

# RENDIMIENTO, CONTENIDO MINERAL Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FRIJOL CAUPÍ BIOFORTIFICADO CON COMBINACIONES DE SULFATOS DE HIERRO Y ZINC

## YIELD, MINERAL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COWPEA BEANS BIOFORTIFIED WITH COMBINATIONS OF FERROUS AND ZINC SULFATES

Moisés Guillén-Molina<sup>1</sup>, Efraín de la Cruz-Lázaro<sup>1</sup>, Esteban Sánchez-Chávez<sup>2</sup>, José Rodolfo Velázquez-Martínez<sup>1</sup>, Rodolfo Osorio-Osorio<sup>1</sup>, César Márquez-Quiroz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. km 25. Carretera Villahermosa-Teapa, Villahermosa, Tabasco, México. C.P. 86280. (cesar\_quiroz23@hotmail.com). <sup>2</sup>Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, AC. Delicias, Chihuahua, México. C.P. 33088.

### RESUMEN

La deficiencia de microelementos puede disminuir el rendimiento de las leguminosas, segundo alimento más importante para el consumo humano. Para contrarrestar deficiencias de hierro (Fe) y zinc (Zn) en los cultivos básicos se aplican técnicas agronómicas de fertilización, las cuales son importantes en los cultivos tradicionales. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en combinación con sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) sobre el rendimiento, contenido mineral y actividad antioxidante de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) biofortificado. La hipótesis fue que al menos una combinación de estos compuestos mejora el rendimiento y la calidad nutricional del frijol. El diseño experimental fue completamente al azar en arreglo factorial con tres repeticiones. El primer factor fue dosis de aplicación de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fe1-Fe4: 0, 25, 50, 100  $\mu\text{M L}^{-1}$ ), y el segundo factor fue la dosis de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Zn1-4: 0, 25, 50, 100  $\mu\text{M L}^{-1}$ ). Dieciséis tratamientos resultaron, correspondientes a la combinación de niveles de los factores. La aplicación de los tratamientos aumentó el rendimiento ( $p \leq 0.05$ ) de 15.6 a 51.0%; también el contenido de Fe de 21.1 a 36.8%, el contenido de Zn de 1.1 a 12.7%. El contenido fenólico total de 1.8 a 30.5% y la actividad antioxidante de 1.5 a 35.2%. El estudio mostró que la biofortificación con sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc puede ser una alternativa para incrementar el rendimiento, contenido mineral y actividad antioxidante en el grano de frijol caupí.

### ABSTRACT

Deficiencies in micronutrients can reduce the yield of legumes, the second more important food for human consumption. To counteract iron (Fe) and zinc (Zn) deficiencies in staple crops, agronomic fertilization techniques are applied, which are important in traditional crops. The objective of this study was to evaluate the effect of the application of ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) in combination with zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) on yield, mineral content and antioxidant activity of biofortified cowpea beans (*Vigna unguiculata*). The hypothesis was that at least one combination of these compounds would improve bean yield and nutritional quality. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement with three replications. The first factor was  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  application rate (Fe1-Fe4: 0, 25, 50, 100  $\mu\text{M L}^{-1}$ ), and the second factor was  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  rate (Zn1-4: 0, 25, 50, 100  $\mu\text{M L}^{-1}$ ). Sixteen treatments were the result, which corresponded to the combination of levels of the factors. The application of the treatments increased yield ( $p \leq 0.05$ ) from 15.6 to 51.0%; also, Fe content from 21.1 to 36.8%, Zn content from 1.1 to 12.7%. Total phenolic content from 1.8 to 30.5% and antioxidant activity from 1.5 to 35.2%. The study showed that biofortification with ferrous sulfate in combination with zinc sulfate can be an alternative to increase yield, mineral content and antioxidant activity in cowpea bean.

**Key words:** total phenolic content, malnutrition, DPPH radical, *Vigna unguiculata*, zinc.

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6220-5309>.

Recibido: octubre, 2020. Aprobado: junio, 2021.

Publicado en Agrociencia 55: 357-367. 2021.

**Palabras clave:** contenido fenólico total, malnutrición, radical DPPH, *Vigna unguiculata*, zinc.

## INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son el segundo alimento más importante para el consumo humano, aportan el doble de proteína que los cereales y proveen elementos minerales, ácidos grasos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y fitoquímicos (Awika y Duodu, 2017). El frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) es una fabácea de grano producida en las regiones tropicales y subtropicales, se consumen los granos secos, vainas, hojas y granos verdes. En México, el frijol caupí se utiliza para preparar platillos tradicionales en los estados del sureste del país (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015). El contenido mineral en el grano depende no solo de la genética del cultivo sino también de la disponibilidad del elemento mineral en el suelo donde se produce la leguminosa (Alloway, 2013).

La desnutrición mineral se considera un desafío global para la humanidad (WHO, 2020). La deficiencia de hierro (Fe) y zinc (Zn) en los alimentos genera problemas de salud pública en el mundo, afecta el crecimiento, apetito, desarrollo cognitivo e intelectual en niños, el estado inmunológico y el rendimiento en adolescentes y adultos (Poniedzialek *et al.*, 2020). La deficiencia de Fe y Zn afecta a más de dos mil millones de habitantes en el mundo, y 60% es por deficiencia de Fe y 30% por deficiencia de Zn (Prasad y Shivay, 2020).

La biofortificación de cultivos se ha implementado como estrategia mundial para incrementar el contenido de elementos esenciales en la parte comestible (Poniedzialek *et al.*, 2020). Connorton y Balk (2019) y Di Gioia *et al.* (2019) estudiaron el efecto de la aplicación exógena de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.), para incrementar el contenido de Fe y Zn, pero hay pocos estudios sobre leguminosas de grano. Además, las investigaciones relacionadas con la biofortificación se han enfocado en incrementar el contenido de compuestos bioactivos y antioxidantes (Islam *et al.*, 2020).

Sin embargo, suplementar las deficiencias (Fe-Zn) puede tener efectos distintos, que permitan obtener alimentos vegetales enriquecidos con microelementos y fitoquímicos de importancia para la dieta alimentaria.

## INTRODUCTION

Legumes are the second more important food for human consumption, they provide twice as much protein as cereals and provide mineral elements, fatty acids, amino acids, carbohydrates, vitamins and phytochemicals (Awika and Duodu, 2017). Cowpea bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.) is a grain Fabaceae member produced in tropical and subtropical regions, where dried beans, pods, leaves and green beans are consumed. In Mexico, cowpea beans are used to prepare traditional dishes in the southeastern states of the country (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015). The mineral content in the bean depends not only on the crop genetics but also on the availability of mineral elements in the soil where the legume is produced (Alloway, 2013).

Mineral malnutrition is considered a global challenge for humanity (WHO, 2020). Iron (Fe) and zinc (Zn) deficiency in foods generates public health problems in the world, affecting growth, appetite, cognitive and intellectual development in children, immune status and performance in adolescents and adults (Poniedzialek *et al.*, 2020). Fe and Zn deficiency affect more than two billion inhabitants in the world, and 60% is due to Fe deficiency and 30% due to Zn deficiency (Prasad and Shivay, 2020).

Crop biofortification has been implemented as a worldwide strategy to increase the content of essential elements in the edible portion (Poniedzialek *et al.*, 2020). Connorton and Balk (2019) and Di Gioia *et al.* (2019) studied the effect of exogenous application of ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) and zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) on rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) to increase Fe and Zn content, but there are few studies on grain legumes. In addition, research related to biofortification has focused on increasing the content of bioactive compounds and antioxidants (Islam *et al.*, 2020).

However, supplementing deficiencies (Fe-Zn) may have different effects, which would allow obtaining plant foods enriched with microelements and phytochemicals of dietary importance. The content of Fe and Zn in grain produced in traditional systems in the state of Tabasco is relatively low, so the use of agronomic biofortification is recommended to increase them.

Therefore, under the premise that at least a combination of these compounds, as a biofortification

El contenido de Fe y Zn en el grano producido en sistemas tradicionales del estado de Tabasco es relativamente bajo, por lo que se recomienda el uso de la biofortificación agronómica para incrementarlos. Por lo anterior, bajo la premisa de que al menos una combinación de estos compuestos, como procedimiento de biofortificación, podría mejorar el rendimiento y la calidad nutricional del frijol caupí (*V. unguiculata*); el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc sobre el rendimiento, contenido mineral y la actividad antioxidante del frijol caupí.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en un sistema protegido en la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en el municipio de Centro, Tabasco, México; en las coordenadas 17° 46' 56" N y 92° 57' 28" O, altitud 21 m, y temperatura promedio de 37 °C. En el estudio se usaron semillas de frijol caupí seleccionadas por Márquez-Quiroz *et al.* (2015) en un estudio previo. La siembra se realizó en bolsas de polietileno negro (30 cm de ancho y 35 cm de alto), llenas con sustrato inerte (tepetzil). La densidad de siembra fue de 44 444 plantas por hectárea.

En el ciclo del cultivo se aplicó la solución nutritiva descrita por Márquez-Quiroz *et al.* (2015): 14 mM de  $\text{NO}_3^-$ , 1 mM de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 4 mM de  $\text{SO}_4^{2-}$ , 6 mM de  $\text{K}^+$ , 8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y 4 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ . Para suministrar los microelementos en la solución nutritiva se utilizó el producto TradeCorp AZ® (mezcla Quelatos, Cía. Rovensa, España). El pH de la solución se ajustó entre 5.5 y 6.0 con ácido sulfúrico. La solución nutritiva se aplicó de forma manual, con aporte de 250 mL los primeros 20 d después de la germinación. La dosis aumentó a 500 mL del día 21 al 50; los días 51 al 90 después de la siembra (dds) se aplicaron 1000 mL. Para prevenir un exceso en la acumulación de sales de las soluciones nutritivas se usó un riego de 1.5 L de agua cada 8 d. El agua de riego se clasificó como agua de salinidad baja y contenido bajo de sodio ( $\text{C}_1 \text{ S}_1$ ), conductividad eléctrica de 1.1  $\text{dS m}^{-1}$ , pH de 7.0, y la concentración de los cationes fue  $\text{Ca}^{2+}$ : 4.6,  $\text{Mg}^{2+}$ : 1.3,  $\text{K}^+$ : 0.2,  $\text{Na}^+$ : 3.0  $\text{mM L}^{-1}$ , y de aniones:  $\text{HCO}_3^-$ : 4.6,  $\text{Cl}^-$ : 4.0 y  $\text{SO}_4^{2-}$ : 0  $\text{mM L}^{-1}$ .

Los tratamientos evaluados resultaron de las combinaciones de las dosis de 0, 25, 50 y 100  $\mu\text{M L}^{-1}$  de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), grado reactivo (Cuadro 1), para un total de 16 tratamientos. Las aplicaciones al sustrato (250 mL por maceta) se realizaron de manera manual cada tercer día, a partir del día 21 y hasta los 90 dds.

procedure, would improve yield and nutritional quality of cowpea (*V. unguiculata*); the objective of this study was to evaluate the effect of the application of ferrous sulfate in combination with zinc sulfate on yield, mineral content and antioxidant activity of cowpea.

## MATERIALS AND METHODS

The research was conducted in a protected system at the División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, in the municipality of Centro, Tabasco, Mexico; coordinates 17° 46' 56" N and 92° 57' 28" W, 21 m altitude, with an average temperature of 37 °C. Cowpea bean seeds selected by Márquez-Quiroz *et al.* (2015) in a previous study were used in our research. Planting was performed in black polyethylene bags (30 cm wide and 35 cm high) filled with inert substrate (tepetzil). The planting density was 44 444 plants per hectare.

During the crop cycle, the nutrient solution described by Márquez-Quiroz *et al.* (2015) was applied: 14 mM  $\text{NO}_3^-$ , 1 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 4 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , 6 mM  $\text{K}^+$ , 8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 4 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . TradeCorp AZ® (Chelate mixture, Rovensa, Spain) was used to supply the microelements in the nutrient solution. The pH of the solution was adjusted between 5.5 and 6.0 with sulfuric acid. The nutrient solution was applied manually, with a 250 mL dose during the first 20 d after germination. The dose increased to 500 mL from day 21 to 50; at 51 to 90 days after planting (dds) 1000 mL were applied. To prevent an excessive accumulation of salts in the nutrient solutions, 1.5 L of irrigation water were applied every 8 d. The irrigation water was classified as low salinity and low sodium content water ( $\text{C}_1 \text{ S}_1$ ), electrical conductivity of 1.1  $\text{dS m}^{-1}$ , pH of 7.0, and the concentration of cations was  $\text{Ca}^{2+}$ : 4.6,  $\text{Mg}^{2+}$ : 1.3,  $\text{K}^+$ : 0.2,  $\text{Na}^+$ : 3.0  $\text{mM L}^{-1}$ , and of anions:  $\text{HCO}_3^-$ : 4.6,  $\text{Cl}^-$ : 4.0 and  $\text{SO}_4^{2-}$ : 0  $\text{mM L}^{-1}$ .

The treatments evaluated resulted from combinations of 0, 25, 50 and 100  $\mu\text{M L}^{-1}$  of ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) and zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) doses, reagent grade (Table 1), for a total of 16 treatments. Applications to the substrate (250 mL per pot) were made manually every third day, from 21 to 90 dds.

The plants were guided and separated vertically with twine stakes. Phytosanitary management was carried out with the application of the Karate Zeon® insecticide (Lambda cyhalothrin; Agrisolver) for controlling *Spodoptera* and Sulfacob 25® (copper sulfate pentahydrate; Agrisolver) for controlling *Colletotrichum lindemuthianum*.

Yield (g of grain per plant), number of mature pods harvested per plant, number of grains per plant (18 pods per

**Cuadro 1. Formulación de tratamientos con dos microelementos (Fe) y (Zn) en combinaciones de cuatro dosis cada uno, para biofortificación del frijol caupí.****Table 1. Formulation of treatments with two microelements (Fe) and (Zn) in combinations of four doses each, for biofortification of cowpea bean.**

Tratamiento	Dosis de formulación de las soluciones con hierro y zinc (Fe - Zn)	FeSO <sub>4</sub> ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )	ZnSO <sub>4</sub> ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )
Fe1-Zn1	Control, sin Fe – sin Zn	0	0
Fe2-Zn1	Baja Fe - sin Zn	25	0
Fe3-Zn1	Media Fe - sin Zn	50	0
Fe4-Zn1	Alta Fe – sin Zn	100	0
Fe1-Zn2	Sin Fe - baja Zn	0	25
Fe2-Zn2	Baja Fe - baja Zn	25	25
Fe3-Zn2	Media Fe - baja Zn	50	25
Fe4-Zn2	Alta Fe – baja Zn	100	25
Fe1-Zn3	Sin Fe - media Zn	0	50
Fe2-Zn3	Baja Fe - media Zn	25	50
Fe3-Zn3	Media Fe - media Zn	50	50
Fe4-Zn3	Alta Fe - media Zn	100	50
Fe1-Zn4	Sin Fe - alta Zn	0	100
Fe2-Zn4	Baja Fe - alta Zn	25	100
Fe3-Zn4	Media Fe - alta Zn	50	100
Fe4-Zn4	Alta Fe - alta Zn	100	100

Las plantas se guiaron y separaron de forma vertical con tutores de hilo rafia. El manejo fitosanitario se efectuó con aplicación del insecticida Karate Zeon® (Lambda cyhalotrina; Agrisolver) para el control de *Spodoptera* y Sulfacob 25® (sulfato de cobre pentahidratado; Agrisolver) para el control de *Colletotrichum lindemuthianum*.

El rendimiento (g de grano por planta), número de vainas maduras cosechadas por planta, número de granos por planta (18 vainas por tratamiento), peso de 100 semillas, contenido mineral, contenido fenólico total y actividad antioxidante se evaluó a los 90 dds. El peso se registró en una balanza granataria (Ohaus Scout® Pro, modelo H-2710, Darmstadt, Germany) con precisión de  $\pm 0.1$  g. Todas las variables se midieron por triplicado.

La determinación del contenido mineral se realizó en los granos secos de la tercera y cuarta vaina cosechada, seis vainas por tratamiento, los cuales se molieron en un molino (Krups, Modelo GX4100; Lyon, France), y después las muestras se cribaron con tamiz de 2 mm. Estas determinaciones se realizaron en el laboratorio de Fisiología y Nutrición Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Delicias. El nitrógeno orgánico (N) se cuantificó por el método Micro-Kjeldahl. El fósforo (P) se determinó por el método colorimétrico de vanadomolibdato en un espectrofotómetro (GENESIS 10S UV-VIS, Waltham, MA. USA) a 430 nm. La determinación del potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), manganeso (Mn), hierro (Fe) y zinc (Zn) se cuantificó por espectrofotometría de absorción atómica en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™,

treatment), 100-seed weight, mineral content, total phenolic content and antioxidant activity were evaluated at 90 dds. Weight was recorded on a granatary balance (Ohaus Scout® Pro, model H-2710, Darmstadt, Germany) with an accuracy of  $\pm 0.1$  g. All variables were measured in triplicate.

The determination of mineral content was carried out on the dry grains of the third and fourth pod harvested, six pods per treatment, which were ground in a mill (Krups, Model GX4100; Lyon, France), and then the samples were sieved with a 2 mm screen. These determinations were carried out in the Laboratorio de Fisiología y Nutrición Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Delicias. Organic nitrogen (N) was quantified by the Micro-Kjeldahl method. Phosphorus (P) was determined by the vanadomolybdate colorimetric method in a spectrophotometer (GENESIS 10S UV-VIS, Waltham, MA. USA) at 430 nm. The determination of potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), manganese (Mn), iron (Fe) and zinc (Zn) was quantified by atomic absorption spectrophotometry in a spectrophotometer (Thermo Scientific™, model iCE 3000 series AAS, Waltham, MA. USA), and all analyses were performed in triplicate.

The extraction of antioxidant compounds was performed according to the methodology described by Guillén-Molina *et al.* (2016), for which 0.2 g of cowpea bean flour sample was weighed, 10 mL of the acetone - water mixture (7:3) was added and shaken for 30 min in a shaker (Orbit-Shaker, model 3520, Waltham, MA. USA). It was then centrifuged for 5 min at  $7.735 \times g$

modelo iCE 3000 series AAS, Waltham, MA. USA), y todos los análisis se hicieron por triplicado.

La extracción de compuestos antioxidantes se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Guillén-Molina *et al.* (2016), para lo cual se pesó 0.2 g de muestra de harina de frijol caupí, se añadió 10 mL de la mezcla acetona – agua (7:3) y se agitó 30 min en un agitador (Orbit-Shaker, modelo 3520, Waltham, MA. USA). Luego se centrifugó por 5 min a 7.735 x g a 4 °C (Hermle, modelo Z323K, UKAS, United Kingdom). El sobrenadante se recuperó y el precipitado se sometió a una nueva extracción bajo las mismas condiciones de la primera extracción; para luego filtrar y unir el primer y segundo filtrado.

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. A 0.5 mL del extracto acetónico se añadieron 2.5 mL de Folin-Ciocalteu con dilución en agua (1:10) y 2 mL de carbonato de sodio. La mezcla reposó 1 h en oscuridad. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (UV/VIS BRAIC, UV-1800; Beijing, China) a 760 nm. La curva de calibración se realizó de 10 a 100 mg mL<sup>-1</sup> con ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG g<sup>-1</sup>).

La actividad antioxidante se determinó con la metodología descrita por Guillén-Molina *et al.* (2016). A 200 µL del extracto acetónico se añadieron 1800 µL de solución de radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) disuelto a 125 µM en metanol al 80% (metanol – agua), reposó 60 min en oscuridad y la absorbancia se midió a 517 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS BRAIC, UV-1800; Beijing, China). Todas las mediciones se realizaron tres veces. La actividad antioxidante se expresó en porcentaje de inhibición del radical DPPH.

#### Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar en un arreglo factorial. Los factores fueron los fertilizantes sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) y sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) en dosis de aplicación (nula, baja, media y alta) 0, 25, 50 y 100 µM L<sup>-1</sup> respectivamente, para cada elemento (Fe o Zn). Así, con las combinaciones hubo 16 tratamientos con tres repeticiones por tratamiento, para un total de 48 unidades experimentales. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Fisher (p≤0.05). Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación de FeSO<sub>4</sub> - ZnSO<sub>4</sub> tuvo un efecto positivo en las variables rendimiento, número de

at 4 °C (Hermle, model Z323K, UKAS, United Kingdom). The supernatant was recovered, and the precipitate was subjected to a new extraction under the same conditions of the first extraction; then filtering and joining the first and second filtrate.

The total phenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method. 2.5 mL of Folin-Ciocalteu with dilution in water (1:10) and 2 mL of sodium carbonate were added to 0.5 mL of the acetone extract. The mixture rested for 1 h in the dark. The absorbance was measured in a spectrophotometer (UV/VIS BRAIC, UV-1800; Beijing, China) at 760 nm. The calibration curve was performed from 10 to 100 mg mL<sup>-1</sup> with gallic acid. Results were expressed as mg gallic acid equivalents per gram of sample (mg EAG g<sup>-1</sup>).

Antioxidant activity was determined using the methodology described by Guillén-Molina *et al.* (2016). 1800 µL of DPPH (radical solution 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 125 µM dissolved in 80% methanol (methanol - water) were added to 200 µL of the acetonic extract, then rested for 60 min in the dark, and absorbance was measured at 517 nm in a spectrophotometer (UV/VIS BRAIC, UV-1800; Beijing, China). All measurements were performed three times. Antioxidant activity was expressed as percentage inhibition of the DPPH radical.

#### Statistical analysis

The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement. The factors were ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) and zinc sulfate (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) fertilizers at doses of (null, low, medium and high application) 0, 25, 50 and 100 µM L<sup>-1</sup>, respectively, for each element (Fe or Zn). Thus, with the combinations there were 16 treatments with three replicates per treatment, for a total of 48 experimental units. With the data obtained, an analysis of variance and comparison of means was performed with the Fisher's test (p≤0.05). The analyses were performed with the SAS statistical software for Windows (SAS Institute Inc., 2013).

## RESULTS AND DISCUSSION

The application of FeSO<sub>4</sub> - ZnSO<sub>4</sub> had a positive effect on the variables yield, number of pods per plant and grains per plant (Table 2), and in this sense, the addition of a medium dose of iron and a high dose of zinc (Fe3-Zn4) increased yield by 51.04%, compared to the value obtained in the control (Fe1-Zn1). The yield obtained in this study was 1.37 - 2.07 times higher than the 7 g of grain per plant reported by Apáez-Barrios *et al.* (2011), who studied a traditional production system without biofortification. But it



vainas por planta y granos por planta (Cuadro 2), y en este sentido la adición de la dosis media de hierro y alta de zinc (Fe3-Zn4) incrementó el rendimiento en 51.04%, en comparación con el valor obtenido en el control (Fe1-Zn1). El rendimiento obtenido en este estudio fue 1.37 - 2.07 veces mayor que los 7 g de grano por planta documentados por Apáez-Barrios *et al.* (2011), quienes estudiaron un sistema de producción tradicional sin biofortificación. Pero fue 11.04% inferior a los 16.3 g por planta obtenidos por Guillén-Molina *et al.* (2016), quienes adicionaron a la solución nutritiva la combinación de dosis media de quelato de hierro y dosis media de quelato de zinc (50  $\mu\text{M L}^{-1}$  de Fe-EDDHA - 50  $\mu\text{M L}^{-1}$  de Zn-EDTA). Esta diferencia en el rendimiento se debió a que los quelatos son compuestos con estabilidad mayor, hecho que facilitó su absorción por la planta.

Al respecto, el Zn participa en el desarrollo floral de las leguminosas y un aporte insuficiente puede afectar el rendimiento, número de vainas y granos (Poblaciones y Rengel, 2016). La adición de dosis baja de hierro, sin zinc (Fe2-Zn1) incrementó el número de vainas por planta en 34.4%, en comparación con el control. Respecto al número de granos por planta

was 11.04% lower than the 16.3 g per plant obtained by Guillén-Molina *et al.* (2016), who added the combination of a medium dose of iron chelate and a medium dose of zinc chelate (50  $\mu\text{M L}^{-1}$  of Fe-EDDHA - 50  $\mu\text{M L}^{-1}$  of Zn-EDTA) to the nutrient solution. This difference in yield was due to chelates are compounds with greater stability, a fact which facilitated their absorption by the plant.

In this regard, Zn participates in the floral development of legumes and an insufficient supply can affect yield, number of pods and grains (Poblaciones and Rengel, 2016). The addition of low iron doses, without zinc (Fe2-Zn1) increased the number of pods per plant by 34.4%, compared to the control. Regarding the number of grains per plant, values ranging from 67.2 to 110.3 grains per plant were observed, with increases of 64.1, 61.1, and 56.6% under the Fe4-Zn1, Fe2-Zn3, and Fe2-Zn1 treatments, respectively, compared to the control.

The 100-grain weight values ranged from 11.6 to 15.1 g, with increases of 11.2 and 12.7% when solutions with medium iron and zinc (Fe3-Zn3) and low iron and high zinc (Fe2-Zn4) doses were added, respectively, compared to the control. Grain size is an important criterion for consumers, since small grains

**Cuadro 2. Efecto de la aplicación de sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc sobre el rendimiento de frijol caupí.**

**Table 2. Effect of ferrous sulfate application in combination with zinc sulfate on cowpea bean yield.**

Tratamiento	Dosis ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )	Rendimiento (g de grano por planta)	Número de vainas por planta	Granos por planta	Peso de 100 granos (g)
Fe1-Zn1	0-0	9.6 b <sup>†</sup>	6.4 b	67.2 c	13.4 abc
Fe2-Zn1	25-0	12.7 ab	8.6 a	105.3 a	13.5 abc
Fe3-Zn1	50-0	12.6 ab	7.6 ab	93.3 abc	13.6 abc
Fe4-Zn1	100-0	13.4 ab	8.0 ab	110.3 a	11.9 bc
Fe1-Zn2	0-25	10.2 ab	7.6 ab	81.0 abc	11.6 c
Fe2-Zn2	25-25	11.3 ab	6.7 ab	78.5 abc	12.3 bc
Fe3-Zn2	50-25	14.4 a	8.3 ab	99.6 ab	13.7 abc
Fe4-Zn2	100-25	13.4 ab	8.0 ab	93.6 abc	13.9 abc
Fe1-Zn3	0-50	11.1 ab	6.8 ab	83.3 abc	13.5 abc
Fe2-Zn3	25-50	13.6 ab	8.3 ab	108.3 a	13.6 abc
Fe3-Zn3	50-50	13.2 ab	7.3 ab	89.0 abc	14.9 a
Fe4-Zn3	100-50	13.2 ab	7.6 ab	100.0 ab	13.9 abc
Fe1-Zn4	0-100	12.8 ab	7.6 ab	97.6 ab	13.1 abc
Fe2-Zn4	25-100	12.9 ab	7.0 ab	93.3 abc	15.1 a
Fe3-Zn4	50-100	14.5 a	7.6 ab	101.6 ab	14.3 ab
Fe4-Zn4	100-100	11.9 ab	7.0 ab	88.3 abc	13.5 abc

<sup>†</sup>Valores con letra distinta indican diferencia estadística (Fisher,  $p \leq 0.05$ ). ♦ <sup>†</sup>Values with different letter indicate statistical difference (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

se observaron valores de entre 67.2 a 110.3 granos por planta, con incrementos de 64.1, 61.1 y 56.6% bajo los tratamientos Fe4-Zn1, Fe2-Zn3, y Fe2-Zn1, respectivamente, en comparación con el control.

Los valores del peso de 100 granos oscilaron de 11.6 a 15.1 g, con incrementos de 11.2 y 12.7% al adicionar las soluciones con dosis media de hierro y zinc (Fe3-Zn3) y dosis baja de hierro y alta de zinc (Fe2-Zn4), respectivamente, en comparación con el control. El tamaño del grano es un criterio importante para los consumidores, los granos pequeños se asocian con un menor tiempo de cocción (Guillén-Molina *et al.*, 2016). El valor obtenido en el presente estudio es superior a los 11 g registrados por Apáez-Barrios *et al.* (2011). Al respecto, Manzeke *et al.* (2017) indicaron que la fertilización con Zn<sup>2+</sup> incrementa la producción y calidad nutricional del frijol caupí.

La adición de las dosis baja y media de hierro, sin zinc (Fe2-Zn1, Fe3-Zn1), y la dosis alta de ambos elementos (Fe4-Zn4) incrementó el contenido de N en 11.3, 3.7 y 2.0% respectivamente, en comparación con el control (Cuadro 3). Nuestros valores se encuentran dentro de los contenidos de N registrados

are associated with shorter cooking time (Guillén-Molina *et al.*, 2016). The value obtained in this study is higher than the 11 g reported by Apáez-Barrios *et al.* (2011). In this regard, Manzeke *et al.* (2017) indicated that fertilization with Zn<sup>2+</sup> increases the production and nutritional quality of cowpea.

The addition of the low and medium doses of iron, without zinc (Fe2-Zn1, Fe3-Zn1), and the high dose of both elements (Fe4-Zn4) increased the N content by 11.3, 3.7 and 2.0%, respectively, compared to the control (Table 3). Our values are within the N contents recorded for cowpea beans, which range from 2.50 to 4.80% (Carvalho *et al.*, 2012; Muranaka *et al.*, 2016).

Regarding phosphorus compared to the control, the addition of a low dose of iron without zinc (Fe2-Zn1) increased the P content by 8.0%, while the addition of a medium dose of iron without zinc (Fe3-Zn1) modified the P content by 1.3%. The solution with low doses of both elements (Fe2-Zn2) increased the P content by 18.7%, which corresponds to the largest increase. Then, the addition of a medium dose of iron and a low dose of zinc (Fe3-Zn2) showed an increase in P of 4.0%; while adding a high dose of

**Cuadro 3. Efecto de la aplicación sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc sobre el contenido mineral de los granos de frijol caupí biofortificados.**

**Table 3. Effect of ferrous sulfate application in combination with zinc sulfate on mineral content of biofortified cowpea beans.**

Tratamiento	Dosis ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )	N <sup>†</sup>	P <sup>‡</sup>	K <sup>b</sup> (%)	Ca <sup>□</sup>	Mg <sup>††</sup>	Fe <sup>¶¶</sup>	Zn <sup>§§</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn <sup>bb</sup>
Fe1-Zn1	0-0	3.54 ef <sup>†</sup>	0.075 cde	1.18 a	0.072 a	0.14 a	34.12 bc	49.62 a	9.43 ab
Fe2-Zn1	25-0	3.94 h	0.081 de	1.26 bc	0.097 b	0.15 a	46.69 i	55.88 f	11.93 c
Fe3-Zn1	50-0	3.67 g	0.076 cd	1.23 abc	0.118 cdef	0.15 a	41.33 h	55.91 f	9.72 ab
Fe4-Zn1	100-0	3.31 b	0.073 cd	1.24 abc	0.111 bcd	0.14 a	37.98 ef	51.58 abc	10.27 b
Fe1-Zn2	0-25	3.43 cde	0.065 bc	1.28 cd	0.12 def	0.15 a	32.79 ab	54.47 ef	9.72 ab
Fe2-Zn2	25-25	3.27 ab	0.089 e	1.33 d	0.116 cde	0.15 a	34.95 c	52.96 cde	10.41 b
Fe3-Zn2	50-25	3.45 de	0.078 de	1.21 ab	0.123 def	0.14 a	35.79 cd	51.89 bcd	10.17 ab
Fe4-Zn2	100-25	3.32 bc	0.077 cde	1.23 abc	0.134 f	0.15 a	35.61 cd	54.15 def	10.17 ab
Fe1-Zn3	0-50	3.35 bcd	0.083 de	1.24 abc	0.129 ef	0.15 a	31.89 a	50.88 abc	8.94 a
Fe2-Zn3	25-50	3.18 a	0.079 de	1.27 bcd	0.127 def	0.15 a	40.33 gh	54.49 ef	10.34 b
Fe3-Zn3	50-50	3.36 bcd	0.058 ab	1.25 abc	0.134 f	0.14 a	37.61 de	54.61 ef	9.29 ab
Fe4-Zn3	100-50	3.44 cde	0.047 a	1.21 ab	0.132 ef	0.15 a	37.09 de	53.05 cde	9.24 ab
Fe1-Zn4	0-100	3.31 b	0.052 ab	1.22 abc	0.127 def	0.14 a	33.66 abc	52.65 cde	9.57 ab
Fe2-Zn4	25-100	3.29 ab	0.056 ab	1.23 abc	0.128 def	0.15 a	38.23 efg	53.97 def	9.13 ab
Fe3-Zn4	50-100	3.32 bc	0.052 ab	1.27 bcd	0.124 def	0.15 a	39.86 fgh	54.50 ef	10.35 b
Fe4-Zn4	100-100	3.61 fg	0.057 ab	1.24 abc	0.102 bc	0.19 b	34.95 c	50.16 ab	10.27 b

<sup>†</sup>Valores con letra distinta indican diferencia estadística (Fisher,  $p \leq 0.05$ ); <sup>†</sup>N: nitrógeno; <sup>‡</sup>P: fósforo; <sup>b</sup>K: potasio; <sup>□</sup>Ca: calcio; <sup>††</sup>Mg: magnesio; <sup>¶¶</sup>Fe: hierro; <sup>§§</sup>Zn: zinc; <sup>bb</sup>Mn: manganeso. ♦ <sup>†</sup>Values with different letters indicate statistical difference (Fisher,  $p \leq 0.05$ ); <sup>†</sup>N: nitrogen; <sup>‡</sup>P: phosphorus; <sup>b</sup>K: potassium; <sup>□</sup>Ca: calcium; <sup>††</sup>Mg: magnesium; <sup>¶¶</sup>Fe: iron; <sup>§§</sup>Zn: zinc; <sup>bb</sup>Mn: manganese.

para frijol caupí, los cuales oscilan de 2.50 a 4.80% (Carvalho *et al.*, 2012; Muranaka *et al.*, 2016).

Respecto al fósforo comparado con el control, la adición de dosis baja de hierro sin zinc (Fe2-Zn1) incrementó 8.0% el contenido de P; mientras la adición de dosis media de hierro, sin zinc (Fe3-Zn1) modificó el contenido de P en 1.3%. La solución con dosis baja de ambos elementos (Fe2-Zn2) aumentó 18.7% el contenido de P, lo cual corresponde al incremento mayor. Luego, la adición de dosis media de hierro y baja de zinc (Fe3-Zn2) mostró un incremento en P del 4.0%; mientras que añadir dosis alta de hierro y baja de zinc (Fe4-Zn2) aumentó el contenido de P en 2.7%.

Otra respuesta favorable respecto a fósforo se obtuvo con la adición de la dosis media de zinc, sin añadir hierro (Fe1-Zn3), esto incrementó el contenido de P en 10.7%. Por último, la adición de dosis baja de hierro y media de zinc (Fe2-Zn3) incrementó el contenido de P en 5.3% en comparación con el control. El contenido de P en nuestro estudio se encuentra en el intervalo de deficiencia de acuerdo con lo reportado por Guillén-Molina *et al.* (2016). Al respecto se ha observado en otros cultivos que al incrementar la dosis de  $Zn^{2+}$ , el contenido de P disminuye (Hussain *et al.*, 2020).

La adición de dosis baja de ambos elementos (Fe2-Zn2), alta de hierro y baja de zinc (Fe4-Zn2), y dosis alta de ambos elementos (Fe4-Zn4) incrementó respectivamente el contenido de K, Ca y Mg en 12.7, 86.1 y 35.7%, en comparación con el control. En nuestro estudio, el contenido de estos macronutrientes en el grano contrasta con los resultados de Espinosa-Moreno (2013), quienes encontraron contenidos de 1.5, 0.28 y 0.22% para K, Ca y Mg, respectivamente en el grano de frijol caupí, de producción tradicional en Tabasco.

Los contenidos de microelementos variaron: Fe (entre 31.89 y 46.69 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (de 50.16 a 55.91 mg kg<sup>-1</sup>) y los de Mn entre 9.13 y 11.93 mg kg<sup>-1</sup>. La adición de la dosis baja de Fe, sin Zn (Fe2-Zn1) incrementó el contenido de Fe, Zn y Mn en 36.8, 12.6 y 26.5% respectivamente, en comparación con el control. Al respecto, el aumento en las dosis de los fertilizantes usados no siempre va a permitir una acumulación mayor en el grano, porque depende del movimiento de los microelementos como iones libres desde el tallo hasta el grano (Hussain *et al.*, 2020).

iron and low dose of zinc (Fe4-Zn2) increased the P content by 2.7%.

Another favorable response with respect to phosphorus was obtained with the addition of a medium dose of zinc, without adding iron (Fe1-Zn3), which increased the P content by 10.7%. Finally, the addition of a low dose of iron and medium dose of zinc (Fe2-Zn3) increased the P content by 5.3% compared to the control. The P content in our study is in the deficiency range as reported by Guillén-Molina *et al.* (2016). In this regard, it has been observed in other crops that by increasing the dose of  $Zn^{2+}$ , the P content decreases (Hussain *et al.*, 2020).

The addition of low doses of both elements (Fe2-Zn2), high iron and low zinc (Fe4-Zn2) doses, and high doses of both elements (Fe4-Zn4) increased the K, Ca and Mg contents by 12.7, 86.1 and 35.7%, respectively, compared to the control. In our study, the content of these macronutrients in the grain contrasts with the results of Espinosa-Moreno (2013), who found contents of 1.5, 0.28 and 0.22% for K, Ca and Mg, respectively, in cowpea bean of traditional production in Tabasco.

The microelement contents varied: Fe (between 31.89 and 46.69 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (from 50.16 to 55.91 mg kg<sup>-1</sup>) and Mn (between 9.13 and 11.93 mg kg<sup>-1</sup>). The addition of the low dose of Fe, without Zn (Fe2-Zn1) increased the Fe, Zn and Mn content by 36.8, 12.6 and 26.5%, respectively, compared to the control. In this regard, the increase in the doses of fertilizers used will not always allow a greater accumulation in the grain, because it depends on the movement of microelements as free ions from the stem to the grain (Hussain *et al.*, 2020).

Similarly, transpiration rate modifies the ability to absorb and mobilize mineral elements (White *et al.*, 2017). The phenological stage of the plant, environmental factors such as drought stress, and high levels of N, P, Fe and Cd in the rhizosphere can affect plant Zn uptake (Gupta *et al.*, 2017). Likewise, there is evidence that the addition of high doses of zinc sulfate interferes with the uptake and translocation of P, Ca and Fe, in addition to causing cytological disorders in the plant (Hussain *et al.*, 2020).

The addition of a low dose of zinc, without iron (Fe1-Zn2), a low dose of both elements (Fe2-Zn2), a medium dose of iron and low dose of zinc (Fe3-Zn2), and a high dose of iron with low dose of zinc (Fe4-Zn2) increased the total phenol content by

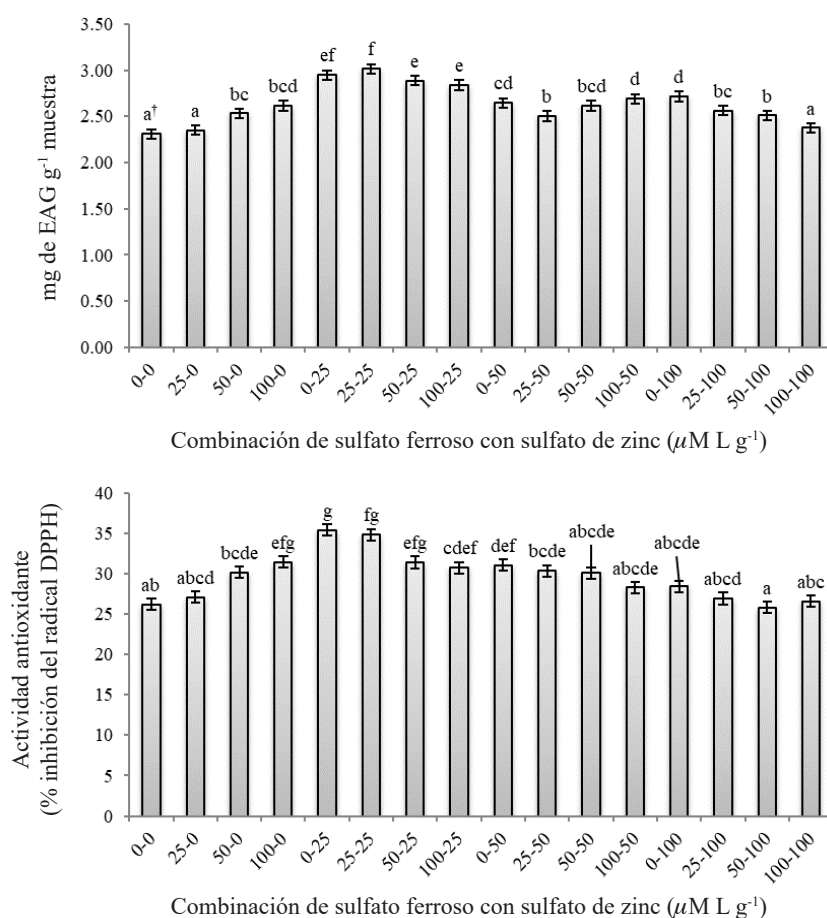


De manera similar, la tasa de transpiración modifica la capacidad para absorber y movilizar elementos minerales (White *et al.*, 2017). La etapa fenológica de la planta, los factores ambientales como el estrés por sequía, niveles altos de N, P, Fe y Cd en la rizósfera pueden afectar la absorción de Zn en la planta (Gupta *et al.*, 2017). También existe evidencia de que la adición de dosis elevadas de sulfato de zinc interfiere en la absorción y translocación de P, Ca y Fe, además de provocar desórdenes citológicos en la planta (Hussain *et al.*, 2020).

La adición de dosis baja de zinc, sin hierro (Fe1-Zn2), dosis baja de ambos elementos (Fe2-Zn2), dosis media de hierro y baja de zinc (Fe3-Zn2) y dosis alta de hierro con la dosis baja de zinc (Fe4-Zn2) incrementó respectivamente el contenido de fenoles totales en 24.5, 30.5, 25.0 y 22.8% en comparación con el control (Figura 1A). Además, los tratamientos

24.5, 30.5, 25.0, respectivamente, and 22.8% compared to the control (Figure 1A). In addition, the above treatments increased 35.2, 33.0, 20.0, and 17.3%, respectively, the antioxidant activity compared to the control (Figure 1B).

In this study, the antioxidant activity in biofortified cowpea bean contrasted with the results reported by Guillén-Molina *et al.* (2016) who found values of 25 to 40% inhibition of the DPPH radical. Sida-Arreola *et al.* (2015; 2017) obtained an increase in antioxidant activity by individually adding  $25 \mu\text{M L}^{-1}$  ferrous sulfate and  $25 \mu\text{M L}^{-1}$  zinc sulfate to common bean. The content of antioxidant compounds varies depending on genotype, growing conditions, agronomic practices, time of crop establishment, maturity, storage and the solvent used for extraction (Zia-Ul-Haq *et al.*, 2013). Flavonoids, flavonols, and condensed tannins are the main compounds



**Figura 1. Contenido de fenoles totales (A) y actividad antioxidante (B) en el grano de frijol caupí biofortificado. <sup>†</sup>Valores con letra distinta indican diferencia estadística (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).**

**Figure 1. Total phenol content (A) and antioxidant activity (B) in biofortified cowpea bean. <sup>†</sup>Values with different letter indicate statistical difference (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).**

anteriores incrementaron 35.2, 33.0, 20.0, y 17.3% respectivamente la actividad antioxidante en comparación con el control (Figura 1B).

En este estudio, la actividad antioxidante en el grano de frijol caupí biofortificado contrastó con los resultados de Guillén-Molina *et al.* (2016) quienes encontraron valores de 25 a 40% de inhibición del radical DPPH. Sida-Arreola *et al.* (2015; 2017) obtuvieron un incremento de la actividad antioxidante al adicionar en forma individual  $25 \mu\text{M L}^{-1}$  de sulfato ferroso y  $25 \mu\text{M L}^{-1}$  sulfato de zinc al frijol común. El contenido de compuestos antioxidantes varía en función del genotipo, condiciones de crecimiento, prácticas agronómicas, época de establecimiento del cultivo, madurez, almacenamiento y solvente usado para la extracción (Zia-Ul-Haq *et al.*, 2013). Los flavonoides, flavonoles, y taninos condensados son los compuestos principales que confieren actividad antioxidante en leguminosas (Pajak *et al.*, 2014).

## CONCLUSIONES

La adición de las combinaciones de dosis medias de sulfato ferroso con las dosis medias y bajas de sulfato de zinc incrementó el rendimiento de grano hasta en un 50%. Los contenidos de hierro, zinc, fenoles totales y la actividad antioxidante también aumentaron, respecto al tratamiento control. La biofortificación con sulfato ferroso en combinación con sulfato de zinc es una alternativa clara para incrementar el rendimiento, contenido mineral y actividad antioxidante en el grano de frijol caupí.

## LITERATURA CITADA

- Alloway, B. J. 2013. Bioavailability of elements in soil. In: Selinus, O., B. Alloway, J. A. Centeno, R. B. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh, and P. Smedley (eds). *Essentials of Medical Geology: Revised Edition*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp: 351-373.
- Apáez-Barrios P., J. A. S. Escalante-Estrada, y M. T. Rodríguez-González. 2011. Crecimiento y rendimiento del frijol chino en función del tipo de espaldera y clima. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 13: 307-315.
- Awika, J. M., and K. G. Duodu. 2017. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. *J. Funct. Foods.* 38: 686-697.
- Carvalho, A. F. U., N. M. de Sousa, D. F. Farias, L. C. B. da Rocha-Bezerra, R. M. P. da Silva, M. P. Viana, S. T. Gouveia, S. S. Sampaio, M. B. de Sousa, G. P. G. de Lima, S. M. de Moraes, C. C. Barros, and F. R. F. Filho. 2012. Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including de-termining antioxidant capacity and vitamins. *J. Food Compos. Analysis.* 26: 81-88.
- Connorton, J. M., and J. Balk. 2019. Iron biofortification of staple crops: Lessons and challenges in plant genetics. *Plant Cell Physiol.* 60: 1447-1456.
- Di Gioia, F., S. A. Petropoulos, M. Ozores-Hampton, K. Morgan, and E. R. Rosskopf. 2019. Zinc and iron agronomic biofortification of *Brassicaceae* microgreens. *Agronomy.* 9: 677.
- Espinosa-Moreno J., D. Centurión-Didalgo, M. L. Solano, y L. M. Lagues-Gálvez. 2013. Las leguminosas de grano. In: Velázquez Martínez, J. R., E. López-Hernández, y P. García-Alamilla. (coords.) *Desarrollo Científico y Tecnológico de los Recursos Alimentarios en el estado de Tabasco*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tabasco, México. pp: 183-190.
- Guillén-Molina M., C. Márquez-Quiroz, E. de la Cruz-Lázaro, J. R. Velázquez-Martínez, J. Soto, C. M. García, y J. A. Orozco Vidal. 2016. Biofortificación de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) con hierro y zinc. *Rev. Mex. Cienc. Agríc. Pub. Esp.* 3427-3438.
- Gupta, D. K., L. B. Pena, M. C. Romero-Puertas, A. Hernandez, M. Inouhe, and L. M. Sandalio. 2017. NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. *Plant Cell and Environ.* 40: 509-526.
- Hussain, S., A. Umar, M. Amir, and M. Aon. 2020. Biofortification of cereals through foliar application of minerals. In: Benkeblia, N. (ed). *Vitamins and Minerals Biofortification of Edible Plants*. Wiley Blackwell. Croydon, UK. pp: 191-221.
- Islam, M. Z., B.-J. Park, H.-M. Kang, and Y.-T. Lee. 2020. Influence of selenium biofortification on the bioactive compounds and antioxidant activity of wheat microgreen extract. *Food Chem.* 309: 1257-63.

## CONCLUSIONS

The addition of combinations of medium doses of ferrous sulfate with medium and low doses of zinc sulfate increased grain yield by up to 50%. The contents of iron, zinc, total phenols and antioxidant activity also increased, compared to the control treatment. Biofortification with ferrous sulfate in combination with zinc sulfate is a clear alternative to increase yield, mineral content and antioxidant activity in cowpea bean.

—End of the English version—

-----\*

- Manzeke, M. G., F. Mtambanengwe, H. Nezomba, M. J. Watts, M. R. Broadley, and P. Mapfumo. 2017. Zinc fertilization increases productivity and grain nutritional quality of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under integrated soil fertility management. *Field Crops Res.* 213: 231-244.
- Márquez-Quiroz, C., E. de-la-Cruz-Lázaro, R. Osorio-Osorio, and E. Sánchez-Chávez. 2015. Biofortification of cowpea beans with iron: iron's influence on mineral content and yield. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15: 839-847.
- Muranaka, S., M. Shono, T. Myoda, J. Takeuchi, J. Franco, Y. Nakazawa, O. Boukar, and H. Takagi. 2016. Genetic diversity of physical, nutritional and functional properties of cowpea grain and relationships among the traits. *Plant Gen. Res.* 14: 67-76.
- Pajak, P., R. Socha, D. Galkowska, J. Roznowski, and T. Fortuna. 2014. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chem.* 143: 300-306.
- Poblaciones, M. J., and Z. Rengel. 2016. Soil and foliar zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): Grain accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Food Chem.* 212: 427 - 433.
- Poniedzialek, B., K. Perkowska, and P. Rzymiski. 2020. Food fortification. What's in it for the malnourished world? *In: Benkeblia, N. (ed). Vitamins and Minerals Biofortification of Edible Plants.* Wiley Blackwell. Croydon, UK. pp: 27-44.
- Prasad, R., and Y. S. Shivay. 2020. Fertilizers, Grain Quality, and Nutrition-Related Human Ailments: An Overview. <https://doi.org/10.1007/s40011-018-1056-z>
- SAS Institute, Inc. 2013. Base SAS(R) 9.4. Procedures Guide: Statistical Procedures. 2nd. Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 556 p.
- Sida-Arreola, J. P., E. Sánchez-Chávez, D. D. Ávila-Quezada, P. B. Zamudio-Flores, and M. C. H. Acosta. 2015. Iron biofortification and its impact on antioxidant system, yield and biomass in common bean. *Plant Soil and Environ.* 61: 573-576.
- Sida-Arreola, J., E. Sánchez, D. Ojeda-Barrios, G. D. Ávila-Quezada, M. A. Flores-Córdova, C. Márquez-Quiroz, and P. Preciado-Rangel. 2017. Can biofortification of zinc improve the antioxidant capacity and nutritional quality of beans? *Emirates J. Food Agric.* 29: 237.
- White, P. J., J. A. Thompson, G. Wright, and S. K. Rasmussen. 2017. Biofortifying Scottish potatoes with zinc. *Plant and Soil.* 411: 151-165.
- WHO (World Health Organization) 2020. Malnutrition. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition> (Consulta: octubre 2020).
- Zia-Ul-Haq, M., S. Ahmad, R. Amarowicz, and V. de Feo. 2013. Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars commonly consumed in Pakistan. *Molecules.* 18: 2005-2017.