas nutritivas (Palacios *et al.*, 2017). En un uso reciente Chulim *et al.* (2018) utilizaron la hoja procesada como sustituto de harina en el pan vegano.

### **b. Uso medicinal**

El Chipilín ha sido reportado con propiedades para la cura de diversos padecimientos, entre los que podemos mencionar: **Anemia:** para la cura de este caso, se cuece la hierba mora con Chipilín, se le agregan dos gotas de limón y se consume. **Alcoholismo:** se usa para curar este mal, se cuece la raíz y se bebe la cuarta parte de la copa una vez al día, no debe beberse más porque puede causar envenenamiento. **Insomnio:** se cuecen las hojas de Chipilín y se consume como té ya que las infusiones de Chipilín tienen efecto positivo para controlar el insomnio y alarga el tiempo del sueño. En dosis moderadas tiene efecto sedativo y sinóptico sin llegar a la toxicidad (Cobon, 1988).

Estas propiedades han sido demostradas en estudios que indican que los extractos acuosos de hojas frescas y extractos etanólicos de hojas secas, en dosis de 100 a 500 mg kg<sup>-1</sup> de peso en ratas albinas, inducen al sueño sin causar toxicidad; siendo el responsable de ello un complejo de principios activos compuesto por alcaloides, polifenoles y taninos (Mejía, 1989; Morton, 1994). Otras especies de *Crotalaria*, entre ellas Ala de pico, se utilizan en Nigeria (Nwude e Ibrahim, 1980; Nwude e Ebong, 1980) y, de hecho, en todo el mundo en la práctica médica tradicional y como alimento. Su toxicidad y efectos hepáticos en humanos y ganado también están bien documentados en otros lugares, aunque esto no ha sido bien reconocido por la población que utiliza las plantas. La comprensión de los usos etnomedicinales de diferentes especies y sus efectos en salud es importante ya que la medicina tradicional en África cubre más del 70% de las necesidades medicinales de las

personas (Sofowora, 1993). Los diferentes usos de esta especie se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Usos en medicina tradicional de *Crotalaria retusa* en diferentes partes del mundo (Nuhu, 1999).

Motivo de ingestión (problema de salud)	Forma de utilización	País donde se utiliza
Sarna	Planta entera, decocción (baño).	África India
Enfermedad venérea	Plantas enteras más potasa, hervidas para beber.	India E. África
Cólicos estomacales y flatulencias	Asado de alcaravea negra, mezclado con planta de <i>C. retusa</i> en polvo, tomado en pequeñas cantidades	India Ghana Afganistán Ecuador
Pérdida de la menstruación	Flor aplastada y potasa agregada, cocida en sopa (bebida)	Nigeria Zaria
Muy buscados en materia de amor, aceptación, etc.	Los versos del Corán escritos y lavados se combinan con el polvo de cualquier especie de <i>Crotalaria</i> .	Jamaica Tanzania India
Para alejar a las serpientes	Las semillas se esparcen en llamas para producir humo.	W. india Sri Lanka

### c) Abono verde, forraje y fibra

*Crotalaria longirostrata* es rica en fibras por lo que puede ser utilizada para la elaboración de papel, y su follaje utilizado como forraje (Rodríguez *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2003). *C. retusa* se planta con frecuencia en sistemas agroforestales para ser utilizado en la producción de fibra, forraje y abono verde, como cubierta de tierra y mejorar las condiciones del suelo (CABI, 2016).

## 2.6. Estrategias de manejo agronómico para incrementar biomasa foliar y calidad

### 2.6.1. Cortes sucesivos al follaje y frecuencia de corte

Diversos estudios en leguminosas indican que una forma de incrementar el rendimiento de biomasa aérea es aplicando cortes sucesivos al follaje para promover el rebrote al eliminar la dominancia apical (Hernández *et al.*, 1992; Salemaa y Sievänen, 2002; Dun *et al.*, 2006). Al respecto, en estudios de

crecimiento foliar en gramíneas y leguminosas se ha observado que los cortes sucesivos del follaje influyen en el rendimiento de la biomasa aérea, el cual disminuye conforme avanza la edad del rebrote (Hernández *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 2002; Kabi y Bareeba, 2007). Otro aspecto importante es la velocidad del rebrote entre defoliaciones o cortes sucesivos, para entender el efecto de la frecuencia e intensidad de cosecha en el rendimiento de la biomasa aérea (Pérez *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 1992). En alfalfa, la leguminosa más expandida en zonas templadas para la alimentación animal, la frecuencia de corte se define estacionalmente, con base en la velocidad de crecimiento de la planta, para lograr los máximos rendimientos anuales de forraje y mantener su persistencia (Villegas *et al.*, 2006). En otras especies de *Crotalaria*, como *Crotalaria juncea*, se ha estudiado la respuesta a un solo corte por encima del nodo 4 o 10 a las 6, 8 o 10 semanas después de la siembra bajo longitudes de onda cortas (inductivas) o largas, sobre el crecimiento, floración y producción de forraje (Kessler y Shelton, 2008). Los efectos deletéreos iniciales del corte en los órganos de la planta afectan en el siguiente orden: nódulos > raíces > brotes. Un fotoperiodo de 11.4 h, retrasó la floración e incrementó la proporción de hojas de 21.0 a 32.4%. El follaje obtenido del corte a las seis semanas presentó un alto contenido de nitrógeno de la hoja (3.5-5.3%) en comparación con el tallo (0.6-1.7%), lo que proporcionó una producción de forraje de buena calidad.

### **2.6.2. Fertilización**

La cantidad de nitrógeno necesaria para un crecimiento óptimo de los cultivos se puede satisfacer con fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico (Näsholm *et al.*, 2009). En la familia *Fabaceae*, a través de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico al suelo, se reduce el nitrógeno a amonio. La eficiencia de fijación biológica de nitrógeno se ve afectada por la aplicación de grandes cantidades de fertilizante nitrogenado al suelo (Trabulsi y Abed, 1986), ya que reduce la nodulación y la actividad de la nitrogenasa (Heggo y Barakah, 2004). Según Zhu *et al.* (1996), la aplicación de nitrógeno en dosis de 100 kg ha<sup>-1</sup> a las especies de leguminosas puede afectar negativamente la formación de nódulos radiculares, el tamaño y el

peso de los nódulos. Trabulsi y Abed (1986) encontraron que la aplicación de 120 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno aplicado al suelo suprimió sustancialmente la nodulación de las raíces de alfalfa y soya. Camarillo (2014) indica que, para mantener una producción de hojas de Chipilín de calidad con fines comerciales, la aportación de nitrógeno al suelo vía la fijación biológica realizada por los nódulos no es suficiente, por lo que se requiere adicionar nitrógeno mineral superior a 80 kg de N ha<sup>-1</sup>. Al contrario, el nivel de fósforo y azufre en el suelo favorece la nodulación, actuando en forma directa sobre la fijación biológica de nitrógeno o bien, indirectamente, a través del estado general de la planta (Pietrarelli *et al.*, 2008).

En el caso de las especies de *Crotalaria*, se ha observado que una forma de reducir la concentración de alcaloides pirrolizidínicos (AP) es aplicando nitrógeno a la planta, lo que conlleva la inhibición de la nodulación. Los AP en *Crotalaria spectabilis* son detectables solo cuando las plantas forman nódulos después de la infección de *Rhizobium*. Estos compuestos son parte de los mecanismos de defensa de la planta contra los herbívoros (Irmer *et al.*, 2015). Por lo que al inhibir la nodulación se podría inhibir la síntesis de AP, aunque como ya se mencionó anteriormente la inhibición de la nodulación puede afectar el crecimiento de la planta también.

### **2.6.3. Densidad de plantas**

El incremento en el área foliar en el tiempo depende de la densidad de plantas, del número de tallos por planta, del desarrollo del tallo y de la expansión individual de cada hoja. La densidad de plantas presentes afecta la disponibilidad de luz. Al incrementarse la densidad de plantas, puede haber sombreo entre las mismas afectando la entrada de luz al dosel, lo que afectaría la morfogénesis y expansión del área foliar. El desarrollo de ramas y el número de brotes por planta son los componentes del área foliar más afectados por la disponibilidad de luz. En alfalfa, la competencia lumínica severa afecta el desarrollo del eje primario y la demografía de las plantas de alfalfa bajo alta competición (Baldissera *et al.*, 2014), lo que afecta el rendimiento de biomasa foliar.

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Material biológico

Durante los meses de febrero y abril del 2017 se recolectaron vainas secas de dos especies de *Crotalaria*: una especie comestible conocida como Chipilín (*C. longirostrata*) del Banco de especies forrajeras del INIFAP, Tabasco (Figura 3), y una especie exótica conocida como Ala de pico (*C. retusa* L.) localizada sobre la carretera Costera del Golfo/Cd. del Carmen /Villahermosa - Frontera/México 180 E con coordenadas 18°18'18.3"N y 92°48'03.9"W, la cual presenta un alto contenido de alcaloides pirrolizidínicos de acuerdo a reportes de la literatura (Jaca *et al.*,2013) (Figura 4).

Las vainas recolectadas fueron contadas. En grupos de 100 vainas por triplicado, fueron pesados y separados en sus componentes (vainas y semillas). Cada componente fue pesado y las semillas contadas.

El material recolectado de cada procedencia fue etiquetado con el nombre del sitio, fecha, coordenadas geográficas y características del sitio de colecta, y guardadas en bolsas de papel estraza a temperatura ambiente en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco.



**Figura 3.** Planta en floración de *C. longirostrata* procedentes del Banco de especies forrajeras INIFAP, Huimanguillo, Tabasco (a). Vainas y semillas de *C. longirostrata* extraídas en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del recinto Campus Tabasco (b).



**Figura 4.** Planta en floración de *C. retusa* L. (a). Vainas y semillas de *C. retusa*. Laboratorio de Fisiología Vegetal del recinto Campus Tabasco (b).

### 3.1.1. Sitio experimental

El experimento se realizó en condiciones de invernadero, en el área de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco; del 14 de mayo al 04 de diciembre de 2018.

### 3.1.2. Diseño experimental y tratamientos

Para generar los tratamientos se utilizó un diseño factorial 3x2x3 (Tres dosis de fertilizantes: 0-0-0, 100-0-0, 0-60-0 kg ha<sup>-1</sup> de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O, respectivamente; dos especies de *Crotalaria*: *C. longirostrata* y *C. retusa*; y tres cortes, uno cada 30 días), lo cual generó 18 tratamientos que se establecieron en el invernadero en un arreglo completamente al azar con seis repeticiones.

Para la siembra, las semillas de ambas especies de *Crotalaria* fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min y pre-tratadas para liberarlas de la latencia. De cada especie, el 14 de mayo 2018, se sembraron 3 semillas en bolsas de vivero con capacidad de 5 kg con una mezcla de sustrato en la proporción de suelo: vermiculita (75:25), con seis repeticiones por especie. De cada maceta solo se dejaban dos plantas. Cada maceta fue considerada como unidad experimental. El riego se realizó manual, para mantener la hidratación adecuada del suelo. El sustrato fue analizado para conocer los contenidos iniciales de NPK, y el pH, de acuerdo a las NOM-021-RECANAT-2000, 2002. Los tratamientos de fertilización se aplicaron un mes después de la siembra.

### 3.1.3. Manejo del experimento

Durante el desarrollo del cultivo se aplicó el riego manual, para mantener la humedad adecuada del sustrato. Cada semana se rotaron las unidades experimentales (bolsas de vivero) para evitar el efecto de sombreo en el invernadero. Se llevó un registro de la presencia de plagas y enfermedades.

### 3.1.4. Variables de estudio

En cada tratamiento, a los dos meses después de la siembra se realizó un corte de uniformidad a la altura del tercer nudo. Las variables de estudio se presentan a continuación:

## 3.2. Biomasa, área foliar y nódulos

Después del corte de uniformidad, en cada tratamiento los muestreos fueron cada 30 días, realizando tres cortes sucesivos. En cada corte, se pesó la biomasa total por repetición y se separaron en sus componentes; hojas, tallos y raíz. Se midió el área foliar con el integrador de área foliar marca LI-3100. Los nódulos se separaron de las raíces y se contaron. Se verificó su actividad a través del análisis del color interno de los mismos. Todos los componentes por separado, con excepción de los nódulos, fueron secados a 50°C por 48 h, en una estufa de aire forzado. Las muestras se trituraron en un molino tipo Willey para obtener una partícula de 2 mm aproximadamente para los análisis correspondientes. Otra porción fue utilizada para obtener el porcentaje de humedad de la materia seca. La tasa relativa de crecimiento (TRC) de los rebrotes que indica la acumulación de biomasa por día, fue calculada mensualmente a partir de los datos de biomasa de cada componente con la fórmula siguiente:

$$TRC = \frac{\ln P^2 - \ln P^1}{t^2 - t^1} = g \text{ g}^{-1} \text{ día}^{-1}$$

P= peso seco aéreo (biomasa) de la planta en cualquier intervalo de tiempo.

t= tiempo.

### 3.3. Materia seca y humedad

Para determinar el contenido de materia seca (MS) de los diferentes órganos de las plantas de *Crotalaria*, se utilizó la metodología de la AOAC (2005). Se tomaron al azar cuatro plantas completas (2 bolsas de vivero) por fecha de muestreo (22 de agosto, 29 octubre y 4 de diciembre del 2018) y se separaron en sus componentes: hojas, tallos y raíz. Se registró el peso en fresco de cada uno de los componentes anteriormente mencionados; se colocaron por separado en bolsas de papel etiquetadas y se secaron en la estufa de aire forzado a 60°C por 72 h. Se registró el peso seco de cada muestra y por diferencia de peso entre la muestra húmeda y seca se obtuvo el porcentaje de humedad y el contenido de MS, de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso de muestra húmeda} - \text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso de muestra húmeda}} \times 100$$

$$\% \text{ Materia seca} = 100 - \% \text{ Humedad}$$

### 3.4. Determinación de la concentración de clorofila

Para determinar la concentración de clorofila se tomaron, en hojas maduras diferentes, tres discos foliares de 1 cm<sup>2</sup> por cada tratamiento y repetición al momento de la cosecha de cada corte. Los discos foliares se colocaron en tubos de ensaye con 5 mL de N, N- Dimetilformamida. Estos se mantuvieron en oscuridad durante 24 h. Al término de 24 h, se midieron las absorbancias a 470, 647 y 664 nm en un espectrofotómetro uV-VIS marca Thermo Scientific modelo *Multiskan Go*. La concentración de clorofila a, b, total y de carotenoides se calculó de acuerdo a Moran (1982) y Wellburn (1994).

### 3.5. Índice diferencial de vegetación normalizado (NDVI)

Con el Sensor portátil GreenSeeker™ se determinó la medición del índice diferencial de vegetación normalizado (NDVI) o índice de reflectancia (NDVI por sus siglas en inglés). Este índice indica la fracción de la energía incidente reflejada por la hoja y se calcula a partir de las mediciones de esta reflectancia en el rango de luz roja e infrarrojo cercano del espectro. El NDVI ha sido correlacionado con

numerosas variables como las relacionadas con las deficiencias de N, el estrés hídrico y el rendimiento, sin embargo, este índice es más bien una medida del crecimiento integral de ahí que la mejor correlación observada es con la acumulación de biomasa. La variabilidad de éste índice no está relacionada con una sola característica de la planta o del suelo, por lo cual es necesario tener una idea del factor limitante de crecimiento del cultivo (Verhulst *et al.*, 2010).

Para medir el NDVI en el experimento, se tomaron 10 lecturas al azar a una altura de 60 cm del dosel de la planta por tratamiento antes de cada corte, manteniendo el sensor en posición horizontal (Figura 5).



**Figura 5.** Vista del GreenSeekerTM y de la toma de la lectura en el experimento

### **3.6. Proteína cruda (PC)**

EL contenido de proteína cruda en hojas y tallos se calculó a partir de la concentración de nitrógeno total multiplicándolo por el factor 6.25 de acuerdo con la metodología establecida por la AOAC (2005). El nitrógeno total se cuantificó mediante el método de semi-micro-Kjeldahl. Se pesó por triplicado 0.1 g de material molido de cada especie, incluyendo una muestra estándar de concentración conocida de Nitrógeno total como referencia. Estos fueron colocados en tubos de ensaye donde se adicionó 3 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y 1 g de mezcla catalizadora compuesta de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y sulfato de cobre ( $Cu_2SO_4$ ). Todo se homogenizó en vortex. Posteriormente se procedió a la digestión de las

muestras en block digestor Tecator, alcanzando una temperatura de 360°C, por cuatro horas de digestión, hasta que las muestras en ebullición se tornaron de color verde-azulado, cristalino y claro. Las muestras digeridas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se destilaron en un equipo Labconco, modelo 200830 USA, agregándoles 10 mL de hidróxido de sodio 10 N. El destilado se recuperó en matraces que contenían 6 mL de ácido bórico al 4% con indicador, los que fueron titulados con ácido clorhídrico 0.1 N valorado, formando por cada equivalente de boro-amoniaco, un equivalente de sulfato-amoniaco (sulfato de amonio), en donde un mL de ácido clorhídrico neutraliza 0.014 g de nitrógeno en forma de ion amonio. Los cálculos para determinar el porcentaje de nitrógeno total fueron:

$$\% Nt = \frac{(G \text{ HCl} - G \text{ HCl blanco})(N \text{ HCl})(1.4)}{\text{Peso de la muestra}} \times 6.25$$

Donde:

Nt = Nitrógeno total

G HCl= Gasto ácido clorhídrico

G HCl blanco= Gasto ácido clorhídrico blanco

N HCl= Normalidad del ácido clorhídrico

1.4= Factor de ajuste para Nitrógeno (0.014 miliequivalentes multiplicado por 100).

### 3.7. Determinación de cenizas

Se determinaron las cenizas según la AOAC (2005). Se pesaron de 0.5 a 1 g de muestra en crisoles previamente tarados y se sometieron a calcinación a 550°C durante 5 h en una mufla TSW modelo "J". Después de este tiempo se colocaron en un desecador enfriándose hasta temperatura ambiente y se pesaron. Para determinar la cantidad de cenizas presentes en la muestra se utilizó la fórmula:

$$\text{Peso}^1 = (\text{Peso crisol} + \text{muestra}) - (\text{Peso crisol} + \text{cenizas}) \times 100$$

$$\% \text{ Cenizas} = 100 - \text{Peso}^1$$

### **3.8. Determinación de grasa**

El contenido de grasa se determinó mediante la técnica descrita por la AOAC (2005). Se pesaron por duplicado de 1.5 g de muestra de cada especie y se colocaron en un papel filtro dentro de un dedal donde se fijaron en los porta-dedales del equipo de extracción marca Goldfish modelo TE-044-8/50 Brasil. Se agregaron 80 mL de éter de petróleo a los matraces del equipo (mismos que previamente se secaron a 65°C a peso constante y se registró el peso de cada uno). Estos se fijaron al condensador y se extrajeron por reflujo en un periodo de 4 h a temperatura constante de 125°C. Finalizando el tiempo de extracción, los matraces se colocaron en una estufa a 65°C durante 30 minutos para liberar residuos de éter de petróleo.

Después de este tiempo se colocaron en un desecador donde se enfriaron a temperatura ambiente y se pesaron nuevamente. Se calculó el porcentaje de extracto en base seca utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ EE (Base seca)} = \frac{\text{Peso de matraz con residuo} - \text{Peso de matraz vacío}}{\text{Peso de muestra (g)}} \times 100$$

### **3.9. Determinación de azúcares solubles totales**

Los azúcares solubles totales se determinaron por el método de Antrona (Yemm y Wills, 1954), usando glucosa como estándar. Para la extracción se utilizaron los residuos sin grasa obtenidos de la determinación de grasa. De estos se pesaron 200 mg de muestra previamente desengrasada y seca, por cada corte y por tratamiento, en tubos de ensaye de 20 mL. A cada muestra se le agregaron 3 mL de etanol absoluto y se colocaron en baño María a 70°C por 5 min. Al término, el sobrante (extracto) se recuperó en un matraz Erlenmeyer de 25 mL. Este proceso se repitió cuatro veces más.

El residuo fue secado a temperatura ambiente, el extracto fue conservado a 4°C para la determinación de almidón. El extracto obtenido fue secado en una plancha de calentamiento a 50°C bajo campana de extracción hasta su evaporación total; entonces fue resuspendido en 1 mL de agua destilada. Y se conservó a 4°C hasta su uso. Para la cuantificación de azúcares totales, se tomarán 300 µL de cada

solución estándar y 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra, se le agregarán 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 3 mL de Antrona (200 mg de Antrona en 5 mL de etanol al 80% y 95 mL de ácido sulfúrico al 70 %). Se mezclaron en vortex y se enfriaron en baño de hielo durante 5 min. Posteriormente se incubaron a 100°C en baño María durante 10 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para medir la absorbancia.

A 625 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan Go), previamente las muestras fueron diluidas a 1:20. La solución stock de glucosa fue preparada a una concentración de 2.5 mg mL<sup>-1</sup>, a partir de esta se preparó una curva de calibración con concentraciones de glucosa de 0, 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **3.10. Determinación de polifenoles totales, PFT**

La determinación del contenido de polifenoles totales en las muestras se llevó a cabo mediante el método descrito por Makkar (2003). Para su extracción se utilizaron los residuos sin grasa obtenidos de la determinación de grasa, se pesaron por duplicado 250 mg, en tubos eppendorf de 1.5 mL. La extracción se realizó por agitación (1 min. en vortex) con 1 mL de metanol al 80% (CH<sub>3</sub>OH), y después colocadas en baño María a 50°C por 15 min. Al término la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min en una microcentrifuga Thermo Fischer Scientific, modelo 11210800. El sobrenadante se recuperó en otro tubo eppendorf, el residuo se lavó nuevamente, se agregaron 0.5 mL de metanol al 100%, se mezcló y centrifugó. Ambos sobrenadantes se recuperaron y el volumen final se ajustó a 1.5 mL con agua destilada. Todo se almacenó a 4°C protegido de la luz. Para la cuantificación, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido, agregando 1.5 mL de agua destilada, 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Denis al 50% y 200  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio anhidro al 15% (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

Los contenidos se mezclaron en vortex y se incubaron por 30 min en la oscuridad. La curva de calibración se preparó a partir de una solución stock de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido gálico (3, 4, 5- Trihidroxibenzoic acid, SIGMA-ALDRICH® St. Luis, MO USA), de la cual se realizaron soluciones estándar de 0 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Cuadro 3).

La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrómetro uV-VIS (Multiskan Go model 51119300; Thermo Fischer Scientific, FI-011621 Vantaa, Finland).

**Cuadro 3.** Concentración de ácido gálico para la curva de calibración usada en la cuantificación de Polifenoles Totales

No.	$\mu\text{L}$ tomados Stock de ácido gálico 100, $\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{L}$ de agua destilada	Concentración de ácido gálico, $\mu\text{g mL}^{-1}$
Blanco	0	200	0
1	40	160	20
2	80	120	40
3	120	80	60
4	160	40	80
5	200	0	100

### 3.11. Determinación de fibra dietética total, FDT

Para la cuantificación de FDT se siguió el método descrito por la AOAC (1995) y Sotelo *et al.* (2008), utilizando el kit para fibra dietética total de SIGMA® (TDF-100A Kit). 0.3 g de cada muestra desengrasada con hexano se colocaron, por duplicado, en tubos de centrifuga con tapa. A cada tubo se le adicionaron 15 mL de buffer de fosfato 0.08 M ajustado a pH  $6.0 \pm 0.2$  con NaOH 0.275 N o HCL 0.325 N, enseguida se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa termoestable, y las muestras se incubaron a  $95^\circ\text{C}$  por 35 min, posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente. Nuevamente, el pH de cada muestra se ajustó a  $7.5 \pm 0.2$  con NaOH 0.275 N, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de proteasa ( $25 \text{ mg mL}^{-1}$  en buffer de fosfato pH 6.0) y se incubaron a  $60^\circ\text{C}$  por 35 min en agitación constante.

Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, ajustando el pH a  $4.5 \pm 0.1$  con HCl 0.325 N, se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de amiloglucosidasa y se incubaron por 35 min a  $60^\circ\text{C}$  con agitación constante. A cada muestra se agregaron 73 mL de etanol al 95 % y se dejaron reposar toda la noche a temperatura ambiente. Al término, la solución se filtró al vacío en crisol Gooch con cama de celita previamente pesada ( $P_1$ ) usando tres porciones de 6 mL de etanol al 78%. Este último paso se modificó debido a la falta de crisoles Gooch, por lo que cada muestra se filtró en papel filtro Whatman No. 40 diámetro 110 mm previamente pesados ( $P_1$ ), enseguida, el residuo

se lavó con dos porciones de 3 mL de etanol al 95%, y dos porciones de 3 mL de acetona. Al término el papel filtro con el residuo se dejó secar en estufa de aire forzado a 70°C por 12 h. Al enfriarse, se pesó el papel filtro con el residuo ( $P_2$ ) y se procedió a pulverizar el residuo y tomar 0.1 g por duplicado para la determinación de proteína por método de Kjeldahl, y el resto se colocó en un crisol para determinar cenizas a 450°C durante 5 h, posteriormente se enfrió hasta peso constante ( $P_3$ ). Todas las pesadas se realizaron en balanza analítica marca ADAM® Modelo PW 254.

El total de la fibra dietética fue el peso del residuo menos el peso de las proteínas, cenizas y el blanco.

$$\% \text{ FDT} = ((\text{muestra R} - \text{muestra P} - \text{muestra C} - \text{B}) / \text{PSM}) * 100$$

Peso del residuo =  $P_2 - P_1$

Peso de la ceniza =  $P_3 - P_1$

B = R blanco - P blanco - C blanco

Donde:

FDT = fibra dietética total

R = peso promedio de los residuos corresponden a la definición  $P_2 - P_1$  (mg)

P = peso promedio de proteína (mg)

C = peso promedio de la ceniza (mg) o ( $P_3 - P_1$ )

B = peso promedio del blanco

PSM = peso seco de la muestra inicial (mg).

### **3.2. Análisis estadístico**

Los datos fueron registrados en Excel® y analizados usando PROC MIXED de SAS (SAS, 2010), para medidas repetidas. El modelo incluyó para cada variable de respuesta, materia seca, área foliar, pigmentos fotosintéticos, NDVI y composición

química, los efectos de la especie, fertilización, corte y sus interacciones. El corte fue el factor de medida repetida. Las interacciones se analizaron utilizando la opción SLICE del PROC MIXED (SAS, 2010). El modelo fue:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + F_j + C_k + (S \cdot F)_{ij} + (S \cdot C)_{ik} + (F \cdot C)_{jk} + (S \cdot F \cdot C)_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde  $Y_{ijk}$  = Es la variable de respuesta de la  $l$ -ésima unidad experimental del nivel  $i$  del factor A, del nivel  $j$  del factor B y del nivel  $k$  del factor C,  $\mu$  es la media general,  $S_i$  es el efecto del nivel  $i$ -ésimo del factor especie (factor A),  $F_j$  es el efecto del nivel  $j$ -ésimo del factor fertilización (factor B),  $C_k$  es el efecto del nivel  $k$ -ésimo del factor corte (factor C), y  $E_{ijkl}$  el error experimental.

El esquema de aleatorización de los tratamientos sobre las unidades experimentales fue mediante un diseño completamente al azar en arreglo factorial  $2 \times 3 \times 3$  con seis repeticiones, donde los factores fueron dos especies de *Crotalaria*, tres dosis de fertilización (control, N y P) y tres cortes. Cuando los efectos fueron significativos se realizó la prueba de comparación múltiple de medias, de acuerdo con los criterios de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ÁREA FOLIAR DE *C. longirostrata* y *C. retusa* EN RESPUESTA A CORTES SUCESIVOS Y FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y FOSFATADA

#### 4.1.1. Altura de tallo principal, longitud y diámetro de rebrotes

Como resultado de los muestreos realizados al follaje en *C. longirostrata* y *C. retusa*, se observan diferencias significativas entre especies para la altura del tallo principal y el número de rebrotes por planta (Cuadro 4). La altura del tallo principal fue mayor en *C. longirostrata* (35.2 cm) que en *C. retusa* (32.8 cm) durante todo el periodo de evaluación. El efecto de corte y de la interacción especie\*corte fueron significativas para la altura del tallo principal, número, longitud y diámetro de rebrotes.

La triple interacción solo fue significativa para el número de rebrotes por planta. El efecto de fertilización fue no significativo, excepto para el diámetro de tallos de los rebrotes. Los tratamientos sin fertilización y fertilización fosfatada presentaron el mayor diámetro (1.77 y 1.65 mm, respectivamente). En contraste, el tratamiento nitrogenado presentó el menor diámetro (1.52 mm) (Figura 6). Aunque la longitud y el diámetro de los rebrotes disminuyeron por efecto del corte en ambas especies (Cuadro 5), los tratamientos de fertilización no fueron significativos. En *C. retusa* la longitud del rebrote disminuyó solo a partir del tercer corte.

**Cuadro 4.** Cuadrados medios del ANOVA para la altura de planta, longitud, diámetro y número de rebrotes por planta en dos especies de *Crotalaria* en estudio.

Factor de variación	gL	Altura tallo principal, cm	Número de rebrotes planta <sup>-1</sup>	Longitud de rebrotes planta <sup>-1</sup> , cm	Diámetro de rebrotes planta <sup>-1</sup> , mm
Especie (E)	1	77.03**	29.98***	11.89NS	0.06NS
Corte (C)	2	131.15***	39.79***	821.94***	5.06***
Fertilización (F)	2	8.45NS	0.86NS	7.14NS	0.27**
E*C	2	34.03**	17.92***	324.83***	0.59***
E*F	2	1.31NS	0.62NS	1.06NS	0.04NS
C*F	4	2.69NS	0.74NS	5.97NS	0.05NS
E*C*F	4	1.07NS	3.46*	25.32NS	0.04NS
Error	36	4.55	1.14	7.59	0.03

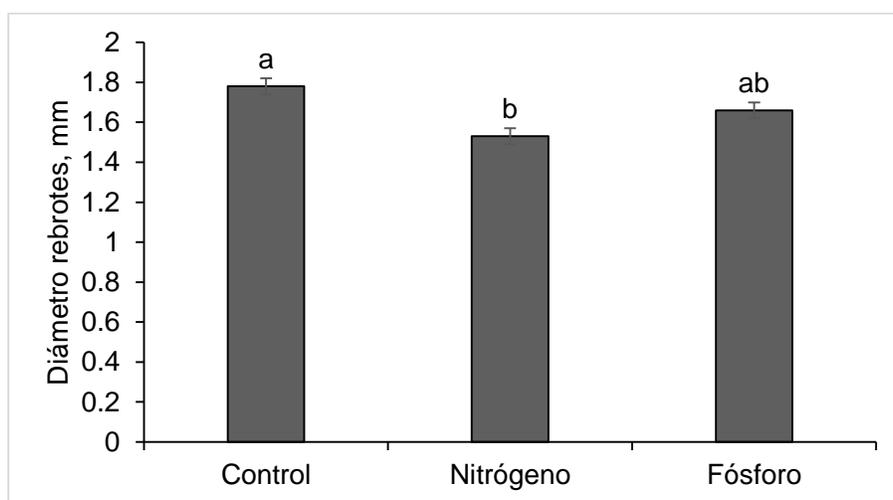
gL= grados de libertad, \*= $P<0.05$ , \*\*= $P<0.01$ , \*\*\*= $P<0.001$ , NS= No significativo

**Cuadro 5.** Medias para altura del tallo principal, número, longitud y diámetro de rebrotes en *C. longirostrata* y *C. retusa*.

Especie	Corte	Altura tallo principal, cm	Núm. de rebrotes planta <sup>-1</sup>	Longitud rebrote, cm	Diámetro rebrote, mm
<i>C. longirostrata</i>	1	39.85 a	2.72 c	29.70 a	2.27 a
	2	33.78 b	4.34 b	15.61 b	1.51 b
	3	32.11 b	7.55 a	13.42 b	1.28 c
<i>C. retusa</i>	1	34.35 a	2.69 c	23.19 a	2.06 a
	2	32.43 b	3.66 bc	25.81 a	1.85 b
	3	31.80 b	3.79 bc	12.55 b	0.94 c

†Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

El número de rebrotes por planta se incrementó solo en *C. longirostrata* por efecto del corte (Cuadro 5). Esta especie presentó el mayor número de rebrotes por planta, con 7.55 en el tercer corte. *C. retusa* mantuvo constante el número de rebrotes durante todo el periodo de evaluación (2.69 a 3.79), indicando una baja respuesta al corte.



**Figura 6.** Diámetro promedio de rebrotes después de la aplicación de los cortes sucesivos al follaje de *C. longirostrata* y *C. retusa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el error estándar.

La capacidad para emitir rebrotes de *C. longirostrata* después de la aplicación del corte a los tallos en crecimiento, parece ser el resultado de la interrupción de la dominancia apical, lo que estimula el crecimiento de los meristemos laterales del tallo, forzando a la planta a completar su ciclo de vida generando múltiples rebrotes para la producción de semillas tal como lo reportan Dun *et al.* (2006).

En esta especie al forzar la planta a desarrollar los meristemos laterales a través de cortes sucesivos parece representar un costo alto, por lo que la planta debe modular el crecimiento y tamaño de las estructuras vegetativas en crecimiento, como fue el caso, donde se redujo el diámetro de los rebrotes.

#### 4.1.2. Producción de biomasa y área foliar

El análisis de varianza mostró el efecto significativo de la especie y de la interacción especie\*corte para todas las variables de biomasa, base seca, incluyendo el área foliar (Cuadro 6). El efecto ´significativo de la interacción indica que el corte afectó de manera diferencial a la biomasa de cada especie.

**Cuadro 6.** Cuadrado medio del análisis de varianza para la biomasa de rebrotes planta<sup>-1</sup> y el área foliar en las especies de *Crotalaria* en estudio.

Factor de variación	gL	MS total de rebrotes planta <sup>-1</sup>	MS foliar de rebrotes planta <sup>-1</sup>	MS tallos de rebrotes planta <sup>-1</sup>	Área foliar de rebrotes planta <sup>-1</sup> , cm <sup>2</sup>
		g			
Especie (E)	1	0.08*	0.04**	6.5 <sup>-03</sup> *	78478***
Corte (C)	2	0.01NS	4.5 <sup>-03</sup> NS	2.2 <sup>-04</sup> NS	9499NS
Fertilización (F)	2	0.01 NS	5.0 <sup>-03</sup> NS	1.8 <sup>-03</sup> NS	30.7NS
E*C	2	0.035***	0.16***	0.04***	349**
C*F	4	0.01NS	3.5 <sup>-03</sup> NS	1.6 <sup>-03</sup> NS	3124NS
E*F	2	0.01NS	4.4 <sup>-03</sup> NS	1.8 <sup>-03</sup> NS	2180NS
E*C*F	4	0.01NS	6.8 <sup>-03</sup> NS	3.1 <sup>-03</sup> NS	3019NS
Error	36	0.01	0.05	1.4 <sup>-03</sup>	3730

gL= grados de libertad, \*=P<0.05, \*\*=P<0.01, \*\*\*=P<0.001, NS= No significativo

Entre especies, *C. longirostrata* presentó la mayor área foliar de los rebrotes, la cual disminuyó por el efecto del corte (Cuadro 7).

Respecto a la biomasa de rebrotes, las especies se comportaron diferente, mientras la biomasa total, foliar y de tallos de los rebrotes en *C. longirostrata* se incrementó del corte 1 al 3, en *C. retusa* disminuyó. La disminución en las variables de biomasa observada en el corte 2 de *C. longirostrata* pudo deberse al ataque de mosquita blanca que sufrió esta especie durante este periodo, donde se perdieron rebrotes.

**Cuadro 7.** Medias de la biomasa y área foliar de rebrotes por planta en dos especies de *Crotalaria* en estudio.

Especie	Corte	MS total de rebrotes	MS foliar de rebrotes	MS tallos de rebrotes	Área foliar de rebrotes
		planta <sup>-1</sup>	planta <sup>-1</sup>	planta <sup>-1</sup>	planta <sup>-1</sup> , cm <sup>2</sup>
<i>C. longirostrata</i>	1	0.32 bc	0.20 b	0.11 a	145.2 ab
	2	0.17 cd	0.11 c	0.05 b	76.0 b
	3	0.48 a	0.33 a	0.15 a	191.8 a
<i>C. retusa</i>	1	0.27 bc	0.19 b	0.07 b	87.3 b
	2	0.36 ab	0.22 b	0.12 a	70.7 b
	3	0.11 d	0.06 c	0.04 b	26.2 c

Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

La relación hoja:tallo fue afectada por el corte y la interacción especie\*corte. Esta relación disminuye en ambas especies por efecto del corte (Cuadro 8), indicando mayor la dominancia de los tallos sobre las hojas conforme avanzan los cortes.

**Cuadro 8.** Cuadrados medios del análisis de varianza y medias de la interacción especie\*corte para la relación hoja: tallo en las especies de *Crotalaria* en estudio.

Factor de variación	gL	Relación hoja:tallo	Especie	Corte	Media		
Especie (E)	1	1.9 <sup>-03</sup> NS	<i>C. longirostrata</i>	1	0.58 a		
Corte (C)	2	0.47***		2	0.38 b		
Fertilización (F)	2	2.2 <sup>-03</sup> NS		3	0.29 b		
E*C	2	0.04*	<i>C. retusa</i>	1	0.63 a		
C*F	4	0.005NS					
E*F	2	0.005NS				2	0.45 b
E*C*F	4	0.01NS				3	0.13 c
Error	18	0.01					

gL= grados de libertad, \*= $P < 0.05$ , \*\*= $P < 0.01$ , \*\*\*= $P < 0.001$ , NS= No significativo

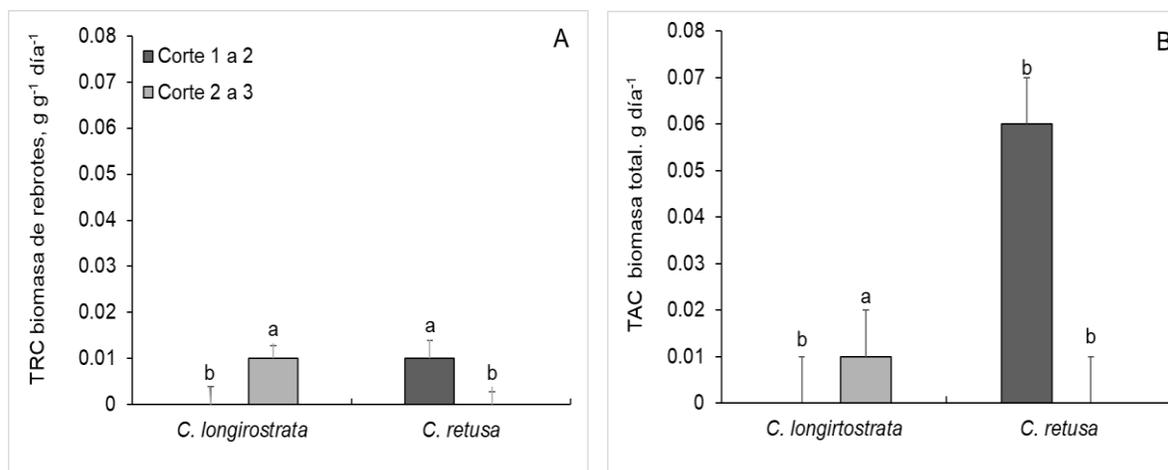
La tasa relativa de crecimiento (TRC), que indica la acumulación diaria de biomasa foliar de los rebrotes por planta, fue afectada por la interacción especie\*corte (Cuadro 9 y Figura 7A). La ganancia diaria de biomasa en los rebrotes para *C. longirostrata* se dio en el periodo de septiembre y diciembre (corte 2 al 3). En contraste en *C. retusa* la ganancia de biomasa diaria se presentó en el primer periodo (agosto a septiembre), lo que indica diferencias en crecimiento entre las dos especies.

**Cuadro 9.** Cuadros medios del análisis de varianza y medias de la interacción especie\*corte para la tasa relativa de crecimiento en dos especies de *Crotalaria* en estudio.

Factor de variación	gL	Tasa relativa de crecimiento de la biomasa foliar de rebrotes	Tasa absoluta de crecimiento
Especie (E)	1	8.1 <sup>-06</sup> NS	1.0 <sup>-03</sup> NS
Corte (C)	1	7.6 <sup>-05</sup> NS	9.5 <sup>-03</sup> *
Fertilización (F)	2	3.5 <sup>-06</sup> NS	2.5 <sup>-05</sup> NS
E*C	1	1.7 <sup>-03</sup> **	0.02**
C*F	2	1.1 <sup>-04</sup> NS	6.2 <sup>-04</sup> NS
E*F	2	3.6 <sup>-06</sup> NS	1.4 <sup>-05</sup> NS
E*C*F	2	5.0 <sup>-05</sup> NS	2.9 <sup>-04</sup> NS
Error	24	9.7 <sup>-05</sup>	1.2 <sup>-03</sup>

gL= grados de libertad, \*= $P<0.05$ , \*\*= $P<0.01$ , \*\*\*= $P<0.001$ , NS= No significativo

La tasa absoluta de crecimiento (TAC) de la biomasa total, presentó diferencias significativas entre corte y el efecto de la interacción especie\*corte (Cuadro 9). La Figura 7B muestra el mismo comportamiento que para la TRC, aunque una mayor acumulación de biomasa del corte 2 al 3 para *C. retusa*, debido probablemente al crecimiento radicular.



**Figura 7.** Tasa relativa de crecimiento de la biomasa de rebrotes (A) y tasa absoluta de crecimiento de la biomasa total (B) en dos especies de *Crotalaria*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P\leq 0.05$ ). Las barras indican el error estándar.

#### 4.1.2. Pigmentos fotosintéticos y NDVI

No se observó efecto de la especie ni de la fertilización en la concentración de pigmentos fotosintéticos en las dos especies de *Crotalaria* en estudio. Los cortes

sucesivos aplicados a las especies de *Crotalaria* no afectaron la concentración de clorofila a, b y total ni la relación clorofila a/b, pero si el índice de vegetación de la diferencia normalizada o índice de reflectancia del dosel (NDVI) (Cuadro 10).

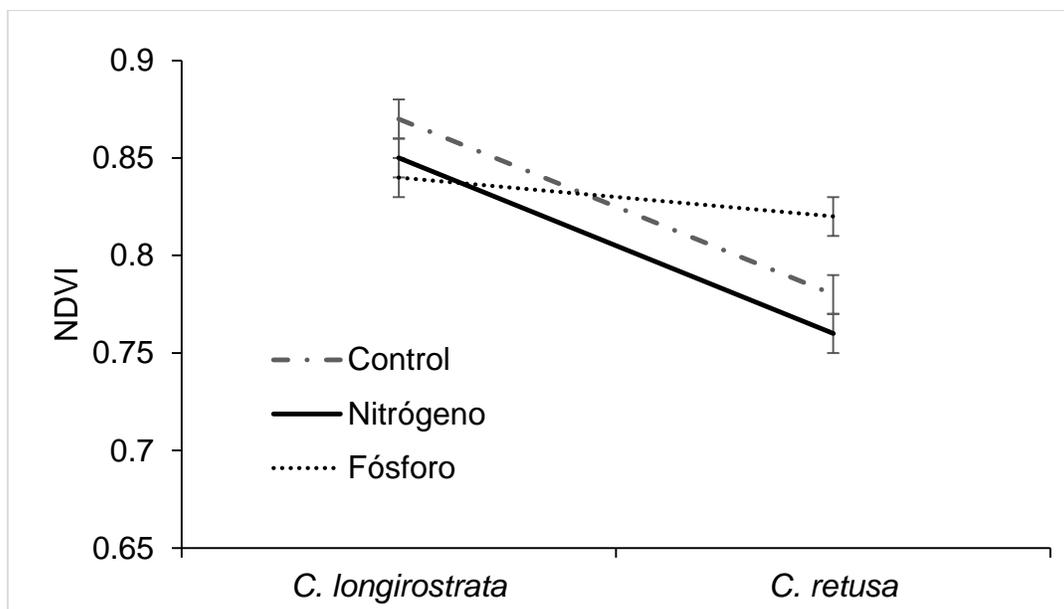
**Cuadro 10.** Concentración de pigmentos fotosintéticos e índice de vegetación de la diferencia normalizada (NDVI) en hojas de *C. longirostrata* y *C. retusa* sometidas a cortes sucesivos del follaje.

Especie	Corte	Clorofila	Clorofila	Clorofila	Carotenoides	Relación a/b	NDVI
		a	b	total			
		$\mu\text{g mL}^{-1}$					
<i>C. longirostrata</i>	1	4.02 a <sup>†</sup>	1.22 a	5.24 a	0.86 abc	4.02 a	0.83 b
	2	4.01 a	1.31 a	5.32 a	0.90 ab	3.05 a	0.85 ab
	3	4.27 a	1.43 a	5.70 a	0.59 c	3.00 a	0.86 a
<i>C. retusa</i>	1	4.17 a	1.17 a	5.34 a	0.83 abc	3.57 a	0.77 c
	2	4.64 a	1.36 a	6.00 a	0.95 a	3.91 a	0.85 ab
	3	4.29 a	1.47 a	5.76 a	0.66 bc	2.93 a	0.73 d

<sup>†</sup>Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

Los carotenoides disminuyeron por efecto del corte. Este efecto negativo en carotenoides por efecto del corte es importante ya que son fuente de provitamina A y actividades antioxidantes (Jáuregui *et al.*, 2011).

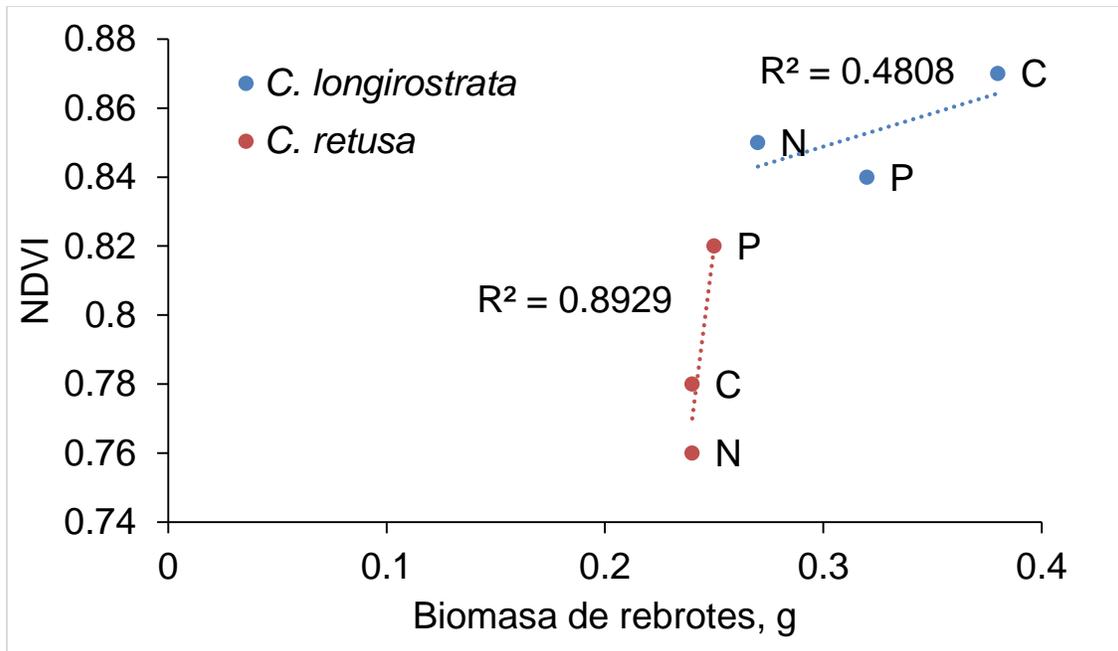
El NDVI se incrementa en el tercer corte en *C. longirostrata* y disminuye en *C. retusa*. Además, el NDVI presentó efecto de la especie, corte, fertilización, la interacción especie\*fertilización y de especie\*corte. Entre especies, *C. longirostrata* presentó el mayor NDVI ( $0.85 \pm 0.0115$ ), mientras el de *C. retusa* fue de  $0.78 \pm 0.0115$ ). La interacción especie\*fertilización para este índice se muestra en la Figura 8, en la que se observa que fue originada por la fertilización fosfatada. La fertilización no mostró efecto en el NDVI de *C. longirostrata*, el cual se mantuvo siempre superior al de *C. retusa*. En contraste, *C. retusa* con fertilización fosfatada incrementó este índice.



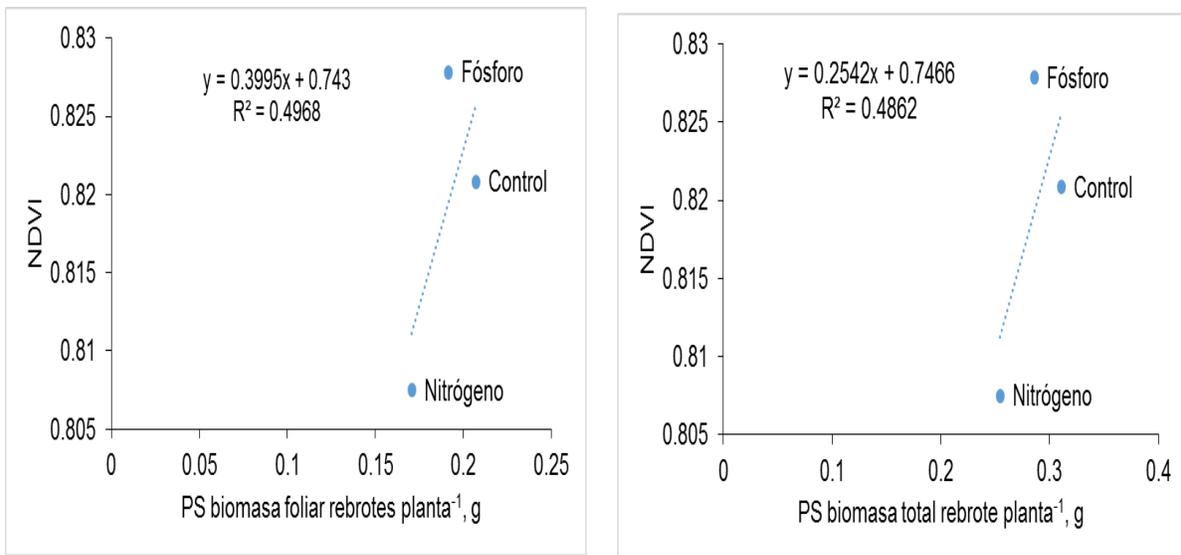
**Figura 8.** Efecto de la fertilización nitrogenada y fosfatada en el NDVI en las dos especies de *Crotalaria* en estudio. Las barras indican el error estándar.

El NDVI es un índice de reflectancia espectral que puede estar correlacionado con características agronómicas y biofísicas del cultivo o de la planta. Se ha indicado que puede predecir la actividad fotosintética de la planta por correlacionar con el contenido y actividad de la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, al detectar la longitud de onda reflejada en el infrarrojo cercano y el rojo (Verhulst *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2015). En leguminosas, como el frijol, este índice ha mostrado una alta correlación con la biomasa del dosel, el índice de área foliar a etapas fenológicas específicas y del rendimiento (Monteiro *et al.*, 2012).

La relación entre el NDVI y biomasa de rebrotes en los tratamientos de fertilización para ambas especies de *Crotalaria* muestra una alta correlación positiva para *C. retusa* (0.89) y baja para *C. longirostrata* (0.48) (Figura 9). Es decir, siempre a mayor biomasa de rebrotes mayor NDVI. Cuando se realiza la correlación entre biomasa de rebrotes y el NDVI en los tratamientos fertilizados, se observa una menor correlación entre estas dos variables (Figura 10). Los tratamientos fertilizados con fósforo muestran mayor biomasa y mayor NDVI, en contraste los tratamientos con nitrógeno presentaron la menor biomasa y el menor NDVI.

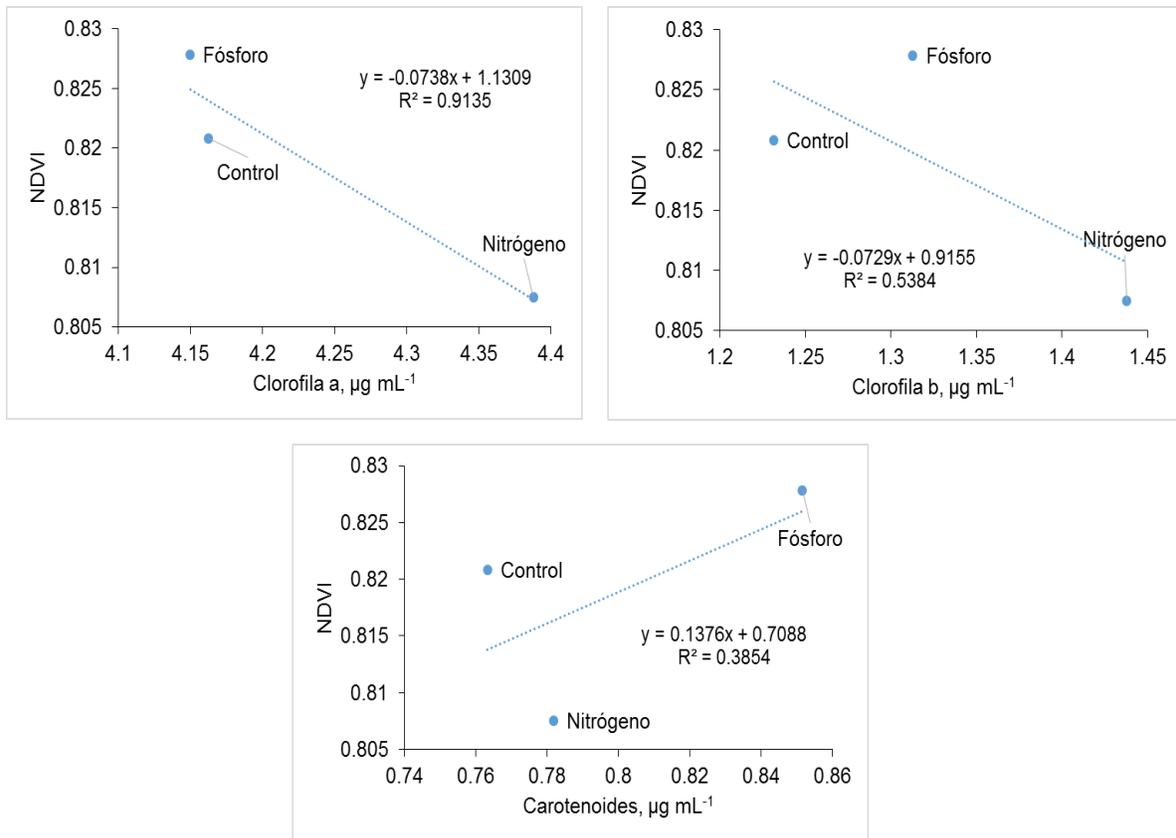


**Figura 9.** Relación entre el NDVI y la biomasa de rebrotes en las especies de *Crotalaria* en estudio, con y sin fertilización nitrogenada y fosfatada. C=control, N=Nitrógeno, P=Fósforo.



**Figura 10.** Efecto de la fertilización en la relación NDVI y biomasa de rebrotes planta<sup>-1</sup> en las especies de *Crotalaria* en estudio.

La relación NDVI con pigmentos fotosintéticos fue alta y negativa con clorofila a ( $r^2=0.91$ ) y clorofila b ( $r^2=0.58$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Relación entre los pigmentos fotosintéticos y el NDVI con y sin fertilización en dos especies de *Crotalaria*.

Esta relación inversa estuvo relacionada con la fertilización nitrogenada, cuyas plantas presentaron mayor clorofila a y b, pero menor NDVI. Por lo que no coincide con Verhulst *et al.* (2010), quienes indican que plantas con un alto contenido de clorofila también presentan un alto NDVI. Más bien en nuestro caso, el menor NDVI en las plantas fertilizadas indica que presentaron estrés por la adición de nitrógeno (Verhulst *et al.*, 2010). Estos autores también indican que el NDVI no refleja el efecto de un solo parámetro y debe ser considerado como una medida de crecimiento integral de la planta, por lo que puede estar relacionado con la biomasa, superficie foliar, densidad del follaje como ya se observó en la Figura 9 y 10). La relación entre NDVI y carotenoides fue positiva y baja ( $r^2=0.38$ ).

### 4.1.3. Biomasa de raíz y nodulación

Los datos analizados mostraron diferencias en la biomasa de raíz por efecto de la especie, el corte, la fertilización y la interacción especie\*corte. En contraste el número de nódulos por planta mostró, además, efecto significativo en las interacciones corte\*fertilización, especie\*fertilización y especie\*corte\*fertilización (Cuadro 11).

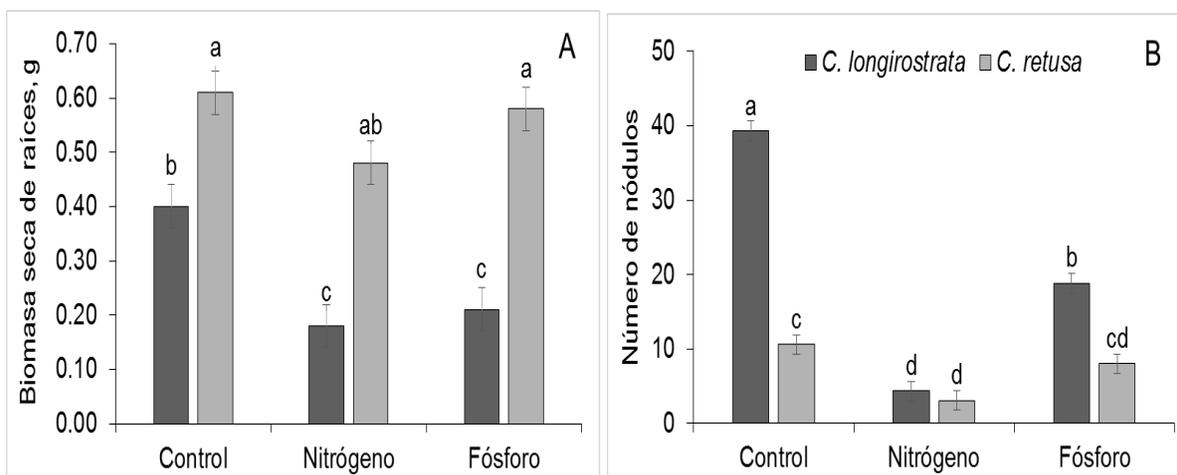
**Cuadro 11.** Cuadrados medios del Análisis de varianza en biomasa de raíz y número de nódulos  $\text{planta}^{-1}$  en dos especies de *Crotalaria* en estudio.

Factor de variación	gL	Biomasa de raíz $\text{planta}^{-1}$ , g	Número de nódulos $\text{planta}^{-1}$
Especie (E)	1	0.76***	1667***
Corte (C)	2	0.08**	1773***
Fertilización (F)	2	0.09**	1358***
E*C	2	0.06*	417***
C*F	4	0.009NS	424***
E*F	2	0.01NS	584***
E*C*F	4	3.0 <sup>-03</sup> NS	286***
Error	18	0.009	10.80

gL= grados de libertad, \*= $P<0.05$ , \*\*= $P<0.01$ , \*\*\*= $P<0.001$ , NS= No significativo

La biomasa de raíz fue afectada por la fertilización solo en *C. longirostrata* (Figura 12A). En esta especie la biomasa de raíces disminuyó con la fertilización, mientras que *C. retusa* mantuvo su biomasa radical con o sin fertilización.

La nodulación presentó el mismo efecto que la biomasa de raíz (Figura 12B), pero disminuyendo en ambas especies con la fertilización nitrogenada. La nodulación en *C. longirostrata* fue mayor en el tratamiento control (39.3 nódulos promedio  $\text{planta}^{-1}$ ) respecto a la fertilización fosfatada (18.3 nódulos promedio  $\text{planta}^{-1}$ ) y disminuyó significativamente con la fertilización nitrogenada (4.3 nódulos promedio  $\text{planta}^{-1}$ ). En *C. retusa*, solo se observa disminución de la nodulación por efecto de la fertilización nitrogenada.



**Figura 12.** Efecto de la fertilización en la biomasa de raíz (A) y en la nodulación (B) de dos especies de *Crotalaria*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

La reducción o inhibición de la nodulación con la fertilización nitrogenada es consecuencia de la afectación en la simbiosis planta: *Rhizobium* lo que resulta en una baja o nula fijación biológica de  $N_2$  en leguminosas, lo que ha sido documentado por diversos autores (Zhu *et al.* 1996; Heggio y Barakah, 2004; Xie *et al.*, 2015). Sin embargo, en *Crotalaria juncea* y *Phaseolus vulgaris* se ha observado que la aplicación de N mineral a dosis bajas o moderadas al inicio del ciclo de cultivo tiene un efecto sinérgico con la fijación de  $N_2$  lo que lleva a una mayor nodulación y acumulación de materia seca (Mendonça y Schiavinato, 2005; Mitova y Stancheva, 2013).

Este efecto no fue observado en este estudio con *C. longirostrata* (Figura 10), probablemente debido a que la dosis aplicada, aunada a los contenidos de N en el sustrato proporcionaron un alto contenido de N mineral disponible que inhibió la simbiosis planta: *Rhizobium* afectando la fijación biológica de  $N_2$ . Por otro lado, la disminución de la biomasa radical junto con la inhibición de la nodulación con la fertilización nitrogenada, es similar a lo observado en alfalfa por Xie *et al.* (2015), esto pudo conducir a una menor área de absorción radical en los tratamientos de fertilización, por lo que no se observaron incrementos en la concentración de pigmentos fotosintéticos ni en el rendimiento de biomasa foliar.

Los cortes sucesivos al follaje de ambas especies de *Crotalaria* afectaron únicamente a la biomasa de raíz de la *C. retusa* (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Medias de la biomasa de raíz y nodulación en dos especies de *Crotalaria* en estudio.

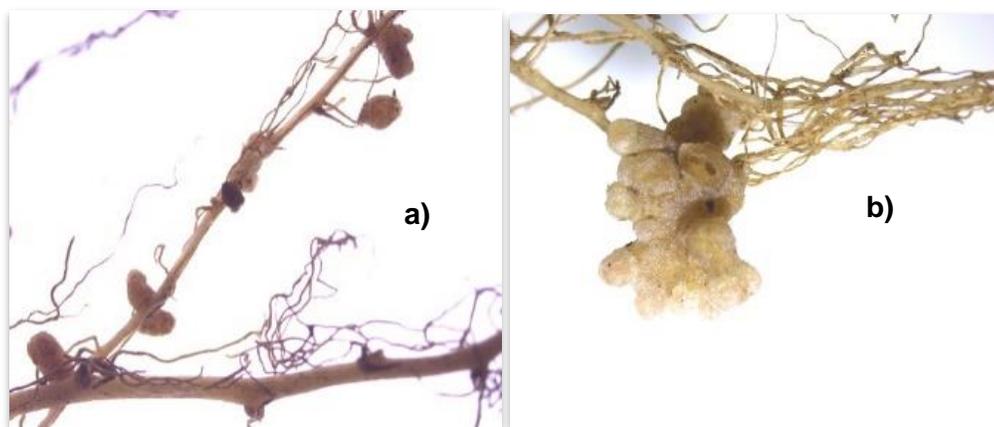
Especie	Corte	Materia seca raíz planta <sup>-1</sup> , g	Número de nódulos planta <sup>-1</sup>
<i>C. longirostrata</i>	1	0.25 b	0.00 c
	2	0.24 b	32.0 a
	3	0.29 b	30.5 a
<i>C. retusa</i>	1	0.38 b	0.0 c
	2	0.62 a	11.0 b
	3	0.66 a	10.66 b

Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

Respecto a la nodulación, esta se vio afectada positivamente en ambas especies por efecto del corte, siendo mayor en *C. longirostrata*.

Este efecto de mayor nodulación por efecto de los cortes puede deberse al estrés causado por el corte mismo, lo que hace que la planta requiera mayor cantidad de nutrientes para emitir nuevos brotes, principalmente nitrógeno, lo que la lleva a producir más nódulos para fijar este elemento vía la fijación biológica de N<sub>2</sub> (Taiz y Zieger, 2002, Marschner, 2012).

En la Figura 13 se muestran la morfología de nódulos de *C. longirostrata* y *C. retusa*, las cuales mostraron actividad de fijación (color rojo intenso en el interior).



**Figura 13.** Morfología de nódulos en *C. longirostrata* (a) y *C. retusa* (b). 0.65X.

#### 4.1.4. Plagas y enfermedades observadas durante el estudio

Los insectos pueden ser benéficos en pequeños cultivos como huertos de traspatios y en la agricultura ya que promueven distintas interacciones ecológicas que son vitales para los agroecosistemas, como la polinización, el almacenamiento de carbono, el reciclaje de nutrientes, la regulación de microclimas y de procesos hidrológicos (Altieri, 1999; Altieri, 2002; Bengtsson *et al.*, 2005). Sin embargo, los cultivos son sistemas complejos donde también se presentan organismos potencialmente dañinos.

Durante este estudio se observó en las plantas de *C. longirostrata* y *C. retusa* cultivadas en el invernadero, bajo las condiciones descritas en el capítulo III, la presencia de araña roja en las hojas un mes después de la siembra, principalmente en *C. longirostrata*. Por ello se aplicó Abamectina® vía foliar en todo el invernadero y se continuó con las aplicaciones de acuerdo a las indicaciones del insecticida. A finales del mismo mes, se observó la presencia de hormigas y grillos, aplicando polvo (Ant-Stop®Plus) en todo el perímetro del invernadero para su control.

En el transcurso de los meses que duró el experimento hubo presencia de gusanos cortadores (*Spodoptera* sp), principalmente en el tallo, siendo menor su presencia en hojas de *C. retusa*, erradicándolos manualmente, se observó que los gusanos se escondían en el subsuelo de la planta (Figura 14).



**Figura 14.** Presencia del gusano cortador (*Spodoptera* sp) en *C. retusa*.

De agosto a septiembre 2018, se observó la presencia de cochinilla algodonosa (*Pseudococcus citri*), en *C. longirostrata*. Para la eliminación de esta plaga, las plantas afectadas se lavaron con jabón y agua, y se separaron de las sanas colocándolas en otra área del invernadero por unos días para su recuperación, y poder integrarlas nuevamente al grupo (Figura 15).



**Figura 15.** Presencia de cochinilla algodonosa (*Pseudococcus citri*) en chipilín (*C. longirostrata*).

En ambas especies antes del tercer corte (septiembre de 2018), se observó la presencia de mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), con mayor abundancia en *C. longirostrata*; para su control se aplicó un producto orgánico vía foliar preparado a base de agua, vinagre y jabón (Figura 16), el cual controló la plaga, pero defolió las plantas, afectando el muestreo, por lo tanto, este tuvo que ser retrasado un mes.



**Figura 16.** Presencia de mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) en chipilín (*C. longirostrata*).

Durante ese tiempo (septiembre y octubre) en *C. retusa* seguían presentándose los gusanos cortadores (*Spodoptera* sp). Al mismo tiempo se detectó la presencia del gusano medidor, gusano más pequeño delgado y transparente en la especie de *C. longirostrata*, mismo que provocó daño a las hojas (Figura 17).



**Figura 17.** Presencia de gusano medidor y su efecto en hojas de *C. longirostrata* durante el mes de octubre de 2019.

Debido a que la presencia de mosquita blanca continuó, por lo cual fue necesario fumigar con el insecticida de uso comercial Muralla Max, cuyo agente activo es BETACYFLUTRIN 8.40% + IMIDACLOPRID 19.60%. Suspoemulsión» [8,4% en peso equivale a 9% p/v; 19.6% en peso equivale a 21% p/v] de uso agrícola, aplicando vía foliar cada siete días para eliminarlas ya que también encontramos cochinilla algodonosa; y en *C. retusa* empezó a presentarse una especie de ceniza blanca que formaba círculos y llegó a cubrir hojas y tallos, reportada en la literatura como cenicilla polvorienta producida por *Oidiopsis* sp. (Velásquez-Valle *et al.*, 2017). Se realizó una primera aplicación de Azoxystrobin SC, y una segunda a los siete días, pero no hubo efecto, y para el último corte, las plantas estaban totalmente cubiertas de cenicilla en tallos y hojas (Figura 18).

Las *Crotalarias* a pesar de no ser plantas cultivadas de forma comercial, presentan severos ataques de insectos por su rico follaje. La presencia de estas plagas afectó la producción de área foliar sin afectar los resultados del experimento, con la excepción de cuando se utilizó un tratamiento ecológico a base de ajo, vinagre y jabón para el control de la mosquita blanca, lo que provocó defoliación severa de

ambas especies y se tuvo que aplazar el corte un mes, retrasando la toma de muestras.



**Figura 18.** Presencia de cenicilla polvorienta (*Oidiopsis* sp.) en hojas de *C. retusa*.

De ahí que para mantener un follaje sano y comestible en producción comercial del chipilín es de suma importancia realizar ensayos con diferentes formulaciones ecológicas, ya que es sumamente sensible a la aplicación de diversas sustancias que controlan plagas.

## 4.2. CALIDAD NUTRITIVA DE *C. longirostrata* y *C. retusa* EN RESPUESTA A CORTES SUCESIVOS Y FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y FOSFATADA

El análisis de varianza para los contenidos de proteína, cenizas y grasa cruda del follaje de *C. longirostrata* y *C. retusa* se presentan en el Cuadro 13. Este análisis mostró para proteína, ceniza y grasa cruda, tanto en hojas como en tallos, un efecto significativo de especie, fertilización y corte (excepto cenizas en tallo), así como sus interacciones especie\* fertilización para grasa cruda y proteína en tallos, especie\* corte solo en grasa en tallos. Además, en proteína en tallos, cenizas en hojas y grasa en tallos, se observó efecto significativo para las interacciones y especie\*fertilización\*corte.

**Cuadro 13.** Cuadrados medios del análisis de varianza del porcentaje de proteína, ceniza y grasa cruda de dos especies de *Crotalaria*: *C. longirostrata* y *C. retusa*.

Fuente de variación	gL	Proteína en hojas	Proteína en tallos	Ceniza en hojas	Ceniza en tallos	Grasa cruda en hojas	Grasa cruda en tallos
Especie (E)	1	1069.50***	60.76***	33.85***	14.49*	19.75***	174.06**
Fertilización (F)	2	2.93NS	30.44**	4.09*	2.02NS	1.75**	127.81**
Corte (C)	2	21.27**	202.88***	42.32***	1.07NS	1.18**	160.06***
E*F	2	7.27NS	17.15*	1.06NS	0.31NS	1.69**	106.14**
E*C	2	9.52NS	13.86NS	0.21NS	4.60NS	0.37NS	211.59***
F*C	4	18.44**	12.55*	1.40NS	1.00NS	0.96**	69.48**
E*F*C	4	1.70NS	15.81*	2.27*	0.57NS	0.24NS	49.92**
Error	72	3.35	4.39	0.79	2.01NS	0.18	9.14

gL= grados de libertad, \*= $P<0.05$ , \*\*= $P<0.01$ , \*\*\*= $P<0.001$ , NS= No significativo

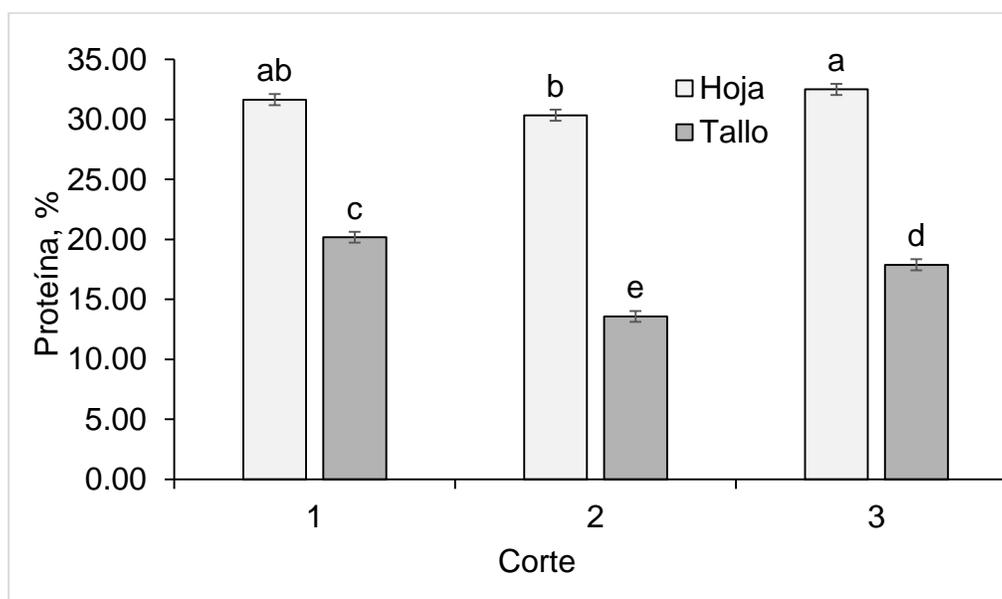
### Proteína

El contenido de proteína en hojas y tallos varió en función de la especie y el corte; además de la fertilización en proteína de tallos. Entre cortes, las hojas son las que presentaron los contenidos más altos en los tres cortes, incluso en el corte 3 se ve un incremento significativo de proteína (Cuadro 14, Figura 19). En contraste, en el tallo se observa una disminución de proteína con los cortes.

**Cuadro 14.** Medias para proteína, cenizas y grasa cruda por corte en hoja y tallo de dos especies evaluadas de *Crotalaria*.

Corte	Proteína foliar en rebrotes planta <sup>-1</sup>	Proteína tallos en rebrotes planta <sup>-1</sup>	Ceniza foliar rebrotes planta <sup>-1</sup>	Ceniza tallo rebrotes planta <sup>-1</sup>	Grasa cruda foliar de rebrotes planta <sup>-1</sup>	Grasa cruda tallos de rebrotes planta <sup>-1</sup>
	%					
1	31.65ab	20.17a	11.81b	12.94a	4.48 a	3.97 a
2	30.35b	13.56 c	14.38a	13.28a	4.60 a	10.78 a
3	32.51a	17.87b	11.65b	13.42a	5.08 a	5.09 a

Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 19.** Efecto de la interacción corte\*órgano en el contenido de proteína (%) de dos especies *Crotalaria*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

Entre componentes de la planta (Cuadro 15), nuevamente las hojas de *C. longirostrata* presentaron significativamente el mayor contenido de proteína (35.9%) con respecto a las de *C. retusa* (27.0%). Los tallos presentaron los contenidos más bajos de proteína que van de 16.1% (*C. retusa*) a 18.2% (*C. longirostrata*).

En otros estudios y dependiendo de las condiciones ambientales y sitio de recolecta, los contenidos de proteína también son más altos para hojas en *C. longirostrata* (38.3%) que en los tallos (10.2 a 13.7%) (Arias *et al.*, 2003; Juárez- Fuentes *et al.*, 2013; Pérez-Cornelio, 2016).

**Cuadro 15.** Medias del contenido de proteína y de grasa para la interacción especie\*órgano en las especies de *Crotalaria* en estudio.

Especie	Proteína foliar en rebrotes planta <sup>-1</sup>	Proteína tallos en rebrotes planta <sup>-1</sup>	Ceniza foliar rebrotes planta <sup>-1</sup>	Ceniza tallo rebrotes planta <sup>-1</sup>	Grasa cruda foliar de rebrotes planta <sup>-1</sup>	Grasa cruda tallos de rebrotes planta <sup>-1</sup>
	%					
<i>C. longirostrata</i>	35.96a	18.27a	13.41a	13.73a	8.81a	3.98a
<i>C. retusa</i>	27.06b	16.15b	11.82b	12.70b	5.46a	4.41a

Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

*C. retusa* es una leguminosa presente en áreas naturales en África e introducida en América (Yashim *et al.*, 2012; CABI, 2016), con alta toxicidad por el contenido de alcaloides pirrolizidínicos (Nobre *et al.*, 2005). Por su abundancia en Nigeria y a que siempre tiene hojas verdes, estudios nutricionales han sido realizados para ver su potencial como alimento animal. Los contenidos de proteína de esta leguminosa son mayores en hojas frescas (15.69%), que cuando son secadas al sol (12.31%) (Yashim *et al.*, 2012). Alalade *et al.* (2019) observaron contenidos de proteína superiores a los observados por Yashim *et al.* (2012) que van de 18.0% en hojas y 14.63% en semillas. Ambos estudios muestran contenidos de proteína menores a los cuantificados en hojas de esta especie en nuestro experimento.

El efecto de fertilización nitrogenada o fosfatada sobre el contenido de proteína, grasa y cenizas se observó entre especies (Cuadro 16).

**Cuadro 16.** Medias del contenido de proteína, grasa y cenizas en hojas y tallo de rebrotes para la interacción especie\*fertilización en *Crotalaria*.

Especie	Fertilización	Proteína hoja	Proteína tallo	Grasa hoja	Grasa tallo	Ceniza hoja	Ceniza tallo
		%					
<i>C. longirostrata</i>	Control	35.80a	17.44ab	3.84d	14.49a	13.05ab	13.35a
	Nitrógeno	35.78a	18.82a	4.20cd	9.62ab	14.17a	14.10a
	Fósforo	36.29a	18.54a	3.91d	2.32c	13.02ab	13.76a
<i>C. retusa</i>	Control	26.91b	15.43bc	4.80bc	3.88c	11.40c	12.56a
	Nitrógeno	28.15b	18.60a	5.33b	5.80bc	12.13bc	13.10a
	Fósforo	26.11b	14.41c	6.25a	3.56c	11.95bc	12.44a

Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

*C. longirostrata* presentó contenidos más altos de proteína que *C. retusa*, tanto en hojas como en tallos. En las dos especies no se observaron diferencias significativas

entre los tratamientos de fertilización para proteína en hojas. En contraste en *C. retusa*, la fertilización nitrogenada incrementó los contenidos de proteína en tallos respecto al control y la fertilización fosfatada; y la fertilización fosfatada los contenidos de grasa de hojas.

Kai-yun *et al.* (2015) observaron que al fertilizar alfalfa con dosis de 75 y 150 kg N ha<sup>-1</sup> no hubo efecto en la acumulación de biomasa aérea ni en la concentración de N en tallos más hojas. Respecto a la fertilización fosfatada, en otras leguminosas se han observado efectos positivos para el crecimiento de tallos y hojas (Gweyi-Onyango y Osei-Kwarteng, 2011; Du *et al.*, 2009), en biomasa y número de nódulos (Domínguez-Pérez *et al.*, 2017), y en la concentración de proteína en el grano de frijol pelón (Kyei-Boahen *et al.*, 2017). Estos autores observaron un incremento en la concentración de nitrógeno en el tallo y en el grano por efecto de la aplicación de 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, lo que no se observó en este estudio para *C. longirostrata* y *C. retusa*, cultivadas en condiciones de invernadero.

## **Grasa**

Para el contenido de grasa, no se observaron diferencias significativas entre especies (Cuadro 15) para hojas y tallos. Entre los tratamientos de fertilización, en hojas de *C. retusa* se incrementa el contenido de grasa con la fertilización fosfatada y en tallos de *C. longirostrata* con el tratamiento control y la fertilización nitrogenada (Cuadro 16). El rango de variación para tallos fue de 2.32 a 14.49% y en hojas de 3.84 a 6.25%. Entre cortes, no se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre los diferentes órganos (Cuadro 14). Lo anterior significa que al someter a *C. longirostrata* a cortes sucesivos del follaje no se afecta el contenido en grasa. Esto es importante nutricionalmente, porque los lípidos son constituyentes de las membranas celulares y aportan energía. En otros estudios realizados en Tabasco, México en hojas de *C. longirostrata* de diferentes procedencias, los contenidos de grasa cruda variaron de 2.8 a 3.1%, (Juárez- Fuentes *et al.*, 2013; Castaneda, 2017). En *C. retusa* de Nigeria, los valores van de 4.60% en hojas y 5.03% en semillas (Alalade *et al.*, 2019). Los contenidos fueron menores a los obtenidos en esta investigación, debido probablemente al efecto al tipo y fertilidad de los suelos,

así como las condiciones ambientales donde se realizó el experimento, condiciones de invernadero y riego diario.

## **Cenizas**

Los resultados del análisis de varianza indican efecto significativo para especie, fertilización, corte y de la interacción especie\*fertilización\*corte para el contenido de cenizas en hojas; y solo de la especie para el contenido de cenizas en tallos (Cuadro 13).

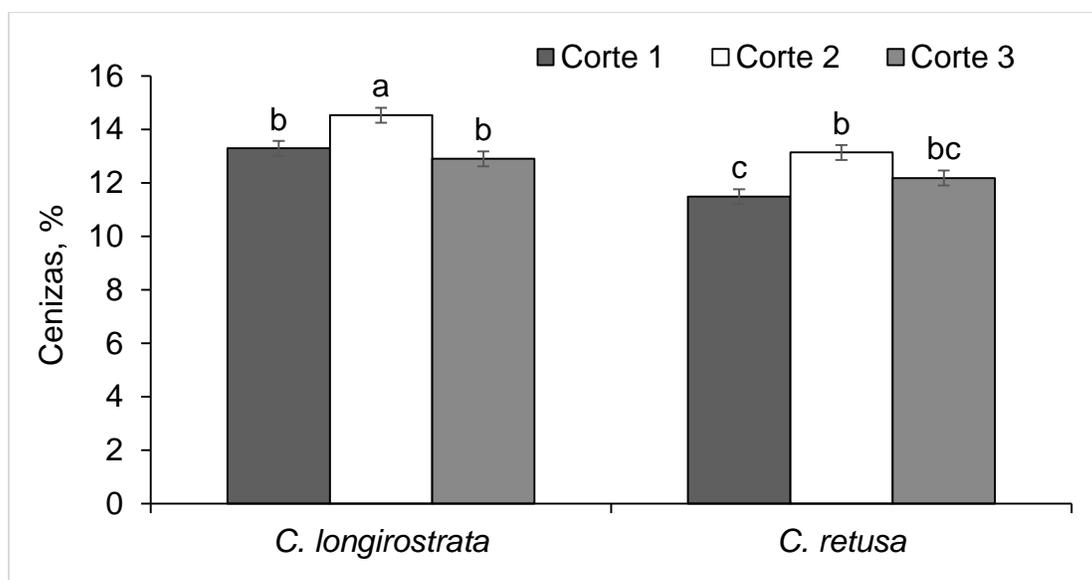
Respecto a los cortes, el corte 2 presentó los mayores contenidos de cenizas respecto al corte 1 y 3, principalmente en *C. longirostrata* (Cuadro 14, Figura 20). Entre especies *C. longirostrata* presentó el mayor contenido de cenizas en hojas y tallos (13.4 y 13.7%, respectivamente) respecto a *C. retusa* (11.8 y 12.7%, respectivamente).

El Cuadro 15 muestra los contenidos por especie, siendo *C. longirostrata* la especie que presenta los mayores contenidos de ceniza en sus órganos (hojas y tallos).

La fertilización nitrogenada incrementó los contenidos de cenizas (13.60%), seguida de la fertilización fosfatada (13.10%) y el control con el más bajo (12.96%). Lo cual asegura mayor contenido de minerales.

En el Cuadro 16 se muestran el efecto de la fertilización por especie, donde *C. longirostrata* presentó la mejor respuesta. Estos resultados mostraron contenidos más altos a los obtenidos en el análisis bromatológico de Chipilín de diferentes procedencias, donde el rango va de 6.6 a 9.9% (Arias *et al.*, 2003; Juárez-Fuentes *et al.*, 2013).

Para *C. retusa*, se han determinado valores de 6.87% y 8.0% de cenizas en hojas frescas (Yassim *et al.*, 2012; Alalade *et al.*, 2019) incrementándose el contenido cuando son secadas bajo sombra (7.73%).



**Figura 20.** Contenido de cenizas (%) por corte en dos especies de *Crotalaria*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

### Azúcares solubles totales

El resultado del análisis de varianza muestra efectos significativos para la especie, corte y la interacción especie\*corte para la concentración de azúcares solubles totales (AST) en hojas. No se observaron efectos significativos para AST en tallos (Cuadro 17).

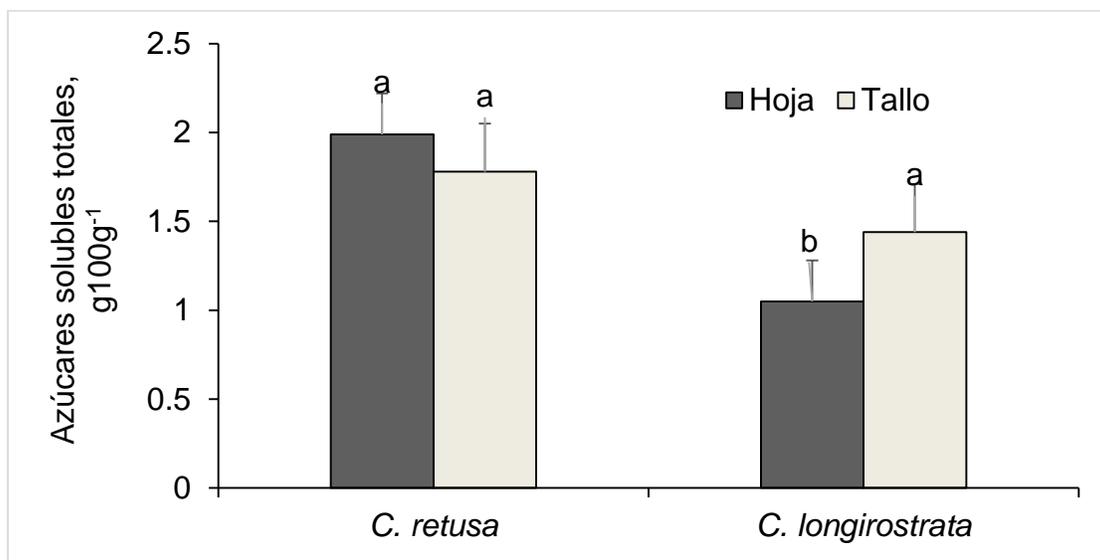
**Cuadro 17.** Cuadrados medios del análisis de la varianza para la concentración de azúcares solubles totales de dos especies de *Crotalaria*.

Fuente de variación	gL	Azúcares solubles totales en hoja	Azúcares solubles totales en tallo
Especie (E)	1	7.8396*	1.0850NS
Fertilización (F)	2	0.0077NS	0.5810NS
Corte (C)	2	8.1970**	2.5244NS
E*F	2	0.4929NS	1.8536NS
E*C	2	4.1014*	1.5113NS
F*C	4	0.4928NS	1.4767NS
E*F*C	4	0.3399NS	0.3696NS
Error	18	0.98	1.26

gL = grados de libertad; \*= $P < 0.05$ , \*\*= $P < 0.01$ , NS= No significativo

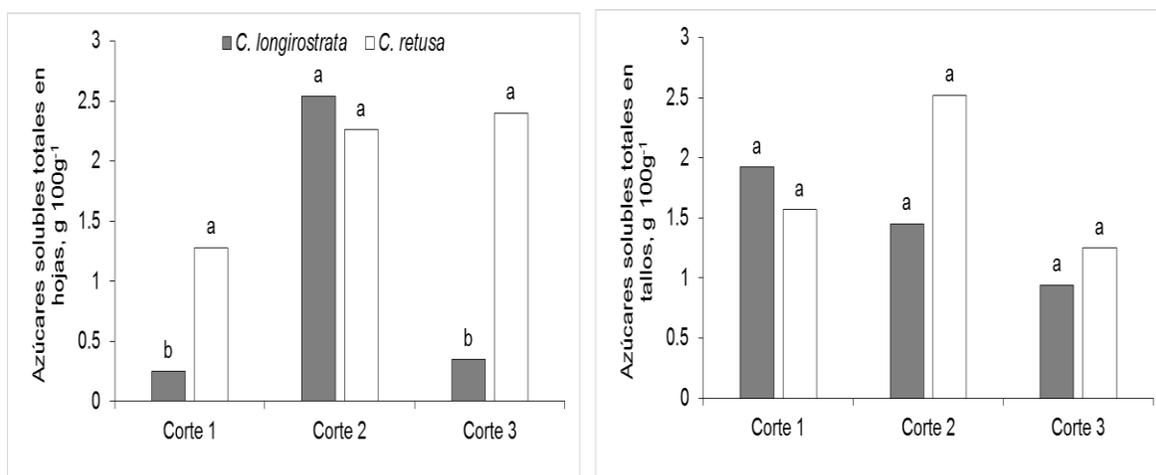
Entre especies, *C. retusa* presentó los mayores contenidos de AST en hojas (1.99 g 100g<sup>-1</sup>) en comparación a *C. longirostrata* (1.05 g 100 g<sup>-1</sup>) (Figura 21). Estos

contenidos se encuentran dentro del rango observado para 29 leguminosas de grano (0.59 a 6.17 g 100 g<sup>-1</sup> PS (Kan *et al.*, 2018).



**Figura 21.** Contenido de azúcares solubles totales en hoja y tallo (g 100g<sup>-1</sup>) en las especies de *Crotalaria* en estudio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el error estándar.

Los AST se incrementaron en el corte 2 en las hojas y tallos, principalmente de *C. longirostrata*, disminuyendo con el Corte 3 (Figura 22).



**Figura 22.** Efecto del corte en el contenido de azúcares solubles totales (g 100 g<sup>-1</sup>) en hojas y tallos de *C. longirostrata* y *C. retusa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

En el caso de *C. retusa*, los AST en hojas se mantuvieron altos entre el corte 2 y 3.

Estos carbohidratos funcionan como reservas de carbono en las plantas para apoyar el crecimiento o rebrote (Richards y Caldwell, 1985), los cuales podrían no ser suficientes para apoyar el crecimiento continuo después de una defoliación. Este efecto se observa en la Figura 22, donde el corte redujo la diferencia entre los AST del tallo y las hojas, sugiriendo que las reservas de AST en el tallo fueron utilizadas para el crecimiento foliar después de los cortes, y que los nuevos brotes iniciaron el proceso fotosintético suministrando de nuevo azúcares durante el metabolismo primario.

### Fibra dietética total y polifenoles totales

El análisis de varianza para los contenidos de fibra dietética y polifenoles totales de hojas de *C. longirostrata* y *C. retusa* se presentan en el Cuadro 18.

**Cuadro 18.** Cuadrados medios de fibra dietética total y polifenoles totales en hojas de dos especies *C. longirostrata* y *C. retusa*.

Fuente de variación	gL	Fibra dietética total	Polifenoles totales
Especie (E)	1	10497***	2648.30***
Fertilización (F)	2	630*	2.32NS
Cortes (C)	2	963**	449.18***
C*E	2	591*	146.98**
C*F	4	248NS	64.62*
E*F	2	889**	5.82NS
C*E*F	4	34NS	76.38*
Error	18	137.0	16.06

gL= grados de libertad, \*= $P<0.05$ , \*\*= $P<0.01$ , \*\*\*= $P<0.001$ , NS= No significativo

Este análisis mostró para fibra dietética significancia para los efectos de especie, fertilización y corte y de la interacción corte\*especie, especie\*fertilización. En el caso de polifenoles, los efectos fueron significativos también con excepción de fertilización, y la interacción especie\*fertilización.

### Fibra dietética total

La fibra dietética es reconocida como un componente benéfico en los alimentos (Khan *et al.*, 2007). Guo *et al.* (2018) definen a la fibra dietética como “las partes

comestibles de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado con completa o parcial fermentación en el intestino grueso, incluyendo polisacáridos no amiláceos (hemicelulosas, celulosas y pectinas), oligosacáridos, almidón resistente y lignina. El consumo de fibra dietética promueve efectos fisiológicos benéficos en humanos que incluyen su propiedad laxante, la disminución del colesterol sanguíneo y de la glucosa sanguínea y la prevención de ciertos tipos de cáncer como el rectal y de colon (Khan *et al.*, 2007). El consumo recomendado de fibra es de 14 g fibra total por 1000 kcal o 25 g para mujeres adultas y 38 g para hombres (Dahl y Stewart, 2015).

Los resultados mostraron que el contenido de fibra dietética total en hojas varió entre especies. *C. longirostrata* presenta el mayor contenido (55.2%) respecto a *C. retusa* (21.0%). El efecto de la interacción especie\*fertilización es significativo. La fertilización fosfatada disminuyó el contenido de fibra dietética en hojas de *C. longirostrata*. En contraste para *C. retusa* no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de fertilización (Cuadro 19, Figura 23).

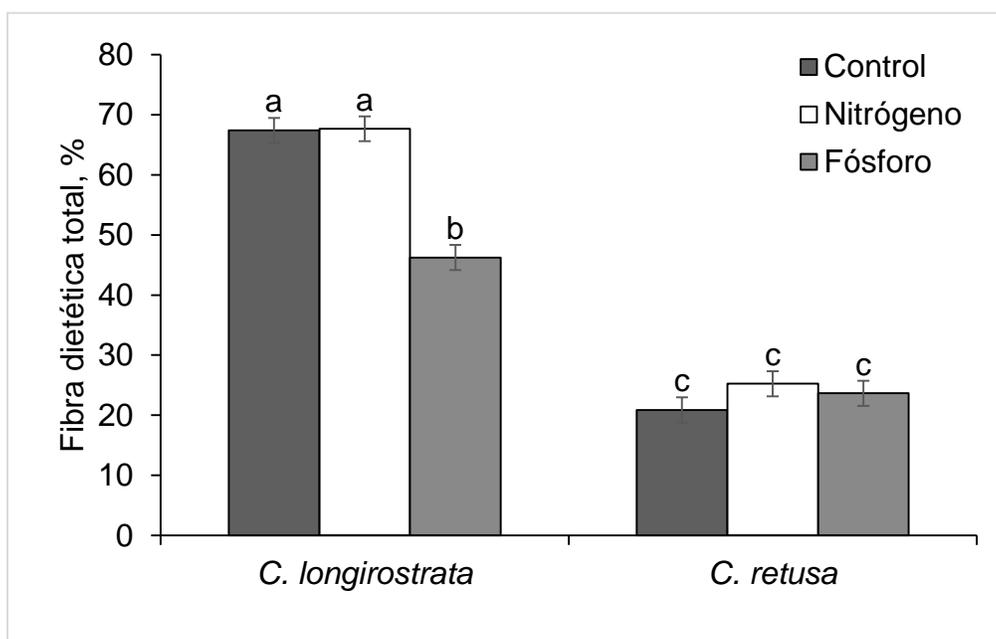
**Cuadro 19.** Medias del contenido de polifenoles y de fibra dietética total para la interacción especie\*fertilización en las especies de *Crotalaria* en estudio.

Especie	Fertilización	Fibra dietética total, %	Polifenoles totales, mg g <sup>-1</sup>
<i>C. longirostrata</i>	Control	67.39 a	25.37 b
	Nitrógeno	60.71 a	24.44 b
	Fósforo	37.52 b	24.42 b
<i>C. retusa</i>	Control	17.96 b	41.29 a
	Nitrógeno	23.17 b	41.31 a
	Fósforo	22.03 b	43.08 a

Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

Los resultados observados son superiores a los de hojas de *Vigna unguiculata* (19%) reportadas por Ohler *et al.* (1996). Estos autores observaron que el contenido de fibra dietética en las hojas de esta leguminosa se incrementó con la edad (26%). En un grupo de 29 leguminosas los rangos en fibra dietética variaron de 4.23% (*Vigna unguiculata*) a 35.36% (*Phaseolus vulgaris*) (Kan *et al.*, 2018). En otras especies, los contenidos de fibra dietética son también altos, en brotes florales de

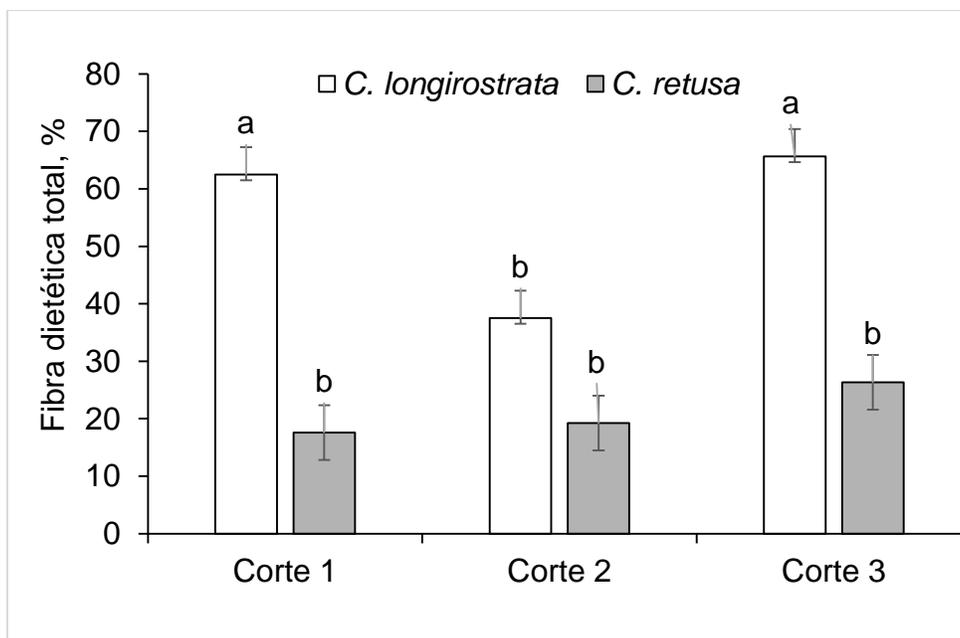
nopal varían de 31.7 a 46.3% (Reyes-Agüero *et al.* 2018), en semillas de *C. juncea* de 37.3 a 48.8% (Morris y Kays, 2005). Sin embargo, en vegetales congelados los rangos de fibra dietética son bajos, van de 0.5 a 5.5 g 100 g<sup>-1</sup>, estos incluyen chícharos, ejotes, apio, zanahorias, lechuga, entre otros (Storey y Anderson, 2014). Lo anterior muestra que las hojas de *Crotalaria* son una excelente fuente de fibra dietética para la salud humana, sobre todo porque alimentos con altos contenidos en fibra dietética pueden disminuir el colesterol y el índice glicémico *in vivo* (Kan *et al.*, 2018).



**Figura 23.** Efecto de la fertilización en el contenido de fibra dietética total de *C. longirostrata* y *C. retusa*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

La interacción de corte\*especie para fibra dietética muestra que *C. longirostrata* disminuye el contenido de esta variable en el corte 2 (37.51%) respecto al corte 1 (62.48%) y corte 3 (65.63%) (Figura 24).

El contenido de fibra dietética en hojas de *C. retusa* es menor que en *C. longirostrata* y esto se observa en todos los cortes, con una tendencia a incrementarse del corte 1 al corte 3.



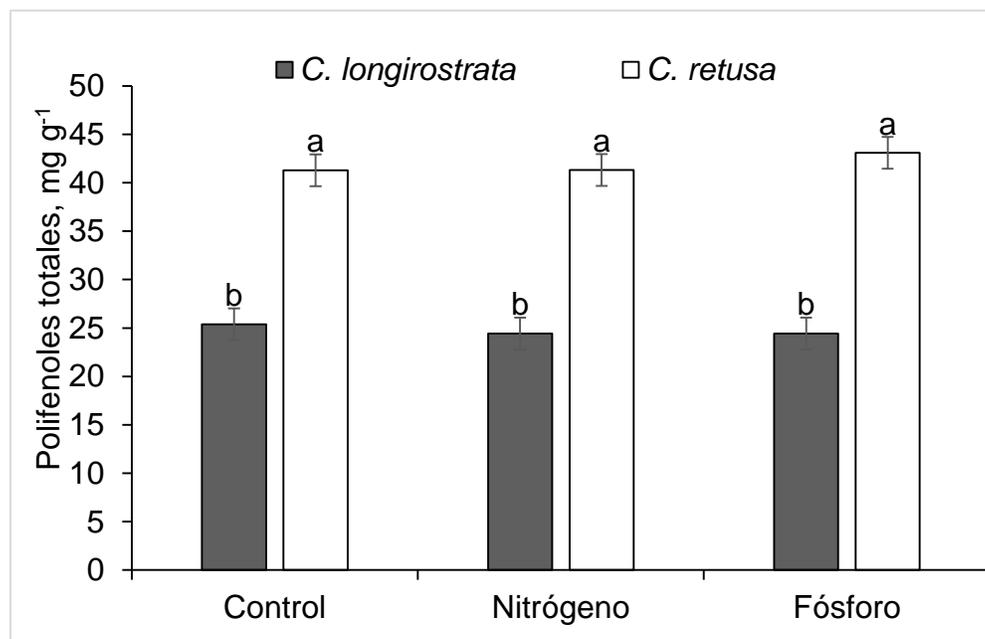
**Figura 24.** Efecto del corte en el contenido de fibra dietética total de hojas de *C. longirostrata* y *C. retusa*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ )

### Polifenoles totales

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que participan en los mecanismos de defensa contra plagas y depredadores, pero también pueden ser inhibidores del proceso germinativo (Teixeira *et al.*, 2016). El contenido de estos compuestos varía en las plantas y frutos debido al genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento. Además, son componentes importantes de la dieta humana, aunque no se consideren como nutrientes, debido a sus propiedades antioxidantes y de protección contra enfermedades cardiovasculares (Quiñones *et al.*, 2012; Valencia-Avilés *et al.*, 2017).

Entre especies, las hojas de *C. retusa* presentaron significativamente el mayor contenido de polifenoles totales (41.89%) respecto al registrado en hojas de *C. longirostrata* (24.73%), y no se observa efecto de fertilización (Cuadro 19, Figura 25).

La interacción corte\*especie para polifenoles totales fue significativa (Cuadro 18).

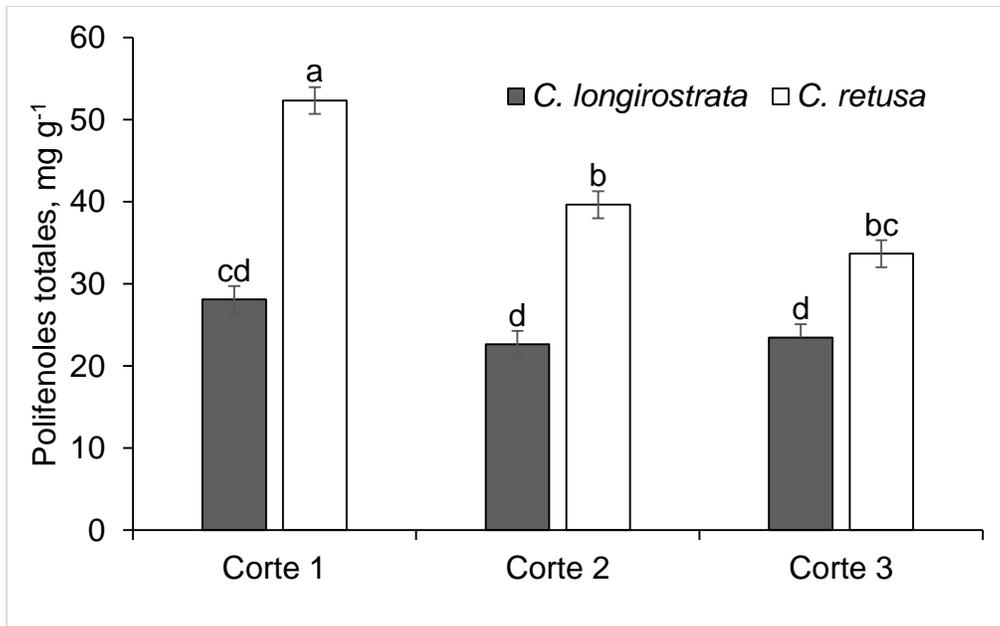


**Figura 25.** Efecto de fertilización en el contenido de polifenoles totales en hojas de *C. longirostrata* y *C. retusa*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ )

La Figura 26 muestra que el contenido de polifenoles disminuye significativamente por efecto del corte solo en *C. retusa*, pasando de 52.34 mg g<sup>-1</sup> en el corte 1 a 33.69 mg g<sup>-1</sup> en el corte 3. En *C. longirostrata* no se observa efecto significativo del corte. La interacción especie\*fertilización tampoco fue significativa (Cuadro 18).

Los contenidos de polifenoles totales cuantificados en las especies de *Crotalaria* en estudio son altos en comparación con los cuantificados en fresco en *C. longirostrata* por Jiménez-Aguilar y Grusek (2015) quienes determinaron contenidos de 2.68 a 2.76 mg g<sup>-1</sup> PF.

Los contenidos de polifenoles observados en las hojas de *Crotalaria* son inferiores a los de 13 genotipos de *Vicia faba*, evaluados por Chaieb *et al.* (2011), cuyos rangos variaron en la fase vegetativa de (117.81 a 157.68 mg g<sup>-1</sup> PS) y en la etapa reproductiva de (92.85 a 151.04 mg g<sup>-1</sup> PS) (Chaieb *et al.*, 2011).



**Figura 26.** Efecto del corte en el contenido de polifenoles totales en hoja de *C. longirostrata* y *C. retusa*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE SEMILLAS DE CUATRO ESPECIES DE *Crotalaria*

En el Cuadro 20, se muestra el efecto de la especie en los contenidos de proteína y ceniza en semillas de *C. longirostrata*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. El efecto de especie es significativo para ambas variables.

**Cuadro 20.** Cuadrados medios para el contenido de proteína y ceniza en semillas de cuatro especies de *Crotalaria* en estudio

Factor de variación	gL	Proteína	Cenizas
Especie	3	126.7**	1.67**
Error	8	5.4	0.11

gL= grados de libertad, \*\*= $P < 0.01$

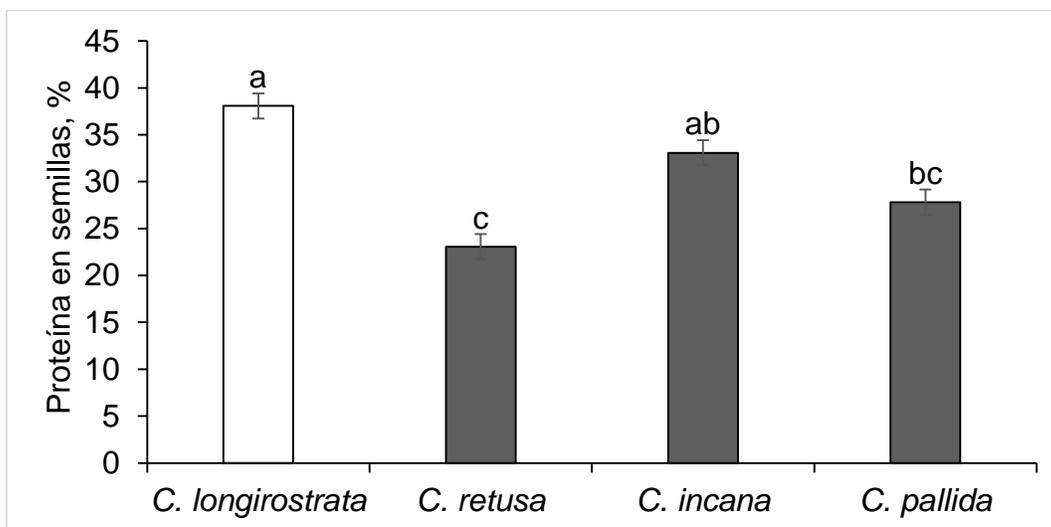
La prueba de medias muestra que el contenido de proteína fue mayor en *C. longirostrata* (38.09%) y en *C. incana* (33.07%), siendo *C. retusa* quien mostró los contenidos más bajos (Cuadro 21 y Figura 27). Otros autores como Arias *et al.* (2003) encontraron que efectivamente las semillas de *C. longirostrata* contienen altos niveles de proteína con valores de 29.8%, similares a los registrados en semillas de lupino que van de 32.5 a 43.5% (Pablo-Pérez *et al.*, 2015), aunque más bajos a los observados en soya que van de 48.6 a 57.0% (Wee *et al.*, 2017).

En semillas de chipilín recolectadas en Tabasco por Juárez-Fuentes *et al.* (2013) los contenidos de proteína fueron de 29.8%, en promedio.

**Cuadro 21.** Medias del contenido de proteína y de ceniza en semillas de cuatro especies de *Crotalaria* en estudio.

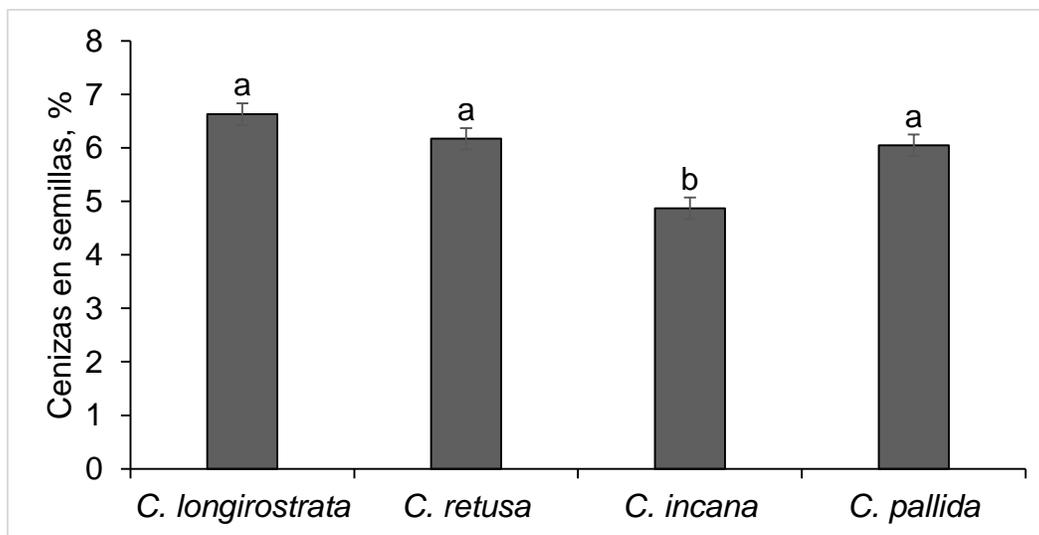
Especie	Proteína %	Cenizas
<i>C. longirostrata</i>	38.09 a	6.63 a
<i>C. incana</i>	33.07 ab	4.87 b
<i>C. pallida</i>	27.81 bc	6.05 a
<i>C. retusa</i>	23.06 c	6.17 a

Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 27.** Porcentaje de proteína en semillas de cuatro especies de *Crotalaria*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ )

Para cenizas las especies *C. longirostrata*, *C. retusa* y *C. pallida* presentan los más altos contenidos no mostrando diferencias entre ellas, y *C. incana* el más bajo valor (4.87%) (Figura 28).



**Figura 28.** Contenido de cenizas (%) en semillas de cuatro especies de *Crotalaria*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

El contenido de cenizas de las semillas de *C. longirostrata*, *C. retusa* y *C. incana* indican un mayor contenido de minerales, este contenido fue más alto en

comparación a las de cuatro especies mexicanas de lupinos, donde el contenido de cenizas varió de 4.3 a 6.3 g 100 g<sup>-1</sup> (Pablo-Pérez *et al.*, 2015), y en *Lupinus mexicanus* de 3.84 a 4.53 g 100 g<sup>-1</sup> (Valdés *et al.*, 2017).

El análisis de varianza para grasa cruda, azúcares solubles totales, polifenoles totales y fibra dietética mostró efecto significativo para la especie, con excepción de azúcares solubles totales (Cuadro 22).

**Cuadro 22.** Cuadrados medios del análisis de varianza para los contenidos de grasa cruda, azúcares solubles, polifenoles totales y fibra dietética en semillas de cuatro especies de *Crotalaria*.

Factor de variación	gL	Grasa cruda	Azúcares solubles totales	Polifenoles totales	FDT
Especie	3	6.93*	1.79NS	337.97**	384.76**
Error	4	0.60	1.00	7.84	11.82

FDT=fibra dietética total. gL= grados de libertad, \*= $P<0.05$ , \*\*= $P<0.001$ , NS= No significativo

Entre especies, solo se observa diferencia significativa para el contenido de grasa cruda entre las semillas de *C. longirostrata* y *C. pallida* (Cuadro 22). Estos contenidos son mayores a los observado en especies de lupino (5.4 a 7.5%) (Pablo-Pérez *et al.*, 2015; Valdés *et al.*, 2017).

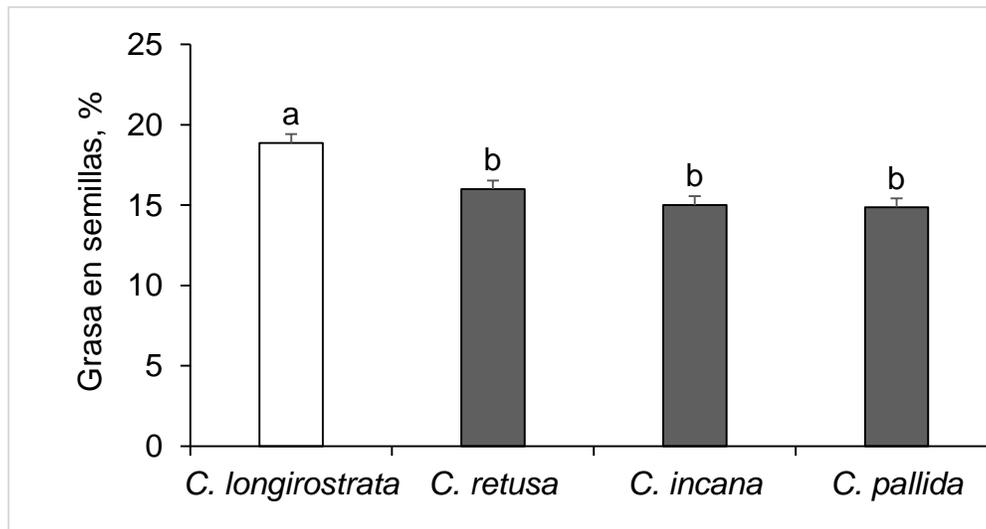
**Cuadro 23.** Medias para grasa cruda, azúcares solubles totales, polifenoles totales y % fibra dietética total en semillas de cuatro especies en estudio.

Especies	Grasa cruda, %	Azúcares solubles totales, g 100g <sup>-1</sup>	Polifenoles totales, mg g <sup>-1</sup>	Fibra dietética total, %
<i>C. longirostrata</i>	18.87 a	0.53 a	42.66 ab	22.86 b
<i>C. retusa</i>	15.99 ab	1.75 a	48.65 a	22.46 b
<i>C. incana</i>	15.01 b	0.13 a	32.39 b	46.78 a
<i>C. pallida</i>	14.87 b	2.10 a	18.97 c	14.82 b

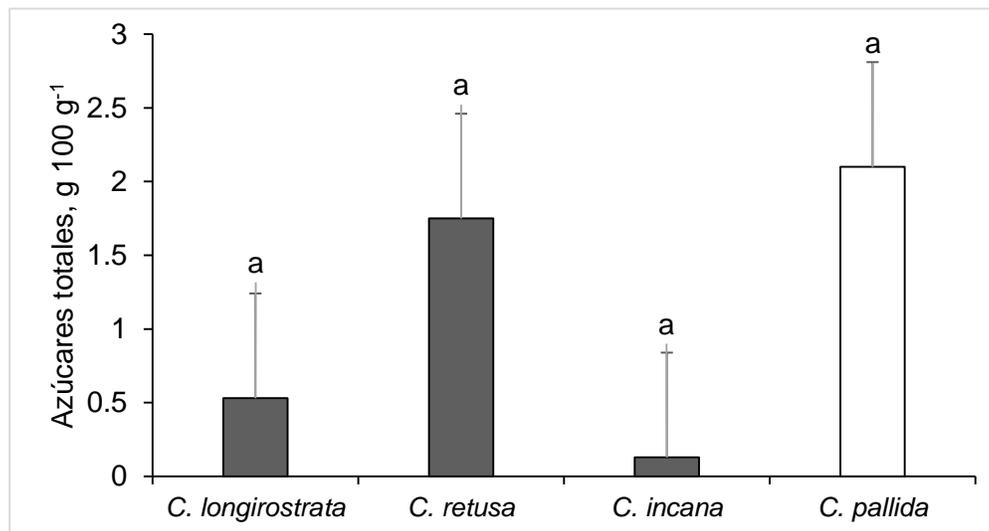
Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P\leq 0.05$ ).

Para polifenoles totales, los mayores contenidos se observaron en las semillas de *C. longirostrata* y *C. retusa* (42.66 y 48.65 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente), en contraste *C. pallida* presentó el menor contenido (18.97 mg g<sup>-1</sup>) (Cuadro 23). El rango de variación observado para polifenoles totales en leguminosas va de 0.2 mg g<sup>-1</sup> PS en la testa de garbanzo a 1337 mg g<sup>-1</sup> PS en semillas inmaduras de haba (Singh, *et al.*, 2017).

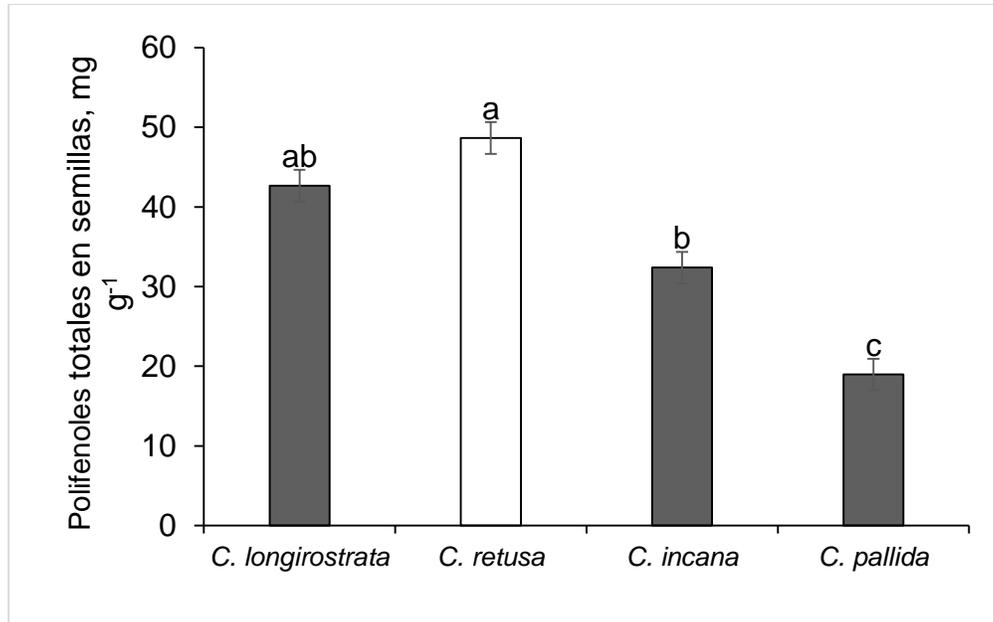
El contenido de fibra dietética total más alto se observó en semillas de *C. incana* (46.7%). Las otras especies de *Crotalaria*, mostraron contenidos significativamente menores (Figuras 29, 30, 31 y 32). En semillas de frijol verde (*Macrotyloma uniflorum*) el contenido de fibra dietética es de 28.8% y en harina de frijol verde de 16.3% (Bhartiya *et al.*, 2015).



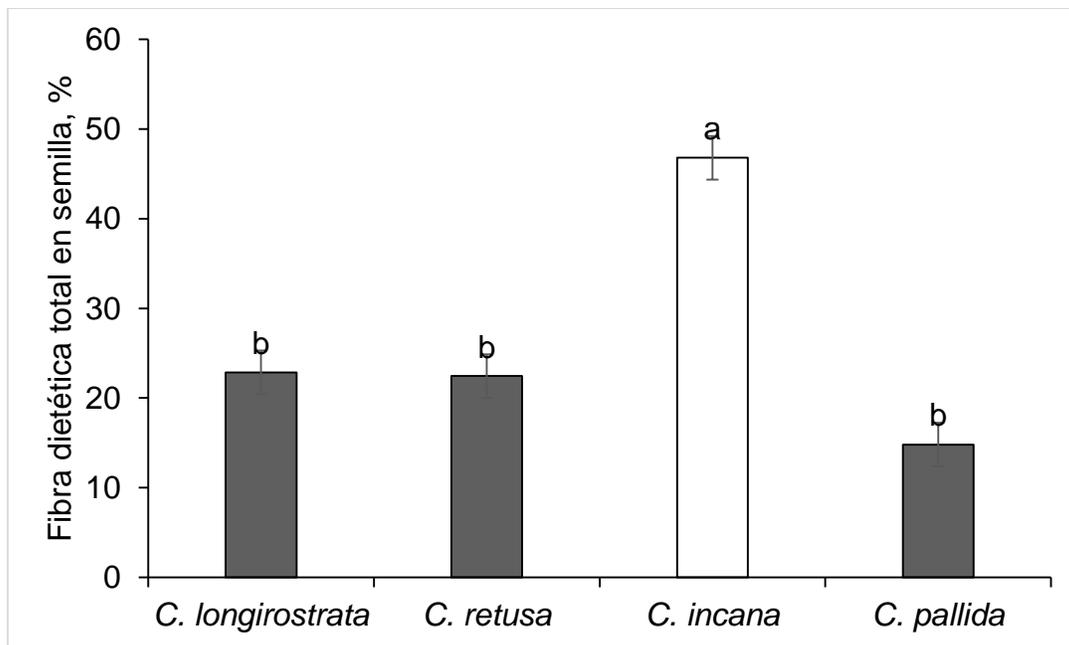
**Figura 29.** Contenido de grasa cruda en *C. longirostrata*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 30.** Contenido en azúcares solubles totales en semillas de *C. longirostrata*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 31.** Contenido de polifenoles totales en semillas de *C. longirostrata*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 32.** Contenido de fibra dietética total (%) en semillas de *C. longirostrata*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. Las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

De acuerdo a los resultados observados y las hipótesis postuladas se concluye:

- a. Los cortes mensuales sucesivos realizados al follaje en las especies de *Crotalaria* en estudio disminuyeron la longitud, el diámetro y la relación hoja:tallo; mantuvieron el contenido de proteína en hojas. En *C. longirostrata* el área foliar de los rebrotes se mantuvo y la biomasa total y foliar de los rebrotes, tasa relativa de crecimiento, y el número de nódulos se incrementaron.
- b. *C. longirostrata* mostró una mayor capacidad de rebrote que *C. retusa*, al incrementar el número de rebrotes por planta por efecto de los cortes sucesivos al follaje.
- c. Los cortes sucesivos a follaje no afectaron la concentración de clorofilas en ambas especies, pero si la de carotenoides y el NDVI, los que disminuyeron por efecto del corte solo en *C. longirostrata*.
- d. La relación entre NDVI y la biomasa total y foliar de los rebrotes es positiva y alta. Esta relación es negativa y alta con clorofila a. No se observó relación con la concentración de carotenoides.
- e. El efecto de la fertilización solo fue significativo para el diámetro del tallo, donde los tratamientos sin fertilización y con fertilización fosfatada presentaron el mayor diámetro de tallos y con la fertilización nitrogenada el menor.
- f. La fertilización disminuyó la biomasa de raíz solo en *C. longirostrata*; pero afectó negativamente la nodulación en ambas especies, principalmente con la fertilización nitrogenada.
- g. El efecto de la fertilización fue no significativo para el contenido de grasa, cenizas, azúcares reductores y polifenoles totales. La fertilización fosfatada disminuyó el contenido de fibra dietética solo en hojas de *C. longirostrata*.

- h. El contenido de proteína varió en función de la especie. *C. retusa* incrementó los contenidos de proteína en hojas con la fertilización nitrogenada. Entre especies, *C. longirostrata* presentó contenidos más altos de proteína, de cenizas y de fibra dietética que *C. retusa*.
- i. La composición química de las semillas difiere entre especies de *Crotalaria*. *C. longirostrata* contiene mayor cantidad de proteína, cenizas, grasa y polifenoles totales en semillas que *C. incana* y *C. pallida*. *C. pallida* y *C. incana* presentaron los niveles más altos de azúcares solubles totales y fibra dietética.
- j. Este es el primer estudio en México que muestra que el manejo del follaje de Chipilín mejora el rendimiento de biomasa foliar sin afectar su calidad.

## 5.2. Recomendaciones

Otros estudios son necesarios para proponer el cultivo de chipilín como una alternativa sustentable para su producción comercial como un alimento proteico inocuo. En las líneas de investigación de fisiología vegetal y en colaboración con otros equipos de trabajo multidisciplinarios se contemplan estudios que abarcan:

- a) ensayos con diferentes intervalos de corte,
- b) respuesta a diferentes dosis de fertilización inorgánica y orgánica,
- c) tipo de suelo, el control orgánico de plagas y enfermedades,
- d) efectos de diferentes niveles de sombreado,
- e) el efecto de estos estudios en la concentración de compuestos nutricionales y alcaloides pirrolizidínicos;
- f) además de estudios de digestibilidad, degradación de la proteína y aumento de peso en animales.

Cuando esto se logre y se compruebe la inocuidad como alimento proteico, se podrá promover su cultivo comercial y utilizarse en la industria alimenticia. Así mismo, podrá ser empleada en el procesado de harina para productos como panes y galletas nutritivas, como suplemento proteico para humano y en alimentación animal.

## CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA

- Acevedo-Rodríguez, P. 1996. Flora of St. John, U.S. Virgin Islands. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 78:1-581.
- Acevedo-Rodríguez, P., and M. T. Strong. 2012. *Catalogue of the Seed Plants of the West Indies*. Smithsonian Contributions to Botany. 98:1192 pp. Washington DC, USA: Smithsonian Institution. <http://botany.si.edu/Antilles/WestIndies/catalog.htm>
- Aguilar, V. M., D. Kolb, D. Hernández, T. Urquiza, y P. Koleff. 2008. Prioridades de conservación de la biodiversidad marina en México. *CONABIO. Biodiversitas*. 79: 1-15.
- Alderete-Chávez, A., L. Aguilar-Marín, N. de la Cruz-Landero, J. J., Santos-Guerra, R., B. E. Guevara, and R. Gelabert, 2010. Effects of scarification chemical treatments on the germination of *Crotalaria retusa* L. seeds. *Biological Sciences*. 10(6):541-544.
- Alalade, J. A., J. A. Akinlade, A. A. Akingbade, C. B. Emiola, I. A. Adebisi. 2019. Proximate Composition and Phytochemical Screenings of *Crotalaria retusa* Leaves and Seeds. *Library Journal*. 6(01): 1-9.
- Altieri, M.A., 1999. 'Applying agroecology to enhance productivity of peasant farming systems in Latin America'. *Environment, Development and Sustainability* 1: 197-217.
- Altieri, M.A., 2002. 'Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments'. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93: 1-24.
- Anim, T. M., C. Larbie, R. Appiah-Opong, I. Tuffour, K. O. Baffour-Awuah and A. Aning. 2016. Phytochemical, antioxidant and cytotoxicity of hydroethanolic extracts of *Crotalaria retusa* L. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 5(2):162-179.

- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, volume II.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists 18th Edition, Washington. D. C. U. S. A.
- Arias, L., H. Losada, A. Rendón, D. Grande, J. Vieyra, R. Soriano, J. Rivera, y J. Cortés. 2003. Evaluation of Chipilín (*Crotalaria longirostrata*) as a forage resource for ruminant feeding in the tropical areas of Mexico. *Livestock Research for Rural Development*. 15(4):1-4.
- Avendaño, N. 2011. Revisión taxonómica del género *Crotalaria* L. (*Faboideae Crotalarieae*) en Venezuela. *Acta Bot. Venez.* 34(1):13-78.
- Ayala-Herrada, L., M. Villafaña-Cruz, B. Pinacho-Lopez, J. Arroyo-Ledezma, y H. Magaña-Sevilla. 2010. Escarificación de semillas de *Indigofera hirsuta* (Linneaus), *Canavalia maritima* (Thouars) y *Crotalaria longirostrata* (Hook). *Rev. Fac. Agron.* 27: 433-446.
- Baldissera, C. T., E. Frak, C. P. C. Faccio, and G. Louarn. 2014. Plant development controls leaf area expansion in alfalfa plants competing for light. *Annals of Botany*. 113: 145–157.
- Bhatt, K. C.A., Pandey, P. O., Dhanwa, S. N., Panwar and Bhandari, C. 2009. Tumthang (*Crotalaria tetragona* Roxb ex And.) a Little known wild edible species in the northeastern hill región of India, *Genet. Resour. Crop Evol.* 56: 729-733.
- Bautista-Cruz, A., M. R. Arnaud-Viñas, G. A. Martínez-Gutiérrez, P. S. Sánchez-Medina, and P. R. Pérez. 2011. The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, Mexico. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(15):3404-3411.
- Bengtsson J. J. Ahnström and A. C. Weibull. 2005. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*. 42(2):261 - 269

- Bhartiya, A., J. P. Aditya, and L. Kant. 2015. Nutritional and remedial potential of an underutilized food legume horsegram (*Macrotyloma uniflorum*): a review. *Journal of Animal & Plant Sciences*. 25(4): 908-920.
- CABI. 2016. *Crotalaria retusa*. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. Consultado en marzo 2019 en <http://www.cabi.org/isc/datasheet/87408>.
- Camarillo, F. R. C. 2014. Evaluation the nitrogen needs and efficiency of *Rizhobia* strains to provide nitrogen to chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. and Arn.). Masters. paper 974.
- Castaneda, N. B.C. 2017. Aspectos químicos y bioactivos de dos matrices naturales originarias de El Salvador: "chipilín y tonquiue". Projeto apresentado ao Instituto Politécnico de Bragança e to the University of Salamanca to obtain grau de Mestre in Pharmacy and Chemistry of Natural Products. Pág. 1-96.
- Castillo, M. 1991. Efecto de cuatro frecuencias de corte en chipilín (*Crotalaria longirostrata*) sobre el rendimiento foliar y el de proteína. Guatemala. USAC. pág. 70.
- Castro-Lara, D., R. Bye-Bottler, F. Basurto-Peña, L.M. Mera-Ovando, J. Rodríguez-Servín, J. Álvarez-Vega, L. J. Morales, y A. Caballero-Roque. 2014. Revalorización, conservación y promoción de quelites. Una tarea conjunta. *Agroproductividad*. 7:8-12.
- Centurión, H. D., J. C. Cázares y M. J. Espinosa. 2004. Inventario de recursos filogenéticos alimentarios de Tabasco. Colección José Ma. Pino Suárez. *Estudios Regionales y de Desarrollo*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. pág.195
- Cervantes Reza, F. A. 1999. Distribución, abundancia y hábitat de la liebre endémica *Lepus flavigularis*. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. H084. México D. F.

- Chaieb, N., J. L. González, M. López-Mesas, M. Bouzlama, M. Valiente. 2011. Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia. *Food Research International*. 44:970–977
- Chulim, A.R., L.M.C. Ventura-Canseco, P.E. Álvarez-Gutiérrez, F.A. Gutiérrez-Miceli, M. Abud-Archila. 2018. Vegan bread added with *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG and flour of *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* and *Moringa oleifera*. *Agroproductividad*. 11 (7): 121-127.
- Cobon, N. 1988. Caracterización agronómica, morfológica y bromatológica de 27 cultivares de Chipilín (*Crotalaria* spp.) nativos de Guatemala, en San Miguel Panan, Suchitepequez. Guatemala. Guatemala. USAC. 107 pág.
- Couto, N. 2008. Nitrogen fixation research progress. New York: Nova Science Publishers. XVI. 493 p.
- Dahl, J. W. y L. M. Stewart. 2015. Health Implications of Dietary Fiber. Dietitians in Integrative and Functional Medicine dietetic practice group. *Journal of the academy of nutrition and dietetic*. 115(11): 2212-2672.
- Doignon-Bourcier, F., A. Willems, R. Coopman, G. Laguerre, M. Gillis and P. Lajudie. 2000. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulation small Senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Appl Environ Microbiol*. 66(9):3987–3997.
- Domínguez-Pérez, F., E. Bolaños-Aguilar, L. Lagunes-Espinoza, S. Salgado-García, J. Ramos-Juárez, J. Guerrero-Rodríguez. 2017. Rendimiento de materia seca y concentración de fósforo de una asociación *Brachiaria humidicola*-*Stylosanthes guianensis*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8(8): 1705-1717.
- Dreger, M., M. Stanislawski, A. Krajewska-Patan, S. Mielcarek, P. L. Mikolajczak, and W. Buchwald. 2009. Pyrrolizidine alkaloids – chemistry, biosynthesis,

- pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage. *Herba Polonica*. 55(4): 128-147.
- Du, Y. M., J. Tian, H. Liao, C. J. Bai, C. J. Yan, and G. Liu. 2009. Aluminium tolerance and high phosphorus efficiency helps *Stylosanthes* had better adapt to low-P acid soils. *Annals Bot.* 103(8):1239-1247.
- Dun, E. A., B. J. Ferguson, C. A. Beveridge. 2006. Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or Divergent mechanisms? *Plant Physiology*. 142: 812–819.
- Edgar, J. A., J. M. Molyneux and S. M. Colegate. 2015. Pyrrolizidine alkaloids: potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease. *Chemres toxicol.* 28(1): 4-20.
- EFSA. 2007. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*. 447:1–50.
- Elika. 2013. Sustancias indeseables/ alimentación animal. Alcaloides pirrolizidínicos. Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. 1-6.
- FAO. 2017. Biodiversidad para la seguridad alimentaria y la nutrición: 30 años de la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/es/c/174210/>. Consultado el 12 de marzo de 2017.
- Fernández, S, R., LA. C. Morales, A. G. Mariscal. 2013. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(3):275-283.
- Flora Digital: Península de Yucatán. 2010. Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales. Consultado el 09 de abril de 2019 en [https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha\\_virtual.php?especie=1586](https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1586).

- Garduza-Acosta, B., LC. Lagunes-Espinoza, CC. Bautista-Muñoz, G. García-de-los-Santos, JM. Zaldívar-Cruz, y A. Hernández-Flores. 2018. Germinación de semillas de *Crotalaria* y *Lupinus* (Fabaceae) sometidas a diferentes tratamientos de pre-germinación y su efecto sobre la actividad enzimática durante la germinación temprana. Revista Brasileña de Biología. Epub 18 de abril de 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/1519-6984>.
- Guo, Q., J. I. Kang, Y. Bal. F. Xu. 2018. Fibra dietética: química, estructura y propiedades. Hindawi. Revista de química. 1328797:2. <https://doi.org/10.1155/2018/1328797>
- Gweyi-Onyango, J.P., and M. Osei-Kwarteng. 2011. Safe vegetable production with wastewater in developing countries: demystifying the negative notions. Vegetable production with wastewater. Afr. J. Hort. Sci. 5:70-83.
- Hardisson, R. 1998. Hemoglobin's from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. Journal of Experimental Biology. 201:1099-1117.
- Heggo, A. M., and N. F. Barakah. 2004. Effects of inoculum densities of *Rhizobium meliloti* and different rates of nitrogen fertilizers on alfalfa plants grown in calcareous soil. J. King Saud Univ. Agric. Sci. 16 (2):161-170.
- Hernández, G.A., J. P. Pérez y V. A.G Hernández. 1992. Crecimiento y rendimiento de alfalfa en respuesta a diferentes regímenes de cosecha. Agrociencia. 2:131-144.
- Hogg, S. 2005. Microbiology essential. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex PO19 8SQ, 90 Tottenham Court Road, Londres W1T 4LP, Inglaterra. 1ª edición. p 481. [cs-books@wiley.co.uk](mailto:cs-books@wiley.co.uk)
- Hunt, S. 1996. Measurement of nitrogenase activity in N<sub>2</sub>-fixing nodules of soybean. In tested studies for laboratory teaching, proceedings of the 18th Workshop/Conference of the association for biology laboratory education (ABLE). J. C. Glase, 322(18):125-141.

- ILDIS, 2013. International Legume Database and Information Service. Reading, UK: School of Plant Sciences, University of Reading. <http://www.ildis.org/>
- Irmer, S., N. Podzun, D. Langel, F. Heidemann, E. Kaltenecker, B. Schemmerling, C. M. Geilfus, C. Zörb and D. Ober. 2015. New aspect of plant–rhizobia interaction: Alkaloid biosynthesis in *Crotalaria* depends on nodulation. PNAS. 112(13):4164-4169.
- Jaca, T., T. Nkonki, and G. Condy. 2013. *Crotalaria agatiflora* susp. *Agatiflora* Leguminosae. Flowering Plants of Africa. 63:44-49.
- Jiménez-Aguilar, D. M., and M.A. Grusak. 2015. Evaluation of minerals, phytochemical compounds and antioxidant activity of Mexican, Central American and African green leafy vegetables. Plant Foods Hum Nutr. 70:357-364. DOI 10.1007/s11130-015-0512-7.
- Jáuregui, C. M. E., C. M. Calvo y R. F. Pérez-Gil. 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. Archivos latinoamericanos de Nutrición. 61(3): 233-241.
- Juárez-Fuentes, B., L.C. Lagunes- Espinoza, M. Pablo-Pérez y E.D. Bolaños-Aguilar. 2013. Evaluación preliminar de la composición química de leguminosas tropicales nativas: *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. Y *Senna fruticosa* Mill. II Simposium Internacional sobre Producción Agroalimentaria Tropical y XXV Reunión Científica-Tecnológica y Agropecuaria Tabasco 2013. 5 y 6 de septiembre, Villahermosa, Tabasco. 213-220.
- Kabi, F and F.B. Bareeba. 2007. Herbage biomass production and nutritive value of mulberry (*Morus alba*) and *Calliandra calothyrsus* harvested at different cutting frequencies. Animal Feed Science and Technology. 140: 178-190.
- Kai-yun, X., L. Xiang-lin, H. Feng, Z. Ying-jun, W. Li-qiang, B. D. Hannaway, W. Dong, Q. Yan, G. M. A. Fadul. 2015. Effect of nitrogen fertilization on yield, N content, and nitrogen fixation of alfalfa and smooth bromegrass grown alone or in mixture in greenhouse pots. Journal of Integrative Agriculture. 14(9): 1864-1876.

- Kan, L., S. Nie, J. Hu, S. Wang, Z. Bai, J. Wang, Y. Zhou, J. Jiang, Q. Zeng, K. Song. 2018. Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chemistry*. 260: 317–326.
- Kessler, C. D. J., and M. H. Shelton. 2008. Dry-season legume forages to follow paddy rice in NE Thailand. III. Influence of time and intensity of cutting on *Crotalaria juncea*. *Experimental Agriculture*. 16(2): 207-214.
- Khan, R. A., S. Alam, S. Ali, S. Bibi and A. I. Khalil. 2007. Dietary fiber profile of food legumes. *Sarhad J. Agric.* 23:3.
- Kyei-Boahen, S., C. E.N., Savala, D. Chilkoeye y R. Abaldoo. 2017. Cowpea to inoculation and phosphorus fertilization in different environments. *Front. Plant Sci.* 8:646. Doi: 10.3389/fpls.2017.00646.
- Makkar, H.P.S. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p 101.
- Marschner, H. 2012. Mineral Nutrition of Higher Plant. 3 rd ed. Massachusetts: Elsevier Ed. 2012.
- Mejía, A. A. 1989. Evaluación agronómica de 10 cultivares de chipilín (*Crotalaria* spp.) bajo dos sistemas de siembra en dos localidades de la cuenca del río Achiguate Escuintla. Tesis Ing. Agr. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 50 p.
- Mendonça, E. H. M., and M. A. Schiavinato. 2005. Growth of *Crotalaria juncea* L. supplied with Mineral Nitrogen. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48(2): 181-185.
- Mitova, I., y I. Stancheva. 2013. Effect of fertilizer source on the nutrients biological uptake with garden beans production. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 19(5): 946-950.

- Monteiro, P. F. C., R. A. Filho, A. C. Xavier, R. O.C. Monteiro. 2012. Assessing biophysical variable parameters of bean crop with hyperspectral measurements. *Scientia Agricola*. 69(2): 87-94.
- Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophylls pigments extracted with N, N-Dimethylformamide. *Plant Physiol*. 69: 1376-1381.
- Morris, J. B., and S. E. Kays. 2005. Total Dietary Fiber Variability in a Cross Section of *Crotalaria juncea*. *Plant Genetic Resources.Sci.* 45:1826–1829. doi:10.2135/cropsci2004.0630.
- Morton, J. F. 1994. Pito (*Erythrina berteroana*) and chipilín (*Crotalaria longirostrata*), (Fabaceae), two soporific vegetables of Central America. *Economy Botany*. 48:130- 138.
- Näsholm, T., K. Kielland, U. Ganeteg. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol*. 182(1): 31-48.
- Ncube, N, S., A. J. Afolayan, A. I. Okoh. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*. 7(12): 1797-1806.
- Nobre, V.M.T., A.F.M. Dantas, F. Riet-Correa, JM. Barbosa-Filho, IM. Tabosa, JS. Vasconcelos. 2005. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon*. 45: 347-352.
- NOM-021-RECNAT-2000. 2002. Norma oficial mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. 31 de diciembre 2002. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>
- Nuhu, H. 1999. Pharmacognostic Evaluation and Toxicity Studies of Three *Crotalaria* Species (*Leguminosae*), Ph. D Thesis. Department of Pharmacognosy and Drug Development, Ahmadu Bello University Zaria. p 40.

- Nwude, N., and M.A. Ibrahim. 1980. Plants Used in Traditional Veterinary Practice in Nigeria. *J. Vet Pharmacology*. 3:261-272.
- Nwude, N., and O. O. Ebong. 1980. Some plants used in the treatment of leprosy in Africa. *Leprosy Review*.51 (1):11-18.
- Ohler, T. A., S.S. Nielsen., and C.A. Mitchell. 1996. Varying plant density and harvest time to optimize cowpea leaf yield and nutrient content. *HortScience*. 31(2): 193-197.
- Pablo-Pérez, M., LC. Lagunes-Espinoza, J. López-Upton, EM. Aranda-Ibáñez y J. Ramos-Juárez. 2015. Composición química de especies silvestres del género *lupinus* del estado de Puebla, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 38 (1): 49-55.
- Palacios, P. G., R. A. Caballero, G.P. Meza, R. P. Ayvar y M. M. Ruíz. 2017. Evaluación de galletas con base en chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) I.M. Johnst., *Euphorbiaceae*) y chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn, *Fabaceae*). *Lacandonia*. 10(2): 47 - 52.
- Palomino, G., y R. Vázquez. 1991. Cytogenetic studies in Mexican populations of species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoide). *Cytologie*. 56: 343-351.
- Pandey, A., R. Singh, S. K. Sharma., and D. C. Bhandari. 2010. Diversity assessment of useful *Crotalaria* species in India for plant genetic resources management. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57: 461-470.
- Pérez, A. M., A. M.S. Sousa, F. H. Chiang y P. Tenorio. 2005. Vegetación terrestre. 4:65-110. En Bueno J. F. Alvarez y S. Santiago (eds). *Biodiversidad del estado de Tabasco*. Instituto de Biología, UNAM-CONABIO. México. p. 386.
- Pérez, B. M. T., A. G. Hernández, J. P. Pérez, J. G.H. Herrera y R. G. Barcena. 2002. Respuesta productiva y dinámica de rebrote del pasto ballico perenne a diferentes alturas de corte. *Téc Pecu Méx.* 40: 251-263.

- Pérez-Cornelio, B. A. 2016. Concentración de proteína y alcaloides totales en *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn., durante su crecimiento. Tesis Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, UPCH, H. Cárdenas, Tabasco, México. 50 pág.
- Pérez-Cornelio, B. A., L. C. Lagunes-Espinoza, E. C. Villarreal-Ibarra, G. I. Bolio, E. D. Bolaños-Aguilar, M. Hernández-Villegas. 2016. Acumulación de biomasa, concentración de proteína y alcaloides totales en chipilín durante su crecimiento. En: Innovación Tecnológica para la Seguridad Alimentaria. J. Martínez H., M. A. Ramírez-Guillermo, J. Cámara-Córdova (eds). Primera edición. Villahermosa, Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. pp. 9-13.
- Pietrarelli, L., J. L. Zamar, H. L. Leguía, E. E. Alessandria, J. Sánchez, M. Arborno y S. M. Luque. 2008. Efectos de diferentes prácticas de manejo en la nodulación y en el rendimiento del cultivo de soja. *Agriscientia* XXV. (2): 81-87.
- PROTA4U, 2013. PROTA4U web database. Grubben GJH, Denton OA, eds. Wageningen, Netherlands: Plant Resources of Tropical Africa. <http://www.prota4u.org/search.asp>.
- Quiñones, M., M. Miguel., y A. Aleixandre. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1): 76-89.
- Rehm, S. 1994. Multilingual dictionary of agronomic plants. (Dict Rehm) <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?12340>. Consultado: 26/03/2017 11:10 pm.
- Reyes-Agüero, J.A., C. López-Palacios, M. E. Romero-Hernández, H. M. Ramírez-Tobías, C. Michel-Cuello. 2018. Polisacáridos estructurales y fibra dietética en brotes florales (tunitas) de *nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick de diferente estadio de desarrollo. *Agrociencia*. 53: 605-616.

- Richards, J. H y M. M. Caldwell. 1985. Soluble carbohydrates, concurrent photosynthesis and efficiency in regrowth following defoliation: a field study with agropyron species. *Journal of Applied Ecology*. 22(3): 907-920.
- Rodríguez, C. F., L. T. Ramos, R. C. M. Vargas, F. C. Olguín, G. Ayala, M. L. A. Adriano y S. M. Figueroa. 1998. Efecto del extracto acuoso del chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook y Arn) en el sueño de la rata. *Quehacer Científico en Chiapas*. 1(2): 47:58.
- Salemaa, M., and R. Sievänen. 2002. The effect of apical dominance on the branching architecture of *Arctostaphylos uva-ursi* in four contrasting environments. *Flora*. 197: 429-442.
- Sánchez-Blanco, J. Sánchez-Blanco, C. Sousa, M. S, F. J. Espinosa-García. 2012. Assessing introduced leguminosae in Mexico to identify potentially high impact invasive species. *Acta Botánica Mexicana*. 100:41-77.
- Schoental, R and M.A. Head. 1995. (Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline). *British Journal of Cancer*. 9(1): 229–237.
- Singh, B., J. P. Singh, A. Kaur, N. Singh. 2017. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*. 101:1-16.
- Shafritz, D. A. 2015. Hepatic progenitor cell transplantation: relevant models and mechanisms. Chapter 20. In *liver regeneration*. P. 279-298. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124201286000208>
- Skalsky, A. S., J. J. Jacobs, D. J. Menkhous and W. B. Stevens. 2008. Impact of fuel and nitrogen prices on profitability of selected crops: A case study. *Agronomy Journal*. 100(4): 1161-1165.
- Sofowora, A. 1993. *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*. University of Ife press 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons, New York. pp.320.

- Sotelo, A., R. M. Argote, L. Cornejo, S. Escalona, M. Ramos, A. Nava, D. Palomino y O. Carreón. 2008. Medición de fibra dietética y almidón resistente: reto para alumnos del Laboratorio de Desarrollo Experimental de Alimentos (LabDEA). *Educación química*. 19(1): 42-49.
- Soto-Estrada, C. 2004. Flora del valle de Tehuacán- Cuicatlán. Fascículo 40. *Crotalariaeae*. Departamento de Botánica. Instituto de Biología. UNAM. México, D. F. 29.
- Srinivas, N, K.S. Sandeep, Y. Anusha, B.N. Devendra. 2014. (In vitro cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline alkaloid: an in silico approach). *International Invention Journal of Biochemistry and Bioinformatics*. 2(2): 20-29.
- Storey, M and P. Anderson. 2014. Income and race/ethnicity influence dietary fiber intake and vegetable consumption *Science Direct. Nutrition research*. 34(10): 844-850.
- Sy, A., E. Giraud, R. Samba, P. Lajudie, M. Gillis and B. Dreyfus. 2001. Certain legumes of the genus *Crotalaria* are specifically nodulated by a new species of *Methylobacterium*. *Canadian Journal of Microbiology*. 47(6): 503–508.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Publisher: Sinauer Associates. USA. 690 p.
- Teixeira, J., A. B. Aparcana, I. IM. Villarreal, L. LS. Ramos, C. E. Calixto, Hurtado, M. MR., Acosta, A. PE., Katherin, M.C. 2016. Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 82(3): 272- 279.
- Trabulsi, I. Y., and E. M. Abed. 1986. Effect of nitrogen fertilizer on the nodulation of Soybean and alfalfa. *Bull. Fac. Agric. Univ. Cairo*. 37: 845-853.

- USDA-ARS, 2013. Germplasm Resources Information Network (GRIN). Online Database. Beltsville, Maryland, USA: National Germplasm Resources Laboratory. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysearch.aspx>.
- USDA-NRCS, 2013. The PLANTS Database. Baton Rouge, USA: National Plant Data Center. <http://plants.usda.gov/>.
- Valencia-Avilés, E., I. Ignacio-Figueroa, E. Sosa-Martínez, M. C. Bartolomé-Camacho, H. E. Martínez-Flores, M.E. García-Pérez. 2017. Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. Facultad de químico- Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Tzinzuntzan 173. Col Matamoros. Morelia, Michoacán, México.
- Valdés M. E, A. López-Espinoza, A.G. M. Martínez, J.F. N. Zamora, R. M. Rodríguez, M.A. Ruiz-Lopez. 2017. Iron bioavailability of *Lupinus rotundiflorus* seeds and roots in low-iron-diet treated rats. *Rev. Nutri., Campinas*. 30(6):827-834.
- Velásquez-Valle, R., M. Reveles-Hernández, y L.R. Reveles-Torres. 2017. Identificación de enfermedades causadas por hongos en cultivos de Aguascalientes, Durango y Zacatecas. Folleto técnico. Núm. 90. Campo Experimentatl Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. pp.86.
- Verhulst, N., B. Govaerts, M. P. Fuentes 2010. Sensor portátil GreenSeekerTM para la medición del índice diferencial de vegetación normalizado (NDVI): Una herramienta para la evaluación integral de las prácticas agronómicas. Parte A: Conceptos y estudios de caso. México, D.F.; CIMMYT. <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/560/94511.pdf>
- Villaseñor, R., J. L., y G. F.J. Espinosa, 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

- Villegas, Y., A. G. Hernández, P. A.H. Martínez, J. P. Pérez, J. G.H., Herrera y C. C. López. 2006. Rendimiento de forraje de variedades de alfalfa en dos calendarios de corte. *Rev Fitotecnia Mex.* 29: 369-372.
- Wagner, W.L., D.R. Herbst, S.H. Sohmer. 1999. *Manual of the flowering plants of Hawaii*. Revised edition. Honolulu, Hawai'i, USA: Bishop Museum Press. 1919 pp.
- Wahab, A. M. A y M. H. Abd-Alla. 1996. Effect of different rates of n-fertilizers on nodulation, nodule activities and growth of two field-grown cvs, of soybean. *Fertilizer research* 43: 37-41
- Walter, A., F. Liebisch, A.Hund. 2015. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. *Plant Methods.* 11:14. DOI 10.1186/s13007-015-0056-8.
- Wee, Chi-Do., M. Hashiguchi, G. Ishigaki, M. Muguera, C. Oba, J. Abe, K. Haradz., and R. Akashi. 2017. Evaluation of seed components of wild soybean (*Glycine soja*) collected in Japan using near-infrared reflectance spectroscopy. *Plant Genetic Resources: Characterization.* 16(2): 94–102.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology.* 144: 307-313.
- Williams, C. M., and R. J. Molyneux. 1987. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria seeds*. *Weed Science.* 35: 476-481.
- Xie, K.-Y., X.-L. Li, Y.J. Zhang, L. Q. Wan, H. David, D. Wang, Y. Qin, M .A. Fadul-Gamal. 2015. Effect of nitrogen fertilization on yield, N content, and nitrogen fixation of alfalfa and smooth brome grass grown alone or in mixture in greenhouse pots. *Journal of Integrative Agriculture.* 14(9): 1864-1876.
- Yashim, S.M., S.B. Abdu y M. Hassan. 2012. Effect of processing methods on the degradability of rattlebox (*Crotalaria retusa*) plant in Yankasa rams, *Journal of Applied Animal Research.* 40(2): 97-101.

Yemm, E. W., and J. A. Wills. 1954. Estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*. 57(3): 508-514.

Zhu, Y. P., C. C. Sheaffer, P. M. Russelle, P. C. Vance. 1996. Dinitrogen fixation of annual *Medicago* species. In: North America alfalfa improvement conference, 35. Oklahoma City, 1996.