

Agrociencia

Volumen 54, Número 4

16 de mayo - 30 de junio, 2020



Dr. Leobardo Jiménez Sánchez
Profesor Emérito del
Colegio de Postgraduados



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

MÉXICO



DIRECTORIO

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Sergio S. González Muñoz

SUBDIRECTORA DE AGROCIENCIA

Ana Rita Román Jiménez

CONSEJO EDITORIAL INTERNACIONAL

Roger Austin (**Inglaterra**)

José Sarukhán Kermez (**México**)

Barry C. Arnold (**EUA**)

COMITÉ ASESOR EDITORIAL INTERNO

Jorge Alvarado López

Jorge D. Etchevers Barra

Víctor A. González Hernández

Leopoldo E. Mendoza Onofre

José A. Villaseñor Alva

RESPONSABLES DE LA EDICIÓN

Sergio S. González Muñoz

Ana Rita Román Jiménez

FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Brenda Espejel Lagunas

APOYO

Belem M. Villegas Contreras

Yolanda Feroso Meraz

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, Volumen 54, número 4, 16 de mayo - 30 de junio de 2020, Agrociencia es una publicación sesquimensual editada por el Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP 56230. Tel. 5959284427. www.colpos.mx. Editor responsable: Dr. Sergio González Muñoz. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo en trámite. ISSN: 2521-9766, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Dr. Sergio González Muñoz. Fecha de última modificación, 30 de junio de 2020.

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

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

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

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

Oficinas Centrales:

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Guerrero #9, Esquina Avenida Hidalgo.

56220. San Lus Huexotla. Texcoco, Estado de México

En el Colegio de Postgraduados

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Ganadería

Campus Montecillo

Colegio de Postgraduados

56230, Montecillo, Estado de México.

Apartado Postal 56

56230, Suc. Chapingo, Estado de México

Teléfono: 595 92 84427

agrociencia@colpos.mx

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

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

Portada: Los Pioneros

Czeslawa Prywer Lidzbarzka (1900-1965)



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 54

16 de mayo - 30 de junio, 2020

Número 4

Ciencia de los Alimentos / Food Science

- POTENCIAL FUNCIONAL Y NUTRACÉUTICO DE HOJAS DE CAFÉ INJERTADO (*Coffea* spp.) DURANTE UN CICLO ANUAL / FUNCTIONAL AND NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF GRAFTED COFFEE (*Coffea* spp.) LEAVES DURING AN ANNUAL CYCLE
 Tania **Marín-Garza**, Fernando C. **Gómez-Merino**, Libia I. **Trejo-Téllez**, Miriam C. **Pastelín-Solano**, Odón **Castañeda-Castro** 459
- PERMEABILITY ESTIMATION OF A MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGE FOR “HASS” AVOCADO STORAGE / ESTIMACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE UN EMPAQUE DE ATMÓSFERA MODIFICADA PARA EL ALMACENAMIENTO DE AGUACATE “HASS”
 Yessica **Vázquez-López**, José **Caro-Corrales**, Soila **Gaxiola-Camacho**, Rosalina **Iribe-Salazar**, Marco **Carrasco-Escalante**, Jesús **Portillo-Loera**, Miguel **Rodríguez-Gaxiola** 471

Fitociencia / Crop Science

- DESEMPEÑO DE ARQUETIPOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) EN DOS DENSIDADES DE POBLACIÓN / PERFORMANCE OF MAIZE IDEOTYPES (*Zea mays* L.) IN TWO PLANT DENSITIES
 Marlen G. **Hidalgo-Sánchez**, Víctor A. **González-Hernández**, Leopoldo E. **Mendoza-Onofre**, Nicacio **Cruz-Huerta**, Iván **Ramírez-Ramírez** 491
- COMPUESTOS FENÓLICOS, CAROTENOIDES Y CAPSAICINOIDES EN FRUTOS DE *Capsicum* spp. DE TABASCO, MÉXICO / PHENOLIC COMPOUNDS, CAROTENOIDS AND CAPSAICINOIDS IN FRUITS OF SPECIES OF *Capsicum* spp. FROM TABASCO, MEXICO
 Dario de la **Cruz-Ricardez**, Carlos F. **Ortiz-García**, Luz del C. **Lagunes-Espinoza**, Magdiel **Torres-de la Cruz**, Edith **Hernández-Nataren** 505

Protección Vegetal / Plant Protection

- ETIOLOGÍA DEL ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO DE NOPAL TUNERO (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) EN MÉXICO / ETIOLOGY OF CLADODE THICKENING OF PRICKLY PEAR CACTUS (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) IN MEXICO
 Fernando **Martínez-Salgado**, Jesús **Pérez-Moreno**, Daniel L. **Ochoa-Martínez**, Reyna I. **Rojas-Martínez**, Gregorio **Arellano-Ostoa** 521
- ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM HIERBA SANTA (*Piper auritum*) AND JARILLA (*Baccharis glutinosa*) AGAINST *Fusarium* spp. / ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE HIERBA SANTA (*Piper auritum*) Y JARILLA (*Baccharis glutinosa*) CONTRA *Fusarium* spp.
 César Chacón, Johana **Miranda-Granados**, Nancy **Ruiz-Lau**, Selene **Lagunas-Rivera**, Víctor M. **Ruiz-Valdiviezo**, Federico A. **Gutiérrez-Miceli** 531

Recursos Naturales Renovables / Natural Renewable Resources

- CRECIMIENTO DE *Pinus cembroides* ZUCC. EN VIVERO EN DIVERSOS SUSTRATOS Y FERTILIZANTES / NURSERY GROWTH OF *Pinus cembroides* ZUCC. IN DIVERSE SUBSTRATES AND FERTILIZERS
 Rosa E. **Madrid-Aispuro**, José Á. **Prieto-Ruiz**, Arnulfo **Aldrete**, José C. **Hernández-Díaz**, Christian **Wehenkel**, Jorge A. **Chávez-Simental** 539
- DENSIDAD INICIAL EN EL RENDIMIENTO MADERABLE Y BIOMASA DE *Pinus patula* CON ESPECIES LATIFOLIADAS / INITIAL DENSITY IN THE TIMBER YIELD AND BIOMASS OF *Pinus patula* WITH HARDWOOD SPECIES
 Agustín **Ramírez-Martínez**, Héctor M. **De los Santos-Posadas**, Gregorio **Ángeles-Pérez**, Manuel J. **González-Guillén**, Wenceslao **Santiago-García** 555

Socioeconomía / Socioeconomics

FACTIBILIDAD DE COBERTURA DEL PRECIO DE MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.) EN MÉXICO CON EL MERCADO DE FUTUROS FORÁNEO DE EE. UU. / MEXICAN CORN (<i>Zea mays</i> L.) PRICE HEDGE FEASIBILITY WITH THE US FOREIGN FUTURES MARKET M. Ángel Martínez-Damián , J. de Jesús Brambila-Paz , J. Saturnino Mora-Flores	575
PRECIOS, COSTOS Y LA OPCIÓN REAL DE EXPANDIR LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE HUEVO COMERCIAL EN MÉXICO / PRICES, COSTS AND THE REAL OPTION TO EXPAND THE COMMERCIAL EGG PRODUCTION UNIT IN MEXICO Verónica Pérez-Cerecedo , José de J. Brambila-Paz , Jaime A. Matus-Gardea , Daniel Barrera-Islas , Adrián González-Estrada , Marcos Portillo-Vázquez	589

POTENCIAL FUNCIONAL Y NUTRACÉUTICO DE HOJAS DE CAFÉ INJERTADO (*Coffea* spp.) DURANTE UN CICLO ANUAL

FUNCTIONAL AND NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF GRAFTED COFFEE (*Coffea* spp.) LEAVES DURING AN ANNUAL CYCLE

Tania Marín-Garza¹, Fernando C. Gómez-Merino², Libia I. Trejo-Téllez³, Miriam C. Pastelín-Solano¹, Odón Castañeda-Castro^{1*}

¹Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Prolongación de Oriente 6 No. 1009. 94340. Orizaba, Veracruz. (tamarin@uv.mx), (mpastelin@uv.mx), (odcastaneda@uv.mx). ² Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Manuel León. 94946 Amatlán de los Reyes, Veracruz. (fernandg@colpos.mx). ³Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. 56230 Montecillo, México. (tlibia@colpos.mx).

RESUMEN

Compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, cafeína, azúcares, vitaminas, minerales y sustancias volátiles que son componentes principales del café (*Coffea* spp.) tienen funciones biológicas, calificadas como nutraceuticas e insecticidas. En al menos una etapa fenológica, las hojas de café tienen mayores posibilidades de utilizarse con propósitos comerciales. El objetivo de este estudio fue analizar el área foliar, contenido de clorofila *a*, *b* y total, cafeína, ácido clorogénico (5-CGA), azúcares y macro y micronutrientes en hojas de café arábica (*Coffea arabica*) var. Caturra rojo injertado sobre café robusta (*Coffea canephora*) var. Romex durante un ciclo anual. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para un experimento factorial. El muestreo de 10 árboles fue completamente al azar, las muestras se corrieron por triplicado. Los valores mayores se presentaron como sigue: área foliar en la etapa de floración y fructificación; clorofila *a*, *b* y total durante la etapa vegetativa; cafeína en la etapa de floración; 5-CGA se obtuvo durante la etapa vegetativa, en la cual también se observaron las concentraciones mayores de glucosa y fructosa. La concentración de macronutrientes, excepto Mg, fue mayor durante la etapa de fructificación, mientras que las de Fe y Zn fueron mayores durante la floración y Mn y B en fructificación. Los macro y micronutrientes se acumularon durante la etapa de fructificación. Las hojas de café pueden ser funcionales y nutraceuticos durante las etapas vegetativa y fructificación.

Palabras clave: carbohidratos, nutrientes, *Coffea*, cafeína, clorofila, ácido clorogénico.

ABSTRACT

Phenolic compounds, such as chlorogenic acid, caffeine, sugars, vitamins, minerals and volatile substances are major compounds of coffee (*Coffea* spp.). They perform distinctive biological functions and are classified as nutraceuticals and insecticides. In at least one phenological stage, coffee leaves are more likely to be used for commercial purposes. The objective of this study was to analyze leaf area, content of chlorophyll *a*, *b* and total, caffeine, chlorogenic acid (5-CGA), sugars and macro and micronutrients in arabica coffee leaves (*Coffea arabica*) var. Caturra rojo grafted on robusta coffee (*Coffea canephora*) var. Romex during an annual cycle. An analysis of variance (ANOVA) was performed with the obtained data and the means were compared by the Tukey's test ($p \leq 0.05$) for a factorial experiment. Sampling of 10 trees was done completely at random, and the samples were run in triplicate. The largest values occurred as follows: leaf area in the blooming and fruiting stage; chlorophyll *a*, *b* and total during the vegetative stage; caffeine in the blooming stage; 5-CGA was obtained during the vegetative stage, in which we observed the highest concentrations of glucose and fructose. The concentration of macronutrients, except Mg, was higher during the fruiting stage, while Fe and Zn were higher during blooming and Mn and B in fruiting. Macro and micronutrients accumulated during the fruiting stage. Coffee leaves may be both functional and nutraceutical during the vegetative and fruiting stages.

Key words: carbohydrates, nutrients, *Coffea*, caffeine, chlorophyll, chlorogenic acid.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2018. Aprobado: septiembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 459-469. 2020.

INTRODUCCIÓN

Las dos especies de café con mayor importancia económica internacional son arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*C. canephora*). México es el décimo productor de café en el mundo, por su topografía, altitudes, clima y suelo. En 15 entidades federativas y 480 municipios de México se produce café de buena calidad. El estado de Veracruz es el segundo lugar nacional con 24% de la producción (OIC, 2019).

Las variedades más cultivadas de la especie arábica en el estado de Veracruz son: Caturra, Typica, Garnica y Bourbon (Hernández-Solabac *et al.*, 2011). Algunos productores, principalmente en la región de Huatusco, injertan las variedades de café arábica sobre patrones de café robusta, debido a que esta especie tiene una raíz abundante que tolera la presencia de nematodos en los suelos (Hernández-Martínez *et al.*, 2013).

El área foliar se relaciona con características como el crecimiento vegetativo, eficiencia fotosintética, el uso de nutrimentos y sobre todo con la asimilación de carbono durante el ciclo de vida de la planta (Montoya-Restrepo *et al.*, 2017). Moléculas orgánicas, como la clorofila *a*, *b*, y las proteínas solubles totales, se utilizan como estimadores de la fotosíntesis, por eso su aumento estimula un incremento de la tasa fotosintética y el contenido de carbohidratos solubles (San Clemente y Peña, 2008).

La cafeína es el principal alcaloide en el café, se encuentra en toda la planta, incluyendo en la pulpa de frutos, raíces y hojas (Hečimović *et al.*, 2011). Los compuestos bioactivos interesan a la industria farmacológica porque son fuente de compuestos nutraceuticos que poseen actividad antioxidante como los ácidos clorogénicos. Sin embargo, hay muchos factores que las plantas requieren para completar funciones específicas en el metabolismo, activar reacciones enzimáticas y constituir estructuras orgánicas (Bustos *et al.*, 2008). El ácido cafeoilquinico acid (CQA) es uno de los ácidos clorogénicos más representativos tanto en café arábica como en robusta (Fortunato *et al.*, 2010).

En algunos cultivos el llenado de los frutos y granos se caracteriza por modificaciones en el metabolismo de los carbohidratos no estructurales, el que puede limitarse por la actividad fotosintética de la planta (Maqueira-López *et al.*, 2016).

INTRODUCTION

The two species of coffee with the highest international economic importance are arábica (*Coffea arabica*) and robusta (*C. canephora*). Mexico is the tenth largest coffee producer in the world, due to its topography, altitudes, climate and soil. Good quality coffee is produced in 15 states and 480 municipalities in Mexico. Veracruz is the second producer state with 24% of the national production (OIC, 2019).

The most cultivated varieties of the arábica species in the state of Veracruz are: Caturra, Typica, Garnica and Bourbon (Hernández-Solabac *et al.*, 2011). Some producers, mainly in the Huatusco region, graft arábica coffee varieties on robusta coffee patterns because this species has an abundant root that tolerates the presence of nematodes in the soil (Hernández-Martínez *et al.*, 2013).

The leaf area is related to traits such as plant growth, photosynthetic efficiency, the use of nutrients, and especially with the assimilation of carbon during the life cycle of the plant (Montoya-Restrepo *et al.*, 2017). Organic molecules, such as chlorophyll *a*, *b*, and total soluble proteins are used as estimators of photosynthesis, therefore their increase stimulates a rise in the photosynthetic rate and content of soluble carbohydrates (San Clemente and Peña, 2008).

Caffeine is the main alkaloid in coffee, and is found throughout the plant, including fruit pulp, roots and leaves (Hečimović *et al.*, 2011). Bioactive compounds are of interest to the pharmacological industry because they are a source of nutraceutical compounds that possess antioxidant activity, as chlorogenic acids do. However, there are many factors that plants require to complete specific metabolic functions, activate enzymatic reactions and constitute organic structures (Bustos *et al.*, 2008). The caffeoylquinic acid (CQA) is one of the most representative chlorogenic acids in both arábica and robusta coffee (Fortunato *et al.*, 2010).

In some crops, the filling of fruits and grains is characterized by modifications in the metabolism of non-structural carbohydrates, which can be limited by the photosynthetic activity of the plant (Maqueira-López *et al.*, 2016).

Nutrients fulfill essential functions in plant metabolism as activators of enzymatic reactions, and part of organic structures and osmoregulators

Los nutrimentos cumplen funciones esenciales en el metabolismo de las plantas como activadores de reacciones enzimáticas, constituyentes de estructuras orgánicas, y osmorreguladores (Bustos *et al.*, 2008). Éstos varían por causas como el crecimiento de la planta y su disponibilidad en el suelo, lo que produce una mayor concentración o una dilución nutrimental en los tejidos de la planta (Sadeghian y Salamanca, 2015).

Durante las distintas etapas fenológicas del cultivo es probable que la hoja del café presente niveles diferentes de compuestos químicos. El objetivo de este estudio fue analizar el área foliar, clorofilas, concentraciones de cafeína, ácido clorogénico (5-CGA), carbohidratos, macro y micronutrimentos en hojas de *C. arabica* var. Caturra rojo injertado sobre *C. canephora* var. Romex, durante un ciclo anual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones del experimento

El material vegetal del estudio fueron injertos de café arábica (*C. arabica*) var. Caturra, sobre café robusta (*C. canephora*) var. Romex con cinco años de edad de la finca La Laja, establecidas en la congregación La Laja, municipio de Tlaltetela, Veracruz, México (19° 17' 10.8" N, 96° 56' 51.9" O y altitud de 1250 m). Las plantas se cultivaron con sombra manejada para dar paso al 70% de la radiación solar aproximadamente, con el método tradicional selectivo de plantaciones (siembra, fertilización y poda) de 2000 a 2500 arbustos ha⁻¹ en suelos tipo cambisol.

Las etapas del ciclo anual evaluadas fueron: vegetativa (enero), floración (abril) y fructificación (noviembre) en 10 plantas obtenidas al azar durante enero y noviembre. En esos meses la precipitación promedio fue 46 y 358 mm, respectivamente, y la precipitación anual fue 1964 mm. La temperatura promedio mínima fue 9.0 °C (febrero) y la máxima 35.0 °C (marzo y abril), mientras que en noviembre, la temperatura mínima promedio fue 9 °C y máxima promedio 21 °C. La humedad relativa fue 59 y 98% (Estación Climatológica de Huatusco, clave clicom: 30342).

Área foliar y cuantificación de clorofilas

El área foliar se analizó con el instrumento óptico Medidor de Área Foliar (CID-Biociencia, modelo CI-202 Camas, WA, EE.UU.) que determina indirectamente el índice de área foliar (IAF) en cm² (CID, 2012).

(Bustos *et al.*, 2008). These vary due to the growth of the plant and their availability in the soil, producing a higher concentration or a nutritional dilution in plant tissues (Sadeghian and Salamanca, 2015).

During the different phenological stages of cultivation, the coffee leaf is likely to present different levels of chemical compounds. The objective of this study was to analyze the leaf area, chlorophylls, caffeine concentrations, chlorogenic acid (5-CGA), carbohydrates, macro and micronutrients in leaves of *C. arabica* var. Caturra rojo grafted on *C. canephora* var. Romex during an annual cycle.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and experiment conditions

Vegetal material in the study were grafts of arabica coffee (*C. arabica*) var. Caturra rojo, on five years old robusta coffee (*C. canephora*) var. Romex plants from La Laja farm established at locality La Laja, Tlaltetela municipality, Veracruz, Mexico (19° 17' 10.8" N, 96° 56' 51.9" W, at an altitude of 1250 m). Plants were cultivated under managed shading, 70% of the solar radiation allowed through, following the traditional selective plantation method (sowing, fertilization and pruning) of 2000 to 2500 shrubs ha⁻¹ in cambisol type soils.

The stages of the annual cycle evaluated were vegetative (January), blooming (April) and fruiting (November) in 10 plants obtained at random during January and November. In those months average precipitation was 46 and 358 mm, respectively, and annual precipitation was 1964 mm. The minimum average temperature was 9.0 °C (February) and the maximum was 35.0 °C (March and April), while in November the average minimum temperature was 9 °C and the average maximum was 21 °C. Relative humidity was 59 and 98% (Huatusco Climatic Station, clicom code: 30342).

Leaf area and chlorophyll quantification

The leaf area was analyzed with the optical instrument Leaf Area Meter (CID-Biociencia, model CI-202 Camas, WA, USA) that indirectly determines the leaf area index (IAF) in cm² (CID, 2012).

The *a*, *b* and total chlorophyll content was measured in mature coffee leaves placed in 80% acetone until maceration (24 h). Chlorophyll content was expressed based on the weight of fresh biomass (PBS) and measured with a spectrophotometer (ThermoFisher, Genesys 10S UV-VIS Madison model, WI, USA) at an absorbance of 645 and 665 nm.

El contenido de clorofila *a*, *b* y total se midió en hojas maduras de café que se colocaron en acetona al 80% hasta su maceración (24 h). El contenido de clorofila se expresó con base en el peso de biomasa fresca (PBS) y se midió con un espectrofotómetro (ThermoFisher, modelo Genesys 10S UV-VIS Madison, WI, EUA) a una absorbancia de 645 y 665 nm.

El contenido de clorofila *a*, *b* y total se obtuvo con la fórmula:

$$\text{Clorofila } a = [12.7 (A663) - 2.69 (A645)] * V / (1000 * W)$$

$$\text{Clorofila } b = [22.9 (A645) - 4.68 (A663)] * V / (1000 * W)$$

$$\text{Clorofila total} = [20.2 (A645) + 8.20 (A663)] * V / 100 * W$$

donde, A: absorbancia, V: volumen final del extracto, y W: peso fresco de la muestra en g.

Contenidos de cafeína y ácido clorogénico (5-CQA)

La cafeína se extrajo con un termoreactor (Hach, modelo DRB200 Loveland, CO, EUA) a 135 °C por 5 min. La cuantificación se realizó en un HPLC Dionex ICS3000 equipado con un detector UV/VIS a una longitud de onda de 272 nm con una fase móvil isocrática compuesta de 75% agua grado HPLC y 25% metanol acidificado con H₃PO₄, que además aplicó un flujo de 1.5 mL min⁻¹, en una columna 120 C18 5 μm 4.6 × 150 mm (ThermoFisher® modelo Acclaim™, Sunnyvale, CA, EUA) con H₃PO₄, y las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso de la materia seca (% PMS).

La curva de calibración de cafeína se construyó con ocho puntos de concentración, por duplicado para comprobar la linealidad del método (0.1, 0.08, 0.065, 0.05, 0.04, 0.02 y 0.005%). Para la curva de calibración se utilizó cafeína ≥99% CAS 58-08-2 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO 63103, EUA).

El ácido clorogénico (5-CQA) se cuantificó por HPLC-UV/VIS en un equipo (Dionex, modelo ICS3000; San José, CA, EUA) con un detector UV/VIS a una longitud de onda de 325 nm con una fase móvil isocrática con 75% agua grado HPLC y 25% metanol acidificado con H₃PO₄, con un flujo 1.2 mL min⁻¹, en una columna fase reversa C18 5 μm 4.6 × 150 mm (ThermoFisher®, modelo Acclaim™ 120, Sunnyvale, CA, EUA) y una guarda columna C18 5 μm, 10 × 2 mm (Agilent, modelo ZORBAX Santa Clara, CA, EUA).

Los resultados se expresaron como porcentaje de peso de la materia seca (% PMS). Las curvas de calibración se realizaron con ocho puntos de concentración, por duplicado para comprobar la linealidad del método (0.1, 0.08, 0.065, 0.05, 0.04, 0.02 y 0.005%). Para la curva de calibración, se utilizó ácido clorogénico ≥95% CAS 327-97-9 (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EUA).

The *a*, *b* and total chlorophyll content was obtained with the formula:

$$\text{Chlorophyll } a = [12.7 (A663) - 2.69 (A645)] * V / (1000 * W)$$

$$\text{Chlorophyll } b = [22.9 (A645) - 4.68 (A663)] * V / (1000 * W)$$

$$\text{Total chlorophyll} = [20.2 (A645) + 8.20 (A663)] * V / 100 * W$$

where, A: absorbance, V: final volume of the extract, and W: fresh weight of the sample in g.

Caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) contents

Caffeine was extracted using a thermoreactor (Hach, DRB200 Loveland model, CO, USA) at 135 °C for 5 min. Quantification was performed on a Dionex ICS3000 HPLC equipped with a UV/VIS detector at a wavelength of 272 nm. It included an isocratic mobile phase composed of 75% HPLC grade water and 25% H₃PO₄ acidified methanol, which also applied a flow of 1.5 mL min⁻¹ on a 120 C18 5 μm 4.6 × 150 mm column (ThermoFisher® model Acclaim™, Sunnyvale, CA, USA) with H₃PO₄; samples were made in triplicate. Results were expressed as a percentage of dry matter weight (% PMS).

The caffeine calibration curve was obtained with eight concentration points in duplicate to check the linearity of the method (0.1, 0.08, 0.065, 0.05, 0.04, 0.02, and 0.005%). Caffeine ≥99% CAS 58-08-2 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO 63103, USA) was used for the calibration curve.

For the quantification of chlorogenic acid (5-CQA) we used HPLC-UV/VIS in a kit (Dionex, model ICS3000; San José, CA, USA), with a UV/VIS detector at a wavelength of 325 nm. It included a mobile isocratic phase with 75% HPLC grade water and 25% H₃PO₄ acidified methanol, plus a flow of 1.2 mL min⁻¹, on a reversed phase C18 5 μm 4.6 × 150 mm column (ThermoFisher®, model Acclaim™ 120, Sunnyvale, CA, USA) and a C18 5 μm, 10 × 2 mm column guard (Agilent, model ZORBAX Santa Clara, CA, USA). Results were expressed as a percentage of dry matter weight (% PMS).

The calibration curve was obtained with eight concentration points in duplicate to check the linearity of the method (0.1, 0.08, 0.065, 0.05, 0.04, 0.02, and 0.005%). For the calibration curve, we used chlorogenic acid ≥95% CAS 327-97-9 (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA).

Quantification of reducing sugars

Reducing sugars were quantified by using a Dionex ICS3000 HPLC equipped with an electrochemical detector and PA1 2×250 mm column (ThermoFisher®, model CarboPac, Sunnyvale, CA, USA) plus an isocratic flow of 0.5 mL min⁻¹ with HPLC grade water as mobile phase and 300 mM NaOH

Cuantificación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se realizó en un HPLC Dionex ICS3000 equipado con un detector electroquímico y columna PA1 2 × 250 mm (ThermoFisher®, modelo CarboPac, Sunnyvale, CA, EUA) más un flujo isocrático de 0.5 mL min⁻¹ con agua grado HPLC como fase móvil y NaOH 300 mM para la reacción electroquímica postcolumna. Los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso de la materia seca (% PMS). La curva de calibración se construyó con estándares de arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa y fructuosa ≥95%, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) en nueve concentraciones (0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1, 2, 3, 4 y 5%).

Análisis de minerales

Las concentraciones de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Fe y B se determinaron con espectrofotometría de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (Agilent ICP-AES, modelo 725-ES; Victoria, Australia), en tanto que el contenido de N se cuantificó por el método micro-Kjeldahl. Los resultados se expresaron en g kg⁻¹ para macronutrientes y mg kg⁻¹ para micronutrientes.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones en un diseño unifactorial donde el factor fue las etapas del ciclo anual, y tres repeticiones por variable analizada. Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) con prueba de comparación de Tukey ($p \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Área foliar y cuantificación de clorofilas

En las variables analizadas las plantas de café mostraron diferencias estadísticas significativas entre las etapas del ciclo anual. El área foliar mayor correspondió a las etapas de floración, con 48.91 cm² y fructificación, con 48.52 cm² en plantas de *C. arabica* var. Caturra rojo injertadas sobre *C. canephora* var. Romex (Figura 1).

Durante la etapa vegetativa se encontró la mayor concentración de clorofila *a* (1.491 mg g⁻¹ PBF), *b* (0.96 mg g⁻¹ PBF) y total (1.81 mg g⁻¹ PBF) (Figura 2).

En hojas de café robusta, Marín-Garza *et al.* (2018) encontraron los valores más altos de área

for the post-column electrochemical reaction. The analyses were performed in triplicate. Results were expressed as a percentage of dry matter weight (% PMS). The calibration curve was built using arabinose, galactose, glucose, xylose and fructose standards ≥95%, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in nine concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1, 2, 3, 4 and 5%).

Mineral analysis

Concentrations of P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Fe and B were determined with coupled plasma induction atomic emission spectrophotometry (Agilent ICP-AES, model 725-ES; Victoria, Australia), and the N content was measured using the micro-Kjeldahl method. Results were expressed in g kg⁻¹ for macronutrients and mg kg⁻¹ for micronutrients.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with 10 repetitions in a unifactorial design where the factor was the stages in the annual cycle, and three replications per analyzed variable. Then we performed an Analysis of Variance (ANOVA) and the Tukey's comparison test ($p \leq 0.05$) with the SAS statistical software (SAS Institute, 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf area and chlorophyll quantification

In the analyzed variables, the coffee plants showed significant statistical differences among the stages of the annual cycle. The largest leaf area corresponded to the blooming (48.91 cm²) and fruiting (48.52 cm²) stages in *C. arabica* var. Caturra rojo grafted on *C. canephora* var. Romex (Figure 1).

During the vegetative stage, we found the highest concentration of chlorophyll *a* (1.491 mg g⁻¹ PBF), *b* (0.96 mg g⁻¹ PBF) and total (1.81 mg g⁻¹ PBF) (Figure 2).

In robusta coffee leaves, Marín-Garza *et al.* (2018) found the highest values of leaf area after the start and during of the blooming stage, which coincides with our results. This is because one of the functions of the leaves is to protect the buds, flowers and fruits from radiation and adverse weather conditions (Rodríguez-Cabello *et al.*, 2015). Production and fruiting are related to the increase in the leaf area of the trees during the blooming and fruiting stages in coffee, and for each 100 cm² of plant leaf area there is an increase of 2.37 g of green cherry coffee (Montoya-Restrepo *et al.*, 2017).

foliar después del inicio y durante la floración, lo cual coincide con nuestros resultados. Esto se debe a que una de las funciones de las hojas es proteger a las yemas, flores y frutos de la radiación y condiciones climáticas adversas (Rodríguez-Cabello *et al.*, 2015). La producción y fructificación se relacionan con el aumento del área foliar de los árboles durante la etapa de floración y fructificación en café y por cada 100 cm² de área foliar en la planta hay un incremento de 2.37 g de café cereza verde (Montoya-Restrepo *et al.*, 2017).

Las plantas de café expuestas a intensidad de luz menor presentan el contenido mayor de clorofila (Encalada-Córdova *et al.*, 2016), lo cual coincide con lo encontrado por Marín-Garza *et al.* (2018) en café robusta cuya concentración mayor de clorofilas fue durante la etapa vegetativa, al igual que en café injertado donde la concentración más alta de clorofilas (*a*, *b* y total) fue en la etapa vegetativa muestreada en enero.

Contenido de cafeína y ácido clorogénico (5-CQA)

El contenido de cafeína y ácido clorogénico (5-CQA) en las hojas de café mostró diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$). La concentración mayor de cafeína

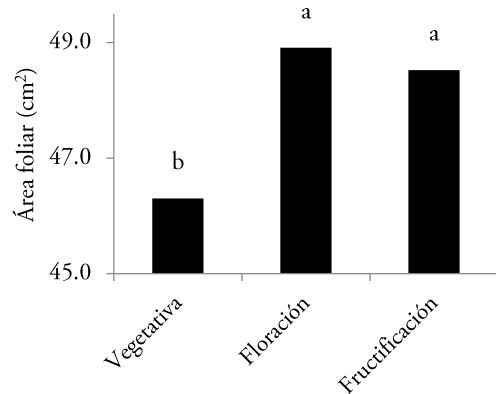


Figura 1. Área foliar de plantas de injerto de café *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México. Letras distintas en cada columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 1. Leaf area of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico. Different letters indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

Coffee plants exposed to a lower light intensity have the highest chlorophyll content (Encalada-Córdova *et al.*, 2016), which coincides with that found by Marín-Garza *et al.* (2018) in robusta

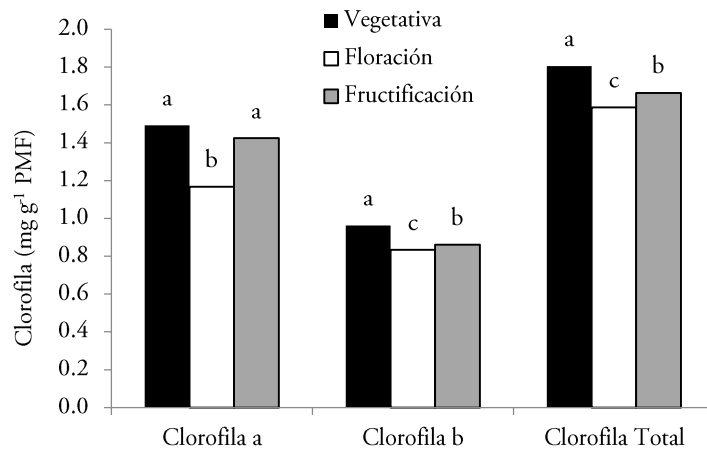


Figura 2. Concentración de clorofilas en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México. Letras distintas indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 2. Chlorophyll concentration in graft leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the stages of the annual cycle in Tlaltetela, Veracruz, Mexico. Different letters indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

(0.97%) se encontró en la etapa de floración, y de 5-CQA (0.69%) la concentración mayor se obtuvo en la etapa vegetativa (Cuadro 1).

En hojas de café arábica de diferentes edades Chen *et al.* (2018) encontraron concentraciones de 0.89% de cafeína en hojas jóvenes, la cual disminuyó con la madurez de la hoja hasta llegar a concentraciones de 0.54% de cafeína. En esta investigación se muestrearon hojas del tercer par después de las hojas apicales, aquellas ya estaban en madurez. Por lo tanto, es probable que se encuentren aun concentraciones mayores de cafeína en hojas jóvenes de plantas de café injertado. Campa *et al.* (2017) observaron que la intensidad de luz interfiere con el contenido de ácidos clorogénicos y clorofila en hojas de café arábica.

Chen *et al.* (2018) encontraron que la edad de la hoja del café arábica no afectó las concentraciones del 5-CQA (2.1 a 0.26%). Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestra investigación, la etapa fenológica del cultivo afecta las concentraciones del 5-CQA en los injertos en plantas de café. La concentración mayor de 5-CQA se encontró en la etapa vegetativa (0.69%), probablemente porque para iniciar la floración en las plantas se requieren niveles elevados de ácidos clorogénicos, por lo tanto la concentración de estos ácidos aumenta, poco antes de la floración (Çtrak *et al.*, 2007).

Contenido de azúcares

Durante la etapa vegetativa, las hojas de café injertado presentaron concentraciones mayores en glucosa (10.48%) y fructuosa (0.99%) (Cuadro 2). Los contenidos de arabinosa, galactosa y xilosa no presentaron diferencias estadísticas entre la etapa vegetativa y la fructificación. Pero hubo una disminución durante la etapa de floración en todos los azúcares en las hojas de las plantas de café injertado.

La disminución de azúcares en las hojas, principalmente glucosa y fructuosa, se debe a su función en el mantenimiento y desarrollo de tejidos no fotosintéticos como flores y frutos (Rennie y Turgeon, 2009). Los metabolitos primarios como azúcares mostraron un aumento constante en flores y una disminución en hojas durante la floración de *Camellia sinensis*, lo cual se tradujo en un aumento de la concentración de cafeína en hojas y su disminución en flores. Entre el contenido de azúcares y la cafeína hay una correlación negativa (Jia *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Contenido porcentual de cafeína y ácido clorogénico (5-CQA) en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México.

Table 1. Percentage content of caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) in leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico.

Etapa	Cafeína	5-CQA
	%	
Vegetativa	0.72 b	0.69 a
Floración	0.97 a	0.65 b
Fructificación	0.68 c	0.27 c

Medias con letra distinta en una hilera indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). Los valores se presentan como porcentajes con base en el peso de materia seca (PMS) ♦ Means with different letter in a row indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$). Values are presented as percentages based on the weight of dry biomass (PMS).

coffee, whose highest concentration of chlorophylls occurred during the vegetative stage. As well as in grafted coffee where the highest concentration of chlorophylls (*a*, *b* and total) was recorded in the vegetative stage sampled in January.

Caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) contents

The content of caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) in the coffee leaves showed statistical differences ($p \leq 0.05$). We found the highest concentration of caffeine (0.97%) in the blooming stage, and the highest 5-CQA (0.69%) in the vegetative stage (Table 1).

In Arabica coffee leaves of different ages Chen *et al.* (2018) found concentrations of 0.89% caffeine in young leaves, which decreased with leaf maturity until reaching concentrations of 0.54% caffeine. In this study, we sampled leaves of the third pair (after the apical leaves), which were already mature. Therefore, even higher concentrations of caffeine are likely to be found in young leaves of grafted coffee plants. Campa *et al.* (2017) observed that light intensity interferes with the content of chlorogenic acids and chlorophyll in *Coffea arabica* leaves.

Cuadro 2. Contenido porcentual de azúcares reductores en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México.

Table 2. Percentage content of reducing sugars in graft leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico.

Etapa	Arabinosa	Galactosa	Glucosa %	Xilosa	Fructosa
Vegetativa	3.69 ab	2.43 a	10.48 a	2.71 ab	0.99 a
Floración	3.14 b	2.12 a	2.45 b	2.36 b	0.66 b
Fructificación	4.12 a	2.21 a	1.94 c	3.10 a	0.49 c

Medias con letra distinta en cada columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). Los valores se calcularon como porcentaje con base en el peso de biomasa seca (PMS) ♦ Means with different letters in each column indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$). Values were calculated as a percentage based on the dry biomass weight PMS.

Concentraciones nutrimentales en hojas

La concentración mayor de macronutrientes, excepto Mg se presentó durante la etapa de fructificación y la concentración menor fue en la etapa vegetativa (Figura 3).

Durante la etapa de floración se presentó la concentración mayor de Fe ($123.05 \text{ mg kg}^{-1}$) y Zn (10.90 mg kg^{-1}). En la etapa de fructificación el Cu (7.75 mg kg^{-1}), Mn ($205.20 \text{ mg kg}^{-1}$) y B (25.65 mg kg^{-1}) destacaron de la planta. Durante la etapa vegetativa las hojas de café presentaron la concentración menor de todos los micronutrientes analizados (Figura 4).

Marín-Garza *et al.* (2018), en hojas de café Romex, observaron que las concentraciones mayores de N, P y K en la etapa de fructificación fue similar a los resultados obtenidos en nuestro experimento; sin embargo, las concentraciones de Ca y Mg fueron más altas durante la floración. Marín *et al.* (2000) observaron que en árboles de guayabo hay diferencias entre variedades e injertos de esas variedades, principalmente por la interacción que existe en las características de la combinación vástago - patrón y el ambiente.

Las hojas finalizan su expansión y durante el inicio de la fructificación, los nutrientes se acumulan en las hojas porque éstas se convierten en exportadores probables de nutrientes minerales y fotoasimilados hacia los frutos (Ramírez *et al.*, 2002) lo cual coincide con lo encontrado en hojas de café injerto. De acuerdo con Reis *et al.* (2009), debido al agotamiento

Chen *et al.* (2018) found that the age of the *Coffea arabica* leaf did not affect the concentrations of 5-CQA (2.1 to 0.26%). However, according to the results obtained in our research, the phenological stage of the crop affects the concentrations of 5-CQA acid in the coffee plant grafts. The highest concentration of 5-CQA was found in the vegetative stage (0.69%), probably because high levels of chlorogenic acids are required to start blooming in plants; therefore, these acids concentration increases just before blooming (Çırak *et al.*, 2007).

Sugars content

During the vegetative stage, grafted coffee leaves showed higher concentrations of glucose (10.48%) and fructose (0.99%) (Table 2). Arabinose, galactose and xylose contents showed no statistical differences between the vegetative stage and fruiting. But there was a decrease in all sugars during the blooming stage in the leaves of grafted coffee plants.

Sugar decreases in leaves, mainly glucose and fructose, is due to their role in maintenance and development of the non-photosynthetic tissues such as flowers and fruits (Rennie and Turgeon, 2009). The primary metabolites such as sugars showed a constant increase in flowers and a decrease in leaves during the *Camellia sinensis* blooming, which resulted in an increase in the concentration of caffeine in leaves and a decrease in flowers. There is a negative correlation between sugar content and caffeine (Jia *et al.*, 2016).

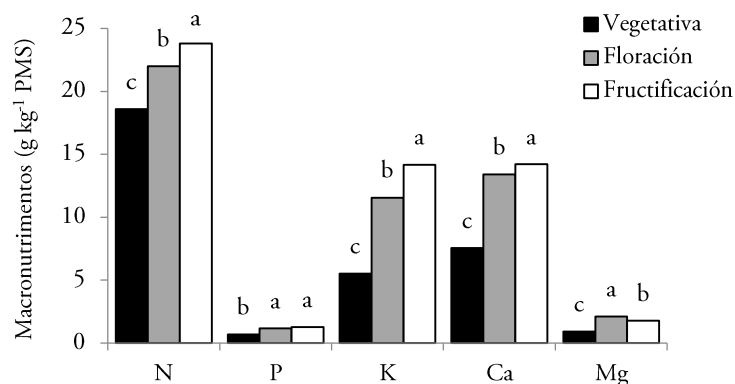


Figura 3. Concentración de macronutrientes en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México. Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). Peso de materia seca (PMS).

Figure 3. Macronutrient concentration in leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico. Different letters in each column indicate significant statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$). Dry biomass weight (PMS).

de las reservas foliares de nutrimentos en especial el N y K, el café tiene un año de producción mayor, seguido por uno de producción baja, por la relación fuerte que tienen los nutrimentos de la hoja al fruto.

Bustos *et al.* (2008) mencionaron que los minerales tienen funciones determinadas en el metabolismo de las plantas, que van desde osmorreguladores, constituyentes de estructuras orgánicas, hasta activadores de reacciones enzimáticas. Por lo tanto, la de Fe en cloroplastos, mitocondrias y citosol es mayor durante etapas diferentes del melocotón (Song *et al.*, 2016); esto concuerda con nuestros resultados en que

Nutritional concentrations in leaves

The highest concentration of macronutrients, except Mg, occurred during the fruiting stage and the lowest in the vegetative stage (Figure 3).

During the blooming stage, the highest concentration of Fe ($123.05 \text{ mg kg}^{-1}$) and Zn (10.90 mg kg^{-1}) occurred. In the fruiting stage, Cu (7.75 mg kg^{-1}), Mn ($205.20 \text{ mg kg}^{-1}$) and B (25.65 mg kg^{-1}) stood out. During the vegetative stage, the coffee leaves presented the lowest concentration of all the micronutrients analyzed (Figure 4).

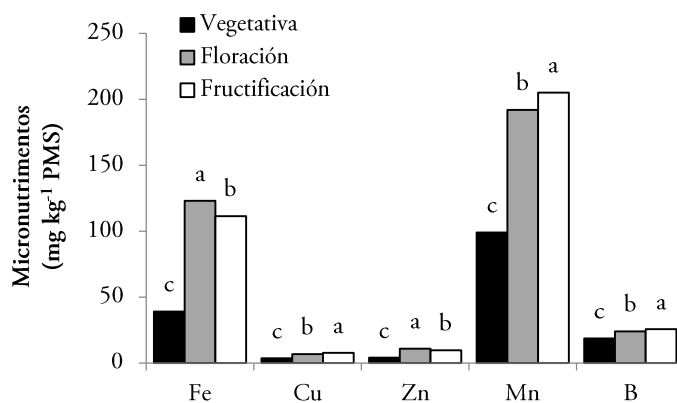


Figura 4. Concentración de micronutrientes en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México. Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0.05$). Peso de materia seca (PMS).

Figure 4. Concentration of micronutrients in leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico. Different letters in each column indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$). Dry biomass weight (PMS).

la concentración mayor de Fe y el Zn fue durante la floración.

En las hojas de café injerto las variaciones también se deben probablemente a los requerimientos nutrimentales diferentes de las etapas fenológicas en el ciclo anual de la planta. Sadeghian y Salamanca (2015) observaron que la concentración de micronutrientes, como Cu, Mn y B en hojas de café, aumentó de la floración a la cosecha. Estos nutrientes se caracterizan por ser de movilidad baja vía floema y su migración va desde el tercer o cuarto par de hojas que se muestrean en café hacia los frutos. La migración principal de nutrientes foliares hacia los frutos ocurre desde las hojas más cercanas hasta las drupas (o cerezas).

CONCLUSIONES

Las hojas de café durante la fructificación y en la etapa vegetativa tienen mayor probabilidad de utilizarse con fines nutraceuticos y funcionales porque el área foliar, contenido de clorofila, ácido clorogénico (5-CQA), glucosa y fructuosa son mayores.

La concentración mayor de cafeína, Mg, Fe y Zn fue en la floración, y en la etapa de fructificación se observó el contenido más alto de arabinosa, xilosa N, P, K, Ca, Cu Mn y B.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada a la investigación (No. 445756) y a la finca "La Laja", Tlaltetela, Veracruz; por el material vegetal donado.

LITERATURA CITADA

- Bustos, F., M. González, P. Donoso, V. Gerding, C. Donoso, y B. Escobar 2008. Efecto de distintas dosis de fertilización de liberación controlada (Osmocote®) en el desarrollo de plantas de coigüe, raulí y ulmo. *Rev. Bosque* 29: 155-161.
- Campa, C., L. Urban, L. Mondolot, D. Fabre, S. Roques, S. Roques, Y. Lizzi, J. Aarouf, S. Doulebeau, J. C. Breitler, C. Letrez, L. Toniutti, B. Bertrand, P. La Fisca, L. P. R. Bidet, and H. Étienne. 2017. Juvenile coffee leaves acclimated to low light are unable to cope with a moderate light increase. *Front. Plant Sci.* 8: 1-16.
- Chen, X. M., Z. Ma, and D. D. Kitts. 2018. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. *Food Chem.* 240: 143-153.
- Çırak, C., J. Radušienė, V. Janulis, and L. Ivanauskas. 2007. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. *Bot. Helvetica* 117: 29-36.

Marín-Garza *et al.* (2018) observed in Romex coffee leaves that the highest concentration of N, P and K in the fruiting stage was similar to the results obtained in our experiment; however, Ca and Mg concentrations were higher during blooming. Marín *et al.* (2000) observed that in guava trees there are differences between varieties and grafts of these varieties, mainly due to the interaction between the stem-pattern combination and the environment.

Once the leaves finish their expansion, and at the beginning of the fruiting stage, nutrients accumulate in the leaves. This occurs because leaves become probable exporters of mineral nutrients and are photoassimilated towards the fruits (Ramírez *et al.*, 2002), which coincides with what was found in grafting coffee leaves. According to Reis *et al.* (2009), due to the depletion of foliar nutrient reserves, especially N and K, coffee has a higher production year followed by one of lower production, due to the strong relationship between leaf and fruit nutrients.

Bustos *et al.* (2008) mentioned that minerals have certain functions in plant metabolism, ranging from osmoregulators, constituents of organic structures, to activators of enzymatic reactions. Therefore, Fe in chloroplasts, mitochondria, and cytosol is higher during the different stages of the peach (Song *et al.*, 2016); this agrees with our results in that the highest concentration of Fe and Zn occurred during blooming.

In the grafted coffee leaves, variations are also probably due to the different nutritional requirements of the phenological stages in the annual cycle of the plant. Sadeghian and Salamanca (2015) observed that the concentration of micronutrients such as Cu, Mn and B in coffee leaves increased from blooming to harvest. These nutrients are characterized for being of low mobility via phloem, and their migration goes from the third or fourth pair of leaves sampled in coffee towards the fruits. The main migration of foliar nutrients to the fruits occurs from the closest leaves to the drupes (or cherries).

CONCLUSIONS

Coffee leaves during fruiting and vegetative stages are more likely to be used for nutraceutical and functional purposes because the leaf area, chlorophyll content, chlorogenic acid (5-CQA), glucose and fructose are higher in the vegetative stage.

- Encalada-Córdova, M., F. Soto-Carreño, D. Morales-Guevara, e I. Álvarez-Bello. 2016. Influencia de la luz en algunas características fisiológicas del cafeto (*Coffea arabica* L. cv. Caturra) en condiciones de vivero. *Cultivos Trop.* 37: 89-97.
- Fortunato, A. S., F. C. Lidon, P. Batista-Santos, A. E. Leitão, I. P. Pais, A. I. Ribeiro, and J. C. Ramalho. 2010. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *J. Plant Physiol.* 167: 333-342.
- Hečimović, I., A. Belščak-Cvitanović, D. Horžić, and D. Komes. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem.* 129: 991-1000.
- Hernández-Martínez, G, S. Escamilla-Femat, T. Velázquez-Premio, y J. L. Martínez-Marín. 2013. Análisis de la cadena de suministro del café en el Centro de Veracruz: situación actual, retos y oportunidades. *In: López-Morgado, R., V. Sosa-Fernández, G. Díaz-Padilla, y H. A. Contreras-Hernández (comps). Cafeticultura en la Zona Centro del Estado de Veracruz Diagnóstico, productividad y servicios ambientales, INIFAP, México.* pp: 8-36.
- Hernández-Solabac, J. A. M., M. E. Nava-Tablada, S. Díaz-Cárdenas, E. Pérez-Portilla, y E. Escamilla-Prado. 2011. Migración internacional y manejo del café en dos comunidades del Centro de Veracruz. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 14: 807-818.
- Jia, S., Y. Wang, J. Hu, Z. Ding, Q. Liang, Y. Zhang, and H. Wang. 2016. Mineral and metabolic profiles in tea leaves and flowers during flower development. *Plant Physiol. Biochem.* 106: 316-326.
- Marín, M., A. Casassa, A. Rincón, J. Labarca, y Y. Hernández. 2000. Comportamiento de tipos de guayabo (*Psidium guajava* L.), injertados sobre *Psidium friedrichsthalianum* Berg-Niedenzu. *Rev. Fac. Agron.* 17: 384-392.
- Marín-Garza, T., F. C. Gómez-Merino, N. Aguilar-Rivera, J. Murguía-González, L. I. Trejo-Téllez, M. C. Pastelín-Solano, y O. Castañeda-Castro. 2018. Variaciones en área foliar y concentraciones de clorofilas y nutrimentos esenciales en hojas de café robusta (*Coffea canephora* P.) durante un ciclo anual. *Agroproductividad* 11: 36-41.
- Maqueira-López, L. A., W. Torres de la Noval, S. Pérez-Mesa A., O. Roján-Herrera, y R. Morejón R. 2016. Behavior of growth and agricultural yield of two sorghum varieties (*Sorghum bicolor* L. Moench) in the dry season in Los Palacios town. *Cultivos Trop.* 37: 103-108.
- The highest concentration of caffeine, Mg, Fe and Zn occurred during blooming, and in the fruiting stage we observed the highest content of arabinose, xylose N, P, K, Ca, Cu Mn and B.

—End of the English version—



- Montoya-Restrepo, E., J. Hernández-Arredondo, C. Unigarro-Muñoz, y C. Flórez-Ramos. 2017. Estimación del área foliar en café variedad Castillo a libre exposición y su relación con la producción. *Rev. Cenicafé* 68: 55-61.
- Ramírez, F., F. Bertsch, y L. Mora. 2002. Consumo de nutrimentos por los frutos y bandolas de café Caturra durante un ciclo de desarrollo y maduración en Aquiares, Turrialba, Costa Rica. *Agron. Costarric.* 26: 33-42.
- Reis, A. R., J. L. Favarin, L. A. Gallo, E. Malavolta, M. F. Moraes, and J. L. Junior. 2009. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 33: 315-324.
- Rennie, E. A., and R. Turgeon 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 14162-14167.
- Rodríguez-Cabello, J., Y. Díaz-Hernández, A. Pérez-González, L. R. Fundora, y P. Rodríguez-Hernández. 2015. Análisis del crecimiento de un genotipo silvestre de *Carica papaya* L. cultivado *ex situ* y cv. "Maradol Roja". *Cultivos Trop.* 36: 96-105.
- Sadeghian, S., y A. Salamanca. 2015. Micronutrimentos en frutos y hojas de café. *Rev. Cenicafé* 66: 73-87.
- San Clemente, M., y E. Peña. 2008. Crecimiento y la eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* Walter (*Onagraceae*) bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. *Rev. Acta Biol. Colomb.* 13: 175-186.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT® 9.3 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU. 178 p.
- Song, A.Z., B.B. Zhang, C.H. Zang, R.J. Mai, and M.L. Yu. 2016. Differential expression of iron-sulfur cluster biosynthesis genes during peach flowering. *Biol. Plant.* 60:79-85.

PERMEABILITY ESTIMATION OF A MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGE FOR “HASS” AVOCADO STORAGE

ESTIMACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE UN EMPAQUE DE ATMÓSFERA MODIFICADA PARA EL ALMACENAMIENTO DE AGUACATE “HASS”

Yessica Vázquez-López¹, José Caro-Corrales², Soila Gaxiola-Camacho^{1*}, Rosalina Iribe-Salazar², Marco Carrasco-Escalante², Jesús Portillo-Loera¹, Miguel Rodríguez-Gaxiola¹

¹Posgrado en Ciencias Agropecuarias (FMVZ-UAS), Universidad Autónoma de Sinaloa, Boulevard San Ángel, Fraccionamiento San Benito 3886, 80260, Culiacán, Sinaloa, México.

²Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos (FCQB-UAS), Universidad Autónoma de Sinaloa, Calzada de las Américas Nte 2771, Burócrata, 80013, Culiacán, Sinaloa, México.

ABSTRACT

Refrigeration and modified atmosphere packaging (MAP) are useful technologies to preserve and extend the shelf life of fruit and vegetables. The packaging industry aims to permanently develop technologies that provide suitable conditions for the commercialization of fruit and vegetables. Due to the market demands, packages were developed to protect fresh products from quality loss and to prolong shelf life. MAP is not always used for horticultural products in México. There are few cases where packages are designed for a specific fruit. Sometimes, the same package is used for different fruit; therefore, there is no adequate control of the gas concentration during storage, causing a faster deterioration. The objective of this research was to simulate the O₂ and CO₂ concentrations of “Hass” avocado (*Persea americana* Mill.) stored in a MAP with different O₂ and CO₂ permeabilities, based on the non-stationary state mass balances for the gas concentrations and the enzymatic kinetics for O₂ consumption and CO₂ production rates. A closed system and inhibition models were used to determine the respiratory behavior, and the correspondent kinetic parameters were obtained through a regression analysis. The O₂ and CO₂ concentrations inside a MAP in function of time were satisfactorily ($R^2 > 0.97$) simulated at 8 ± 1 °C using a competitive inhibition model. Through simulation, different permeabilities were tested to ensure lower O₂ and higher CO₂ concentrations levels inside the MAP. With the estimated O₂ (2.9×10^{-5} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹) and CO₂ (4.1×10^{-5} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹) permeabilities, the gas concentrations inside the package were simulated for the system to reach stable concentrations of 10.0 and 9.5 mol% for

RESUMEN

La refrigeración y el empaque con atmósfera modificada (MAP, por sus siglas en inglés) son tecnologías útiles para conservar y extender la vida útil de frutos y vegetales. La industria del empaque busca continuamente desarrollar tecnologías que brinden condiciones adecuadas para la comercialización de frutos y vegetales. Debido a las demandas comerciales, se han desarrollado empaques que mantienen la calidad y extienden la vida útil de los productos frescos. En México, el MAP no siempre se utiliza para productos hortícolas. Los casos en los que se diseña un empaque para un fruto en específico son pocos. En ocasiones, el mismo empaque se utiliza para diferentes frutos, por lo que no hay un control adecuado de la concentración de gases durante el almacenamiento y el producto se deteriora más rápido. El objetivo de esta investigación fue simular las concentraciones de O₂ y CO₂ del aguacate “Hass” (*Persea americana* Mill.) almacenado en un MAP con diferentes permeabilidades a O₂ y CO₂ con base en los balances de masa en estado no estacionario para las concentraciones de gas y la cinética enzimática para las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂. Un sistema cerrado y modelos de inhibición se usaron para determinar el comportamiento respiratorio y los parámetros cinéticos correspondientes se obtuvieron mediante un análisis de regresión. La simulación a 8 ± 1 °C de las concentraciones de O₂ y CO₂ dentro del MAP en función del tiempo fue satisfactoria ($R^2 > 0.97$) empleando un modelo de inhibición competitiva. Mediante simulaciones se evaluaron diversas permeabilidades para asegurar menores y mayores concentraciones de O₂ y CO₂, respectivamente, dentro del MAP. Con base en las estimaciones de la permeabilidad a O₂ (2.9×10^{-5} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹) y CO₂ (4.1×10^{-5} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹), se simuló las concentraciones de gas dentro del empaque para que el sistema alcance concentraciones estables de 10.0 y 9.5 %mol de O₂ y CO₂ después de 240 h de almace-

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: October, 2018. Approved: October, 2019.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 471-490. 2020.

O₂ and CO₂ after 240 h of storage. These permeabilities could improve the internal atmosphere and extend the “Hass” avocado shelf life when stored under MAP at 8±1 °C.

Key words: permeability, respiration rate, MAP, avocado, *Persea americana* Mill.

INTRODUCTION

Avocado fruit (*Persea americana* Mill.) is of great socioeconomic importance in México. The global estimated production of avocado is 5.5 million t and México is the main producer (1.8 million t) and exporter (926,597 t) of this fruit (FAOSTAT, 2018). The state of Michoacán is the main avocado producer in México with 166 000 ha cultivated in 2018, and this area has increased annually (SIAP, 2019). The consumption of this fruit is mainly in fresh and refrigeration is the main technology used for its preservation (Perez *et al.*, 2004). The “Hass” avocado is commercially stored at 5 to 6 °C; if storage is carried out at a lower temperature the fruit develops chilling injury (Bill *et al.*, 2014). Avocados are packed in cardboard boxes with a capacity of 4 kg and designed to maintain the appropriate moisture and ventilation during refrigeration. Modified atmosphere packages (MAP) are offered for horticultural products to prolong their quality. However, this technology is not always used and the packages selected are mainly generic and utilized for several fruits, with only few packages available for a specific fruit; in some cases, they do not fulfill the requirements to generate the optimum atmosphere, maximize the preservation, and maintain the quality of the fruit.

Respiration is a fundamental process in the conversion of energy, which is common in all living beings (Millar *et al.*, 2011). In addition, due to its physiological importance, the knowledge of the respiration parameters has technological relevance; particularly towards the development of MAP (Gomes *et al.*, 2010) as an adjunctive technique of cold storage. This technology consists in modifying the gas concentrations surrounding a product to be different from those of air. A reduction of O₂ and increase of CO₂ concentrations are involved, changing the physiological processes related to ripening and senescence, and prolonging the preservation of the product (Kader and Saltveit, 2003). This modified

namiento. Estas permeabilidades podrían mejorar la atmósfera interna y extender la vida útil del aguacate “Hass” almacenado en un MAP a 8±1 °C.

Palabras clave: permeabilidad, velocidad de respiración, MAP, aguacate, *Persea americana* Mill.

INTRODUCCIÓN

En México, el aguacate (*Persea americana* Mill.) es de gran importancia socioeconómica. La producción mundial de aguacate estimada es 5.5 millones t, y México es el principal productor (1.8 millones t) y exportador (926,597 t) de este fruto (FAOSTAT, 2018). El estado de Michoacán es el principal productor de aguacate en México con 166 000 ha cultivadas en 2018, aunque esta área aumenta cada año (SIAP, 2019). Este producto se consume fresco y la refrigeración es la principal tecnología empleada para conservarlo (Perez *et al.*, 2004). El aguacate “Hass” se almacena comercialmente a 5-6 °C; si se almacena a temperaturas más bajas el fruto desarrolla daño por frío (Bill *et al.*, 2014). Los aguacates se empacan en cajas de cartón de 4 kg de capacidad, diseñadas para mantener la humedad y ventilación adecuadas durante la refrigeración. Empaques para atmósfera modificada (MAP, modified atmosphere packages) se ofrecen para extender la calidad de productos hortícolas. Pero esta tecnología no siempre se usa y los empaques seleccionados son genéricos en su mayoría y se utilizan para varios frutos, con solo pocos empaques disponibles para un fruto específico; en algunos casos, no cumplen con los requisitos para generar una atmósfera óptima, maximizar la conservación y mantener la calidad del fruto.

La respiración es un proceso fundamental en la conversión de energía que todos los seres vivos tienen en común (Millar *et al.*, 2011). Además, debido a su importancia fisiológica, conocer los parámetros respiratorios tiene relevancia tecnológica; en particular en el desarrollo de MAP (Gomes *et al.*, 2010) como técnica complementaria de refrigeración. Esta tecnología consiste en modificar las concentraciones de gas que rodean un producto para ser diferentes de aquellas del aire. Una reducción de las concentraciones de O₂ y un aumento de las de CO₂ participan y cambian los procesos fisiológicos relacionados con la maduración y la senescencia, y así extienden la conservación del producto (Kader y Saltveit, 2003).

atmosphere can be created by injecting into the package the gas mixture of desired composition (Lee *et al.*, 2008) or from the product respiration (O_2 consumption and CO_2 production) inside the package (passive MAP). The reduction of O_2 and increase of CO_2 concentrations inside the package depends on the permeability of the film. Meeting the permeability requirements for different respiration rates (slow and high) is a difficult challenge in the design of MAP (Pandey and Goswami, 2012). The optimal O_2 and CO_2 concentrations to store "Hass" avocado in a MAP are from 2 to 5 and 3 to 10 mol%, respectively (Yahia, 1998). An improperly designed MAP could be ineffective in extending the shelf life of packaged products, if the desired or optimum atmosphere is not established inside the package (Oliveira *et al.*, 2012). It can cause high CO_2 concentration, with the risk of skin and flesh discoloration and off-flavor development in avocado when CO_2 concentration is higher than 10%, especially when O_2 concentration is lower than 1% (Yahia, 2012). The design of specific commercial films for each fruit can reduce these risks.

In México, a MAP with optimum permeability is not frequently used for avocado exportation, and an incentive could be to design suitable packages that allow to extend the useful life of this fruit. Mathematical modeling is employed as a convenient tool for MAP design and it allows to estimate the optimal permeability of the film to maintain the quality of the food (Rennie and Tavoularis, 2009). These models use the principles of mass balance to describe the interactions between respiration rate and film permeability with the atmosphere surrounding the product (Mangaraj and Goswami, 2011). Lee *et al.* (1991) described the respiration rate dependence on O_2 with a Michaelis-Menten kinetic model; since then, it is successfully used for modeling the respiratory behavior of fruit and vegetables. The inhibitory effect of CO_2 on the respiration rate can be considered by using the competitive, uncompetitive, non-competitive, and mixed inhibition models (Geysen *et al.*, 2005). Among reports for modeling the respiration rate of "Hass" avocado fruit stored in a MAP, Xiao and Kiyota (2000) used mathematical models to predict the partial pressure of O_2 at steady state for designing a MAP for "Fuerte" avocado. Castellanos *et al.* (2017) reported that a model based on enzymatic kinetics with uncompetitive inhibition

Esta atmósfera modificada se puede crear al inyectar la composición deseada de una mezcla de gases al interior del empaque (Lee *et al.*, 2008) o desde la respiración del producto (consumo de O_2 y producción de CO_2) dentro del empaque (MAP pasivo). La disminución y el aumento de las concentraciones de O_2 y CO_2 , respectivamente, dentro del empaque, dependen de la permeabilidad de la película. El cumplir con los requisitos de permeabilidad para diferentes velocidades de respiración (baja y alta) es un reto en el diseño de MAP (Pandey y Goswami, 2012). Las concentraciones óptimas de O_2 y CO_2 para el almacenamiento del aguacate "Hass" en un MAP son de 2 a 5 y de 3 a 10 %mol, respectivamente (Yahia, 1998). Si dentro del empaque no se establece la atmósfera deseada u óptima, debido a un mal diseño del MAP, no se podría extender la vida útil del producto (Oliveira *et al.*, 2012). Un empaque mal diseñado podría generar altas concentraciones de CO_2 , con el riesgo de desarrollar decoloración de la cáscara y la pulpa, así como un sabor anormal en el aguacate cuando la concentración de CO_2 es mayor al 10%, en especial cuando la concentración de O_2 es menor al 1% (Yahia, 2012). El diseño de películas comerciales específicas para cada fruto puede reducir estos riesgos. En México, por lo general no se usan MAP de una permeabilidad óptima para la exportación del aguacate, y un incentivo podría ser el diseño de empaques adecuados que permitan extender la vida útil de este fruto. Modelos matemáticos se usan como una herramienta útil en el diseño de MAP, ya que permiten estimar la permeabilidad óptima de la película para mantener la calidad del producto (Rennie y Tavoularis, 2009). Estos modelos utilizan los principios de balance de masa para describir las interacciones entre la velocidad de respiración y la permeabilidad de la película con la atmósfera que rodea al producto (Mangaraj y Goswami, 2011). Lee *et al.* (1991) describieron la dependencia de la velocidad de respiración con el O_2 con un modelo cinético de Michaelis-Menten; desde entonces, se utiliza para modelar el comportamiento respiratorio de frutos y vegetales. El efecto inhibitorio del CO_2 sobre la velocidad de respiración se puede considerar al emplear los modelos de inhibición competitiva, acompetitiva, no competitiva y mixta (Geysen *et al.*, 2005). Entre los reportes de modelado de la velocidad de respiración del fruto de aguacate "Hass" almacenado en un MAP, Xiao y Kiyota, (2000) usaron modelos matemáticos

adequately described the respiration process in “Hass” avocado fruit. However, there is a need to determine the optimal gas permeability to decrease O_2 and increase CO_2 concentrations inside the container, to reduce the respiration rate of avocado and to stabilize the internal atmosphere during storage. After knowing the proper permeability, the specific requirements (polymer mixture, size, and number of microperforations) can be obtained to produce a package for extending the useful life of the fruit. Therefore, the objective of this research was to simulate the O_2 and CO_2 concentrations of “Hass” avocado (*Persea americana* Mill.) stored in a MAP with different O_2 and CO_2 permeabilities, based on the non-stationary state mass balances for the gas concentrations and on the enzymatic kinetics for O_2 consumption and CO_2 production rates.

MATERIALS AND METHODS

Avocado fruit (*Persea americana* Mill.) cv. Hass were harvested at physiological maturity stage, 35 weeks after flowering (April 2017, Tacambaro, Michoacán, México) and purchased from a commercial distributor in Culiacán, Sinaloa, México. Fruit were selected based on size (220 ± 15 g) and color ($L^* = 36.5 \pm 2.7$, $a^* = -13.3 \pm 2.2$, $b^* = 18.1 \pm 3.5$). They were washed with a 1% sodium hypochlorite solution for 20 min (Russo *et al.*, 2014) and stored at 8 ± 1 °C. The modified atmosphere packaging was created using microperforated TrendLife® bags elaborated from polyamides, with dimensions of 82×74 cm, thickness of 1.27 mm (50 mil), and 120 microperforations with diameter of 0.7 mm. Packages were kept in a ripening room at 85% to 90% relative humidity wetting the floor with water.

Evaluation of the respiration rate

The O_2 consumption and CO_2 production rates of avocado fruit were measured in a closed system according to Iqbal *et al.* (2009). Glass containers of 5 L were used as respiration chambers with rubber seals on the top. These seals had an inlet and outlet copper rods with a diameter of 6 mm and lengths of 24 and 8 cm, respectively. Latex rubber hoses were connected to the chambers to distribute the gas concentrations. The O_2 and CO_2 concentrations were obtained from industrial grade compressed N_2 and CO_2 tanks (Praxair, México). One avocado fruit with a mass of 220.35 ± 11.81 g was placed in each of the respiration chambers. The rubber seal was inserted in the chamber and the sample was acclimatized with a continuous flow of the correspondent gas mixture for 12 h at 8 ± 1 °C. The flow of the

para predecir la presión parcial de O_2 en el estado estacionario para diseñar un MAP para el aguacate “Fuerte”. Castellanos *et al.* (2017) reportaron que un modelo basado en cinética enzimática con inhibición acompetitiva describió adecuadamente el proceso respiratorio del fruto de aguacate “Hass”. Sin embargo, es necesario determinar la permeabilidad óptima para disminuir la concentración de O_2 y aumentar la de CO_2 dentro del empaque, para así reducir la velocidad de respiración del aguacate y estabilizar la atmósfera interna durante el almacenamiento. Después de conocer la permeabilidad adecuada, se pueden obtener los requisitos específicos (mezcla de polímeros, tamaño y número de microperforaciones) para producir un empaque que extienda la vida útil del fruto. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue simular las concentraciones de O_2 y CO_2 del aguacate “Hass” (*Persea americana* Mill.) almacenado en un MAP con diferentes permeabilidades a O_2 y CO_2 , con base en los balances de masa en el estado no estacionario para las concentraciones de gas y en la cinética enzimática para las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 .

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass se cosecharon en la etapa de madurez fisiológica, 35 semanas después de la floración (abril de 2017, Tacámbaro, Michoacán, México) y se compraron de un distribuidor comercial en Culiacán, Sinaloa, México. Los frutos se seleccionaron con base en su tamaño (220 ± 15 g) y color ($L^* = 36.5 \pm 2.7$, $a^* = -13.3 \pm 2.2$, $b^* = 18.1 \pm 3.5$). Los frutos se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 20 min (Russo *et al.*, 2014) y almacenaron a 8 ± 1 °C. El empaque con atmósfera modificada se creó con bolsas microperforadas de poliamida TrendLife®, con dimensiones de 82×74 cm, espesor de 1.27 mm (50 mil) y 120 microperforaciones con un diámetro de 0.7 mm. Los empaques se mantuvieron, humedeciendo el piso con agua, en un cuarto de maduración con una humedad relativa de 85% a 90%.

Evaluación de la velocidad de respiración

Las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 del fruto de aguacate se determinaron en un sistema cerrado conforme a lo descrito por Iqbal *et al.* (2009). Contenedores de 5 L con tapas de goma se usaron como cámaras de respiración. Estas tapas tenían tubos de cobre de entrada y salida con un diámetro de 6 mm y longitudes de 24 y 8 cm, respectivamente.

gaseous combinations was established from 6-mm male-male generic needle valves. After 12 h of acclimatization, the flow was interrupted, and the chamber was hermetically sealed. The atmosphere composition was measured after 24 h of treatment with an O₂/CO₂ analyzer (ICA 250, USA). The O₂ consumption and CO₂ production rates for each gas combination were calculated with the following equations:

$$r_{O_2} = \frac{[O_2^i] - [O_2]}{100} \frac{V}{m(t-t_i)} \quad r_{CO_2} = \frac{[CO_2] - [CO_2^i]}{100} \frac{V}{m(t-t_i)} \quad (1)$$

Where: r_{O_2} and r_{CO_2} are the O₂ consumption and CO₂ production rates (mL kg⁻¹ h⁻¹). $[O_2^i]$ and $[CO_2^i]$ are the initial concentrations of the gases (mol%). t_i is the initial time (h). m is the mass (kg). V is the free volume in the chamber (mL).

Kinetics of O₂ consumption and CO₂ production

The Michaelis-Menten enzymatic equation was applied to model the O₂ consumption and CO₂ production rates in function of O₂ concentration (Lee *et al.*, 1991) as follows:

$$r_{O_2} = \frac{V_{mO_2} [O_2]}{K_{mO_2} + [O_2]} \quad r_{CO_2} = \frac{V_{mCO_2} [O_2]}{K_{mCO_2} + [O_2]} \quad (2)$$

Where: V_{mO_2} and V_{mCO_2} are the maximum respiration rates (mL kg⁻¹ h⁻¹). K_{mO_2} and K_{mCO_2} are the affinity constants (mol%).

The inhibitory effect of CO₂ on the respiration rate can be modeled based on a specific type of inhibition. Therefore, the following inhibition models (Geysen *et al.*, 2005) with the apparent maximum rate and affinity constant were tested:

Competitive

$$r_{O_2} = \frac{V_{mO_2} [O_2]}{K_{mO_2} \alpha_{CO_2}^c + [O_2]} \quad K_{mO_2, app} = K_{mO_2} \alpha_{CO_2}^c \quad \alpha_{CO_2}^c = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^c} \quad (3)$$

$$r_{CO_2} = \frac{V_{mCO_2} [O_2]}{K_{mCO_2} \alpha_{CO_2}^c + [O_2]} \quad K_{mCO_2, app} = K_{mCO_2} \alpha_{CO_2}^c$$

$$\alpha_{CO_2}^c = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^c} \quad (4)$$

Mangueras de goma de látex se conectaron a las cámaras para distribuir las concentraciones de gas. Las concentraciones de O₂ y CO₂ se obtuvieron desde tanques de N₂ y CO₂ comprimido grado industrial (Praxair, México). Un aguacate con una masa de 220.35±11.81 g se colocó en cada cámara de respiración. La tapa de goma se insertó en la cámara y la muestra se climatizó con un flujo continuo de la mezcla de gas correspondiente durante 12 h a 8±1 °C. El flujo de las combinaciones gaseosas se estableció a partir de válvulas de aguja genéricas macho-macho de 6 mm. Después de 12 h de climatización, el flujo se interrumpió y la cámara se selló herméticamente. La composición de la atmósfera se determinó después de 24 h de tratamiento con un analizador de O₂/CO₂ (ICA 250, EE.UU.). Las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ para cada combinación de gases se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$r_{O_2} = \frac{[O_2^i] - [O_2]}{100} \frac{V}{m(t-t_i)} \quad r_{CO_2} = \frac{[CO_2] - [CO_2^i]}{100} \frac{V}{m(t-t_i)} \quad (1)$$

donde: r_{O_2} y r_{CO_2} son las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ (mL kg⁻¹ h⁻¹). $[O_2^i]$ y $[CO_2^i]$ son las concentraciones iniciales de los gases (%mol). t_i corresponde al tiempo inicial (h). m corresponde a la masa (kg). V representa el volumen libre en la cámara (mL).

Cinéticas de consumo de O₂ y producción de CO₂

La ecuación enzimática de Michaelis-Menten se empleó para modelar las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ en función de la concentración de O₂ (Lee *et al.*, 1991), como se muestra a continuación:

$$r_{O_2} = \frac{V_{mO_2} [O_2]}{K_{mO_2} + [O_2]} \quad r_{CO_2} = \frac{V_{mCO_2} [O_2]}{K_{mCO_2} + [O_2]} \quad (2)$$

donde: V_{mO_2} y V_{mCO_2} son las velocidades de respiración máximas (mL kg⁻¹ h⁻¹). K_{mO_2} y K_{mCO_2} representan las constantes de afinidad (%mol).

El efecto inhibitorio del CO₂ sobre la velocidad de respiración se puede modelar con base en un tipo de inhibición específico. Por lo que, se evaluaron los siguientes modelos de inhibición (Geysen *et al.*, 2005) con la velocidad máxima aparente y la constante de afinidad:

Uncompetitive

$$r_{O_2} = \frac{V_{m_{O_2}} [O_2]}{K_{m_{O_2}} + \alpha_{O_2}^u [O_2]} V_{m_{O_2},app} = \frac{V_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^u} K_{m_{O_2},app} = \frac{K_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^u}$$

$$\alpha_{O_2}^u = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^u} \quad (5)$$

$$r_{CO_2} = \frac{V_{m_{CO_2}} [O_2]}{K_{m_{CO_2}} + \alpha_{CO_2}^u [O_2]} V_{m_{CO_2},app} = \frac{V_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^u}$$

$$K_{m_{CO_2},app} = \frac{K_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^u} \alpha_{CO_2}^u = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^u} \quad (6)$$

Non-competitive

$$r_{O_2} = \frac{V_{m_{O_2}} [O_2]}{(K_{m_{O_2}} + [O_2]) \alpha_{O_2}^n} V_{m_{O_2},app} = \frac{V_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^n} \alpha_{O_2}^n = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^n}$$

$$\alpha_{O_2}^n = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^n} \quad (7)$$

$$r_{CO_2} = \frac{V_{m_{CO_2}} [O_2]}{(K_{m_{CO_2}} + [O_2]) \alpha_{CO_2}^n} V_{m_{CO_2},app} = \frac{V_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^n}$$

$$\alpha_{CO_2}^n = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^n} \quad (8)$$

Mixed inhibition

$$r_{O_2} = \frac{V_{m_{O_2}} [O_2]}{K_{m_{O_2}} \alpha_{O_2}^m + [O_2] \alpha_{O_2}^{m_2}} V_{m_{O_2},app} = \frac{V_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^{m_2}}$$

$$K_{m_{O_2},app} = \frac{\alpha_{O_2}^m K_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^{m_2}} \quad (9)$$

$$\alpha_{O_2}^m = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^m} \quad \alpha_{O_2}^{m_2} = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^{m_2}} \quad (10)$$

$$r_{CO_2} = \frac{V_{m_{CO_2}} [O_2]}{K_{m_{CO_2}} \alpha_{CO_2}^m + [O_2] \alpha_{CO_2}^{m_2}} V_{m_{CO_2},app} = \frac{V_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^{m_2}}$$

$$K_{m_{CO_2},app} = \frac{\alpha_{CO_2}^m K_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^{m_2}} \quad (11)$$

$$\alpha_{CO_2}^m = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^m} \quad \alpha_{CO_2}^{m_2} = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^{m_2}} \quad (12)$$

Competitiva

$$r_{O_2} = \frac{V_{m_{O_2}} [O_2]}{K_{m_{O_2}} \alpha_{O_2}^c + [O_2]} K_{m_{O_2},app} = K_{m_{O_2}} \alpha_{O_2}^c \alpha_{O_2}^c = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^c}$$

$$\alpha_{O_2}^c = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^c} \quad (3)$$

$$r_{CO_2} = \frac{V_{m_{CO_2}} [O_2]}{K_{m_{CO_2}} \alpha_{CO_2}^c + [O_2]} K_{m_{CO_2},app} = K_{m_{CO_2}} \alpha_{CO_2}^c$$

$$\alpha_{CO_2}^c = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^c} \quad (4)$$

Acompetitiva

$$r_{O_2} = \frac{V_{m_{O_2}} [O_2]}{K_{m_{O_2}} + \alpha_{O_2}^u [O_2]} V_{m_{O_2},app} = \frac{V_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^u} K_{m_{O_2},app} = \frac{K_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^u}$$

$$\alpha_{O_2}^u = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^u} \quad (5)$$

$$r_{CO_2} = \frac{V_{m_{CO_2}} [O_2]}{K_{m_{CO_2}} + \alpha_{CO_2}^u [O_2]} V_{m_{CO_2},app} = \frac{V_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^u}$$

$$K_{m_{CO_2},app} = \frac{K_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^u} \alpha_{CO_2}^u = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^u} \quad (6)$$

No competitiva

$$r_{O_2} = \frac{V_{m_{O_2}} [O_2]}{(K_{m_{O_2}} + [O_2]) \alpha_{O_2}^n} V_{m_{O_2},app} = \frac{V_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^n} \alpha_{O_2}^n = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^n}$$

$$\alpha_{O_2}^n = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^n} \quad (7)$$

$$r_{CO_2} = \frac{V_{m_{CO_2}} [O_2]}{(K_{m_{CO_2}} + [O_2]) \alpha_{CO_2}^n} V_{m_{CO_2},app} = \frac{V_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^n}$$

$$\alpha_{CO_2}^n = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^n} \quad (8)$$

Inhibición mixta

$$r_{O_2} = \frac{V_{m_{O_2}} [O_2]}{K_{m_{O_2}} \alpha_{O_2}^m + [O_2] \alpha_{O_2}^{m_2}} V_{m_{O_2},app} = \frac{V_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^{m_2}}$$

$$K_{m_{O_2},app} = \frac{\alpha_{O_2}^m K_{m_{O_2}}}{\alpha_{O_2}^{m_2}} \quad (9)$$

Where: $V_{m_{O_2,app}}$ and $V_{m_{CO_2,app}}$ are the apparent maximum respiration rates ($\text{mL kg}^{-1} \text{h}^{-1}$). $K_{m_{O_2,app}}$ and $K_{m_{CO_2,app}}$ the apparent affinity constants (mol%). $K_{I_{O_2}}^c$, $K_{I_{O_2}}^u$, $K_{I_{O_2}}^n$, $K_{I_{O_2}}^{m_1}$, $K_{I_{O_2}}^{m_2}$, $K_{I_{CO_2}}^c$, $K_{I_{CO_2}}^u$, $K_{I_{CO_2}}^n$, $K_{I_{CO_2}}^{m_1}$, and $K_{I_{CO_2}}^{m_2}$ the dissociation constants for the inhibitor (mol%). Superscripts indicate the type of inhibition: competitive (*c*), uncompetitive (*u*), non-competitive (*n*), and mixed (m_1 , m_2) inhibition.

The O_2 consumption and CO_2 production rates in function of the substrate (O_2) concentrations were adjusted to the Michaelis-Menten enzyme kinetics, considering the inhibitory effect of CO_2 . Lineweaver-Burk graphs were constructed to estimate the kinetic parameters (V_m , K_m , and K_I) for the inhibition models. Then, linear regression analyses were performed between the reciprocal of the respiration rates ($1/r_{O_2}$ or $1/r_{CO_2}$) against the reciprocal of substrate concentration ($1/[O_2]$) for both scenarios, without considering the inhibitory effect of CO_2 and considering it.

Evaluation of diffused O_2 and CO_2 through the test package

The concentration-increase method was used to determine the amount of diffused gas through a permeable package. The mass transfer system to measure the diffusion of gases (O_2 or CO_2) consisted of a cylindrical plastic container with a nominal volume of 20 L, adapted with gas inlet and outlet valves. In order to displace the air in the container, industrial grade N_2 was flowed inside the container and the package, a bag of 10.4 L. Because the O_2 and CO_2 permeabilities of the bag were high, 90% of the microperforations were covered and only 12 of them were used for gas diffusion. The bag was filled with the test gas (O_2 or CO_2) to replace N_2 and placed inside the container. Afterwards, the container valves were closed, and the system was sealed. The diffusion of the gas out of the bag was measured inside the container as a function of time with the O_2/CO_2 gas analyzer. The system was placed in a cooling chamber at 8 ± 1 °C. The amount of diffused O_2 or CO_2 was calculated with the following equations:

$$Q_{O_2} = \frac{[O_2]}{100} V \quad Q_{CO_2} = \frac{[CO_2]}{100} V \quad (13)$$

Where: Q_{O_2} and Q_{CO_2} are the amounts of diffused gas (mL). V is the volume inside the container, out of the bag (mL).

Estimation of the O_2 and CO_2 permeability through the test package

The mass transfer through the package is described by the Fick's law of diffusion:

$$\alpha_{O_2}^{m_1} = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^{m_1}} \quad \alpha_{O_2}^{m_2} = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{O_2}}^{m_2}} \quad (10)$$

$$r_{CO_2} = \frac{V_{m_{CO_2}} [O_2]}{K_{m_{CO_2}} \alpha_{CO_2}^{m_1} + [O_2] \alpha_{CO_2}^{m_2}} V_{m_{CO_2,app}} = \frac{V_{m_{CO_2}}}{\alpha_{CO_2}^{m_2}} \quad (11)$$

$$\alpha_{CO_2}^{m_1} = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^{m_1}} \quad \alpha_{CO_2}^{m_2} = 1 + \frac{[CO_2]}{K_{I_{CO_2}}^{m_2}} \quad (12)$$

donde: $V_{m_{O_2,app}}$ y $V_{m_{CO_2,app}}$ son las velocidades de respiración máxima aparente ($\text{mL kg}^{-1} \text{h}^{-1}$). $K_{m_{O_2,app}}$ y $K_{m_{CO_2,app}}$ las constantes de afinidad aparente (%mol). $K_{I_{O_2}}^c$, $K_{I_{O_2}}^u$, $K_{I_{O_2}}^n$, $K_{I_{O_2}}^{m_1}$, $K_{I_{O_2}}^{m_2}$, $K_{I_{CO_2}}^c$, $K_{I_{CO_2}}^u$, $K_{I_{CO_2}}^n$, $K_{I_{CO_2}}^{m_1}$, y $K_{I_{CO_2}}^{m_2}$ las constantes de disociación para el inhibidor (%mol). Los superíndices indican el tipo de inhibición: competitiva (*c*), acompetitiva (*u*), no competitiva (*n*) y mixta (m_1 , m_2).

Las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 en función de las concentraciones del sustrato (O_2) se ajustaron a la cinética enzimática de Michaelis-Menten, considerando el efecto inhibitorio del CO_2 . Con los gráficos de Lineweaver-Burk se estimaron los parámetros cinéticos (V_m , K_m y K_I) para los modelos de inhibición. Luego, se realizaron análisis de regresión lineal entre el recíproco de las velocidades respiratorias ($1/r_{O_2}$ o $1/r_{CO_2}$) y el recíproco de la concentración del sustrato ($1/[O_2]$) para ambos casos, con y sin el efecto inhibitorio del CO_2 .

Evaluación de la difusión del O_2 y CO_2 a través del empaque de prueba

El método de aumento de la concentración se usó para determinar la cantidad de gas difundido a través de un empaque permeable. El sistema de transferencia de masa para medir la difusión de los gases (O_2 o CO_2) consistió en un contenedor plástico cilíndrico con un volumen nominal de 20 L, adaptado con válvulas de entrada y salida de gas. Para desplazar el aire en el contenedor, se introdujo un flujo de N_2 grado industrial dentro del contenedor y el empaque, una bolsa de 10.4 L. Debido a la elevada permeabilidad de la bolsa al O_2 y CO_2 , se cubrió el 90% de las microperforaciones y sólo se usaron 12 para la difusión de los gases. La bolsa se llenó con el gas de prueba (O_2 o CO_2) para desplazar el N_2 y se colocó dentro del contenedor. Después, se cerraron las válvulas del contenedor y se selló el sistema. La difusión del gas hacia el exterior de la bolsa se determinó dentro del contenedor como una función del tiempo con el analizador de

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (14)$$

Where: C is the concentration of the permeant gas and D is the diffusivity coefficient.

The x coordinate is measured from the bottom of the film, which has a thickness L . The initial concentration of the permeant in the film is zero; at the bottom face ($x=0$) the concentration is C_1 , and at the top face ($x=L$) through which the diffusing substance emerges, the concentration is maintained at zero. Therefore, the initial and boundary conditions are:

$$C(x,0) = 0 \quad C(0,t) = C_1 \quad C(L,t) = 0 \quad (15)$$

The general solution in function of position x and time t is (Crank, 1975):

$$C = C_1 \left(1 - \frac{x}{L} \right) - \frac{2C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin \frac{n\pi x}{L} e^{-\frac{n^2 \pi^2 D t}{L^2}} \quad (16)$$

The mass flux density J that emerges from the film (at $x=L$) is given by:

$$J = \frac{1}{A} \frac{dQ}{dt} = -D \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=L} \quad (17)$$

Where: A is the transfer area (cm^2).

The amount of diffused gas that has passed through the membrane in time t is given by $Q = A \int_0^t J dt$; therefore, after taking $\partial C/\partial x$, the amount of diffused gas is expressed by the next infinite series:

$$Q = ALC_1 \left[\frac{Dt}{L^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} e^{-\frac{n^2 \pi^2 D t}{L^2}} \right] \quad (18)$$

As t approaches infinity, the terms involving the exponentials vanish and the amount of diffused gas through the membrane increases linearly with time, that is, the steady state was reached. This steady state is achieved when the mass Fourier number $F_{Om} = Dt/L^2$ is greater than 0.45 (Crank, 1975). In this condition, the mass flux density can be expressed using the first law of diffusion $J = -D(dC/dx)$, which can be solved with the next equation:

$$J = D \frac{C_1 - C_2}{L} \quad (19)$$

gas O_2/CO_2 . El sistema se colocó en una cámara de enfriamiento a 8 ± 1 °C. La cantidad de O_2 o CO_2 difundido se calculó con la siguiente ecuación:

$$Q_{O_2} = \frac{[O_2]}{100} V \quad Q_{CO_2} = \frac{[CO_2]}{100} V \quad (13)$$

donde: Q_{O_2} y Q_{CO_2} son las cantidades de gas difundido (mL). V es el volumen dentro del contenedor, fuera de la bolsa (mL).

Estimación de la permeabilidad al O_2 y CO_2 a través del empaque de prueba

La ley de difusión de Fick describe la transferencia de masa a través del empaque:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (14)$$

donde: C es la concentración del gas permeante y D es el coeficiente de difusión.

La coordenada x se mide desde la base de la película, que tiene un espesor L . La concentración inicial del gas permeante en la película es cero; en la cara inferior ($x=0$) la concentración es C_1 , y en la cara superior ($x=L$), de la cual emerge la sustancia difundida, la concentración se mantiene en cero. Por lo tanto, la condición inicial y las de frontera son:

$$C(x,0) = 0 \quad C(0,t) = C_1 \quad C(L,t) = 0 \quad (15)$$

La solución general en función de la posición x y el tiempo t es (Crank, 1975):

$$C = C_1 \left(1 - \frac{x}{L} \right) - \frac{2C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin \frac{n\pi x}{L} e^{-\frac{n^2 \pi^2 D t}{L^2}} \quad (16)$$

La densidad de flujo de masa. Esta densidad de flujo J es igual al flujo de masa (dQ/dt) entre el área de transferencia (A).

$$J = \frac{1}{A} \frac{dQ}{dt} = -D \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=L} \quad (17)$$

donde: A es el área de transferencia (cm^2).

La cantidad de gas difundido que ha atravesado la membrana en el tiempo t se indica como $Q = A \int_0^t J dt$; por lo que, después de tomar $\partial C/\partial x$, la cantidad de gas difundido se expresa con la siguiente serie infinita:

The concentration can be expressed in terms of solubility, S and the partial pressure, p_A of the gas by $C = Sp_A$. In this way, the mass flux density is:

$$J = DS \frac{p_{A_1} - p_{A_2}}{L} = \frac{Q}{At} \quad (20)$$

After the steady state is reached, the slope (Q/t) of the linear portion of a Q versus time graph can be obtained and the permeability, $P_M = DS$ can be calculated from the following equation:

$$P_M = \frac{QL}{At(p_{A_1} - p_{A_2})} \quad (21)$$

Simulation of O₂ and CO₂ concentrations using different permeabilities

Hayakawa *et al.* (1975) used the mass balances for the O₂ and CO₂ concentrations in non-steady state:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = 100 \left[\frac{AP_{M_{O_2}} P_{atm}}{VL} \left(\frac{[O_2]_o}{100} - \frac{[O_2]}{100} \right) - \left(\frac{m r_{O_2}}{V} \right) \right] \quad (22)$$

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = 100 \left[\frac{AP_{M_{CO_2}} P_{atm}}{VL} \left(\frac{[CO_2]_o}{100} - \frac{[CO_2]}{100} \right) + \left(\frac{m r_{CO_2}}{V} \right) \right] \quad (23)$$

Where: $[O_2]_o$ and $[CO_2]_o$ are the concentrations outside the package (mol%). $P_{M_{O_2}}$ and $P_{M_{CO_2}}$ are the permeabilities to O₂ and CO₂ (mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹). P_{atm} is the atmosphere pressure (76 cmHg). m is the mass of fruit (kg). A is the transfer area (cm²). V is the free volume (mL). L is the package thickness (mm).

A computer code was performed to predict the O₂ and CO₂ concentrations inside the package in function of time. These ordinary differential equations were simultaneously solved using the modified Euler method. The proposed inhibition models were tested to select the best fit using the corresponding Michaelis-Menten parameters (K_m , V_m , and K_i) for O₂ and CO₂.

Five avocado fruit were randomly selected and placed in MAP TrendLife® bags, which were hermetically sealed with plastic straps. The transfer area was of 40×74 cm² and only 12 microperforations (diameter of 0.7 mm, each) were uncovered. Through a sampling port, the O₂ and CO₂ concentrations inside the bag were measured in function of time at 8±1 °C, until the concentrations were stabilized. The model validation was performed comparing the simulated and experimental

$$Q = ALC_1 \left[\frac{Dt}{L^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} e^{-\frac{n^2 \pi^2 Dt}{L^2}} \right] \quad (18)$$

Conforme t se aproxima al infinito, los términos que involucran a los exponenciales desaparecen y la cantidad de gas difundido a través de la membrana aumenta de forma lineal con el tiempo, esto es, se alcanza el estado estacionario. El estado estacionario se alcanza cuando el número de Fourier de masa $F_{O_m} = Dt/L^2$ es mayor a 0.45 (Crank, 1975). En esta condición, la densidad de flujo de masa se puede expresar con la primera ley de difusión $J = -D (dC/dx)$, que se resuelve como:

$$J = D \frac{C_1 - C_2}{L} \quad (19)$$

La concentración se puede expresar en términos de la solubilidad S , y la presión parcial p_A del gas con $C = Sp_A$. Así, la densidad de flujo de masa es:

$$J = DS \frac{p_{A_1} - p_{A_2}}{L} = \frac{Q}{At} \quad (20)$$

Después de alcanzar el estado estacionario, se puede obtener la pendiente (Q/t) de la porción lineal de un gráfico de Q frente a tiempo y calcular la permeabilidad ($PM = DS$) con la siguiente ecuación:

$$P_M = \frac{QL}{At(p_{A_1} - p_{A_2})} \quad (21)$$

Simulación de la concentración de O₂ y CO₂ con diferentes permeabilidades

Hayakawa *et al.* (1975) utilizaron los balances de masa para las concentraciones de O₂ y CO₂ en el estado no estacionario:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = 100 \left[\frac{AP_{M_{O_2}} P_{atm}}{VL} \left(\frac{[O_2]_o}{100} - \frac{[O_2]}{100} \right) - \left(\frac{m r_{O_2}}{V} \right) \right] \quad (22)$$

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = 100 \left[\frac{AP_{M_{CO_2}} P_{atm}}{VL} \left(\frac{[CO_2]_o}{100} - \frac{[CO_2]}{100} \right) + \left(\frac{m r_{CO_2}}{V} \right) \right] \quad (23)$$

donde: $[O_2]_o$ y $[CO_2]_o$ son las concentraciones fuera del empaque (%mol). $P_{M_{O_2}}$ y $P_{M_{CO_2}}$ son la permeabilidad al O₂ y CO₂ (mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹). P_{atm} es la presión atmosférica (76 cmHg). m es la masa del fruto (kg). A es el área de transferencia (cm²). V es el volumen libre (mL). L es el espesor del empaque (mm).

concentrations in function of time. Finally, using the respiration rate model of best fit, through simulation, new O₂ and CO₂ permeabilities were proposed to store avocado fruit.

Design of experiments

Three completely random designs were used. For the evaluation of the O₂ and CO₂ respiration rates the factors were O₂ (6, 15, and 21 mol%) and CO₂ (0 and 8 mol%) concentrations. For O₂ and CO₂ permeability, the response variable was the amount of O₂ and CO₂ diffused through the package, the factor was the time for mass transfer (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, and 1.50 h). In order to validate the respiration model, the responses were the O₂ and CO₂ concentrations inside the bag and the factor was the storage time (0, 24, 48, 72, 96, 120, and 144 h). Three replicates were performed for each evaluation. The Fisher test ($p \leq 0.05$) was used to compare means (Montgomery, 2017).

RESULTS AND DISCUSSION

Kinetics of O₂ consumption and CO₂ production

Figure 1 shows the Michaelis-Menten graphs for estimated and experimental O₂ consumption and CO₂ production rates, in absence and presence of the inhibitor (8 mol% CO₂) at 8±1 °C for the four inhibition models. The O₂ consumption and CO₂ production rates of avocado fruit ranged from 5.84 to 24.7 and from 6.84 to 25.6 mL kg⁻¹ h⁻¹, respectively. In all graphs, the effect of the low oxygen concentration and inhibitor presence (CO₂) on the respiration rate was observed. This behavior was similar to that for other fruit and vegetables stored under modified atmospheres (Song *et al.*, 2002; Geysen *et al.*, 2005; Cliffe-Byrnes and O'Beirne, 2007). The minimum rates for O₂ consumption (5.84 mL kg⁻¹ h⁻¹) and CO₂ production (6.84 mL kg⁻¹ h⁻¹) were obtained for the treatment at 6 mol% O₂ and 8 mol% CO₂. Castellanos *et al.* (2017) measured O₂ consumption and CO₂ production rates ranging from 4.17 to 25 mL kg⁻¹ h⁻¹ at 6 °C under different gas concentrations for "Hass" avocado. Russo *et al.* (2014) reported CO₂ production rates up to 25 mL kg⁻¹ h⁻¹ and concluded that treatments with the highest CO₂ concentrations had the lowest respiration activities in "Fuerte" avocado at 10±1 °C. Ahmed *et al.* (2007) reported O₂ consumption rates from 6.99 to 9.79 and 3.32 to 6.03 mL kg⁻¹

Un código computacional se elaboró para predecir las concentraciones de O₂ y CO₂ dentro del empaque en función del tiempo. Estas ecuaciones diferenciales ordinarias se resolvieron simultáneamente con el método de Euler modificado. Los métodos de inhibición propuestos se evaluaron para seleccionar el más adecuado empleando los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_m , V_m y K_i) correspondientes al O₂ y CO₂.

Cinco frutos de aguacate se seleccionaron al azar y se colocaron en MAP, bolsas TrendLife®, el empaque se selló herméticamente con correas de plástico. El área de transferencia fue de 40×74 cm² y solo se abrieron 12 microperforaciones (diámetro de 0.7 mm, cada una). Por medio de un puerto de muestreo, se determinaron las concentraciones de O₂ y CO₂ al interior de la bolsa en función del tiempo a 8±1 °C, hasta que las concentraciones se estabilizaron. El modelo se validó al comparar las concentraciones simuladas y experimentales en función del tiempo. Al final, empleando el modelo de velocidad de respiración de mejor ajuste, por medio de simulaciones, se propusieron nuevas permeabilidades al O₂ y CO₂ para almacenar el fruto de aguacate.

Diseño experimental

Tres diseños completamente aleatorios se usaron. Para evaluar la velocidad de respiración de O₂ y CO₂ los factores fueron las concentraciones de O₂ (6, 15 y 21 %mol) y CO₂ (0 y 8 %mol). Para la permeabilidad a O₂ y CO₂, la variable de respuesta fue la cantidad de O₂ y CO₂ difundida a través del empaque, el factor fue el tiempo para la transferencia de masa (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.50 h). Para validar el modelo de respiración, las respuestas fueron las concentraciones de O₂ y CO₂ dentro de la bolsa y el factor fue el tiempo de almacenamiento (0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h). Para cada evaluación se realizaron tres réplicas. La prueba de Fisher ($p \leq 0.05$) se usó para comparar las medias (Montgomery, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética del consumo de O₂ y producción de CO₂

La Figura 1 muestra los gráficos de Michaelis-Menten de las velocidades de consumo y producción estimadas y experimentales de O₂ y CO₂, en ausencia y presencia del inhibidor (8 %mol CO₂) a 8±1 °C de los cuatro modelos de inhibición. La velocidad de consumo de O₂ y producción de CO₂ del fruto de aguacate varió de 5.84 a 24.7 y de 6.84 a 25.6 mL kg⁻¹h⁻¹, respectivamente. En todos los gráficos, se observó el efecto de la baja concentración de oxígeno y la presencia del inhibidor (CO₂) en la velocidad

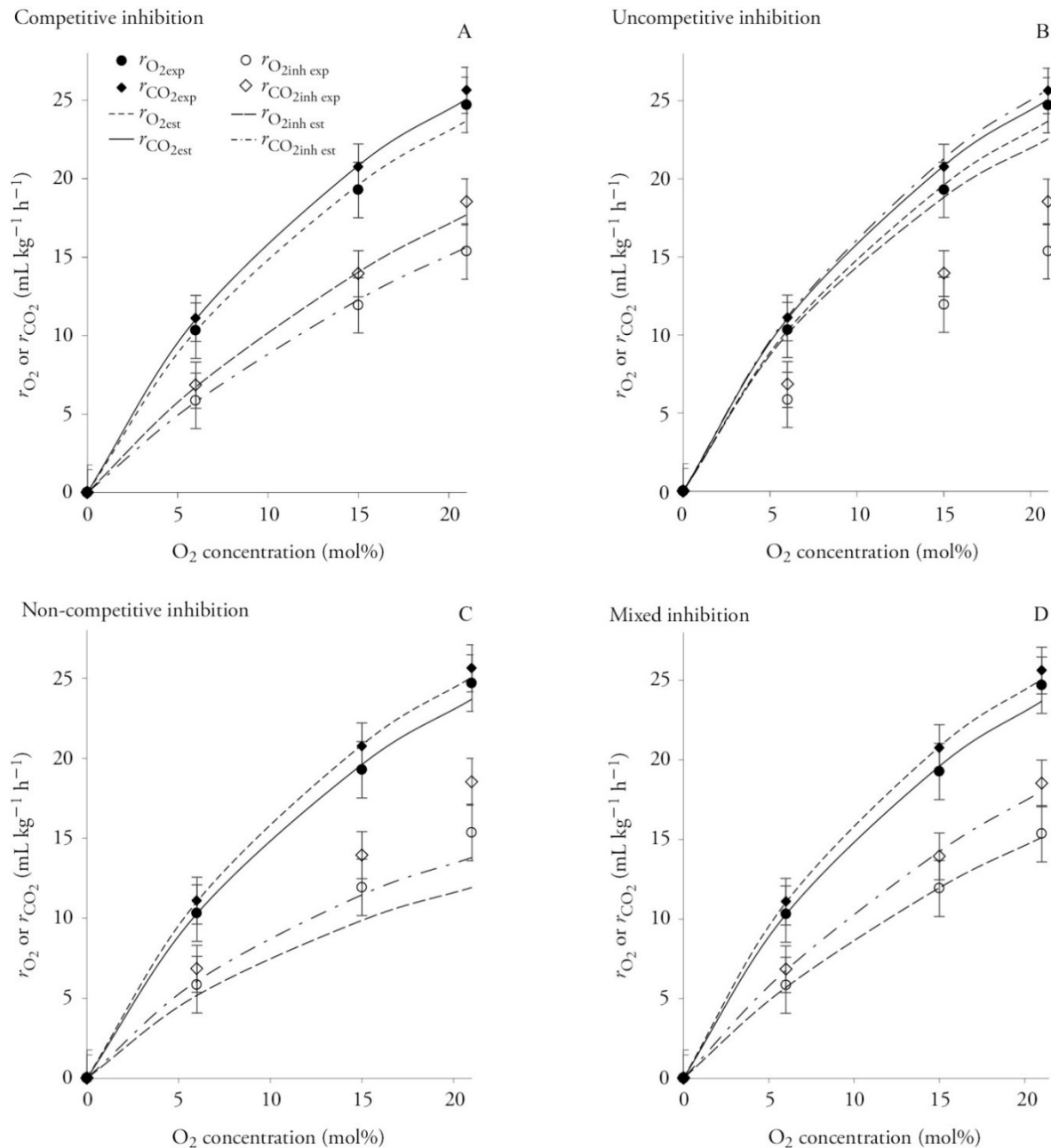


Figure 1. Estimated (est) and experimental (exp) O₂ consumption and CO₂ production rates, in absence and presence of the inhibitor (inh, 8 mol% CO₂) for “Hass” avocado at 8±1 °C. LSD for r_{O_2} =3.53 mL kg⁻¹ h⁻¹ and r_{CO_2} =2.92 mL kg⁻¹ h⁻¹, $\alpha=0.05$).

Figure 1. Velocidades estimadas (est) y experimentales (exp) de consumo de O₂ y producción de CO₂, en ausencia y presencia del inhibidor (inh, 8 %mol CO₂) para el aguacate “Hass” a 8±1 °C. LSD para r_{O_2} =3.53 mL kg⁻¹ h⁻¹ y r_{CO_2} =2.92 mL kg⁻¹ h⁻¹, $\alpha=0.05$).

h⁻¹ at 5 °C when using atmospheres with 2% O₂ and from 6 to 8% CO₂ in “Hass” and “Fuerte” avocado, respectively. The differences can be attributed to the different cultivars, state of maturation, and

de respiración. Este comportamiento fue similar al de otros frutos y vegetales almacenados en atmósferas modificadas (Song *et al.*, 2002; Geysen *et al.*, 2005; Cliffe-Byrnes y O’Beirne, 2007). Las velocidades

harvesting season (Yahia, 1997). The mechanism of action of carbon dioxide in the regulation of the respiratory metabolism in fruit and vegetables is complex. High exposure to CO₂ inhibits the activity of various enzymes involved in the respiration metabolism (Kerbel *et al.*, 1990). On the basis of the law of mass action, high CO₂ concentration causes a reduction of the respiration rate and decreases the energy available for the metabolic processes. CO₂ can cause a less availability of electron donors provided by the Krebs cycle slowing down general metabolism and oxidative phosphorylation, with the consequent decrease in available.

The O₂ consumption and CO₂ production rates in the presence of the inhibitor (8 mol% CO₂) were adequately simulated using the competitive (Figure 1A) and mixed (Figure 1D) inhibition models; considering the four respiration rates for each inhibition model the determination coefficients (R^2) were 0.967 and 0.968, respectively. From the linear regression analysis using the double-reciprocal or Lineweaver-Burk (LB) plot in the competitive inhibition model, the ordinates at the origin (y -intercepts) for the O₂ consumption rate in absence and presence of the inhibitor were very similar (0.020 and 0.022 kg h mL⁻¹), as expected for this model. The ordinates at the origin for the CO₂ production rate, without inhibitor and with inhibitor, were also very close (0.020 and 0.019 kg h mL⁻¹). In the mixed inhibition model there is one extra degree of freedom for the adjustment and that is why the determination coefficient is high ($R^2=0.968$). For this inhibition model, it is not expected that the ordinate at the origin, nor the slope, nor the abscissa at the origin were the same with and without inhibitor.

In the case of the uncompetitive and non-competitive models (Figures 1B and 1C), the respiration rates in the presence of the inhibitor were not satisfactorily estimated ($R^2=0.797$ and $R^2=0.932$), respectively. In the uncompetitive inhibition, the regression analysis using the LB plot showed that the slopes for the O₂ consumption (0.462 and 0.919 kg h mol% mL⁻¹) and CO₂ production (0.426 and 0.775 kg h mol% mL⁻¹) without and with inhibitor were different (they should have been similar), causing a bad estimation for both. Similarly, in the non-competitive inhibition models, the abscissas at the origin (x -intercepts) were different for the O₂ consumption rate in absence [-0.044

mínimas para el consumo de O₂ (5.84 mL kg⁻¹ h⁻¹) y la producción de CO₂ (6.84 mL kg⁻¹ h⁻¹) se obtuvieron para el tratamiento con 6 %mol O₂ y 8 %mol CO₂. Castellanos *et al.* (2017) reportaron para el aguacate “Hass” velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ de 4.17 a 25 mL kg⁻¹ h⁻¹ a 6 °C bajo diferentes concentraciones de gases. Russo *et al.* (2014) reportaron velocidades de producción de CO₂ de hasta 25 mL kg⁻¹ h⁻¹ y concluyeron que los tratamientos con las concentraciones de CO₂ más elevadas tenían las actividades respiratorias más bajas en aguacate “Fuerte” a 10±1 °C. Ahmed *et al.* (2007) reportaron velocidades de consumo de O₂ de 6.99 a 9.79 y de 3.32 a 6.03 mL kg⁻¹ h⁻¹ a 5 °C al emplear atmósferas con O₂ al 2% y CO₂ al 6-8% en aguacate “Hass” y “Fuerte”, respectivamente. Estas diferencias se pueden atribuir a los diferentes cultivares, el estado de maduración y la época de cosecha (Yahia, 1997). El mecanismo de acción del dióxido de carbono en la regulación del metabolismo respiratorio de frutos y vegetales es complejo. La exposición a CO₂ inhibe la actividad de varias enzimas involucradas en el metabolismo respiratorio (Kerbel *et al.*, 1990). Con base en la ley de acción de masas, altas concentraciones de CO₂ disminuyen la velocidad de respiración y la energía disponible para los procesos metabólicos. El CO₂ disminuye la disponibilidad de donadores de electrones proporcionados por el ciclo de Krebs, lo cual disminuye la velocidad del metabolismo en general y la fosforilación oxidativa, lo que a su vez disminuye el ATP disponible.

Las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ en la presencia del inhibidor (8 %mol CO₂) se simuló adecuadamente con los modelos de inhibición competitiva (Figura 1A) y mixta (Figura 1D); al considerar las cuatro velocidades de respiración para cada modelo de inhibición los coeficientes de determinación (R^2) fueron 0.967 y 0.968, respectivamente. A partir del análisis de regresión lineal por el método de Lineweaver-Burk (LB) o dobles recíprocos en el modelo de inhibición competitiva, las ordenadas al origen (intercepto y) para las velocidades de consumo de O₂ en ausencia y presencia del inhibidor fueron muy similares (0.020 y 0.022 kg h mL⁻¹), conforme a lo esperado para este modelo. Las ordenadas al origen para la velocidad de producción de CO₂, con y sin inhibidor, también fueron muy similares (0.020 y 0.019 kg h mL⁻¹). Aunado a esto, en el modelo de inhibición mixta hay un grado de

(mol%)⁻¹) and presence [-0.024 (mol%)⁻¹] of the inhibitor, and they should be very close. For the CO₂ production, they were also different, -0.046 (no inhibitor) and -0.024 (mol%)⁻¹ (with inhibitor), respectively.

Estimation of parameters

The maximum rates and the affinity constants for the O₂ consumption rates in absence of the inhibitor (CO₂) were $V_{mO_2} = 49.5 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $K_{mO_2} = 22.9 \text{ mol\% O}_2$. In the case of the CO₂ production rates, the corresponding kinetic parameters were $V_{mCO_2} = 51.0 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $K_{mCO_2} = 21.8 \text{ mol\% CO}_2$. Table 1 shows the estimated parameters of the respiration rate models based on the different types of inhibition. The dissociation constants for the enzyme-inhibitor and enzyme-substrate-inhibitor complexes used to model the inhibitory effect of CO₂ on the O₂ consumption rate were $K_{I_{O_2}}^c$, $K_{I_{O_2}}^n$, $K_{I_{O_2}}^{m_1}$ of 8.10 mol% and $K_{I_{O_2}}^u$, $K_{I_{O_2}}^{m_2}$ of 75.7 mol%. For the CO₂ production rate, these dissociation constants were $K_{I_{CO_2}}^c$, $K_{I_{CO_2}}^n$, $K_{I_{CO_2}}^{m_1}$ of 9.78 mol% and $K_{I_{CO_2}}^u$, $K_{I_{CO_2}}^{m_2}$ of -152.2 mol%. In the competitive inhibition the maximum respiration rates did not change ($V_{mO_2,app} = V_{mO_2}$ and $V_{mCO_2,app} = V_{mCO_2}$) because the inhibitor does not interfere in the dissociation of the enzyme-

libertad adicional para el ajuste, razón por la cual el coeficiente de determinación es alto ($R^2=0.968$). Para este modelo de inhibición no se espera que la ordenada al origen, ni la pendiente o abscisa al origen sean las mismas con o sin inhibidor.

En el caso de los modelos de inhibición acompetitiva y no competitiva (Figuras 1B y 1C), la determinación de las velocidades de respiración en la presencia del inhibidor no fue satisfactoria ($R^2=0.797$ y $R^2=0.932$, respectivamente). En la inhibición acompetitiva, el análisis de regresión con el método LB mostró que las pendientes para el consumo de O₂ (0.462 y 0.919 kg h %mol mL⁻¹) y la producción de CO₂ (0.426 y 0.775 kg h %mol mL⁻¹), con y sin inhibidor, eran diferentes (deberían ser similares), por lo que la estimación de ambas velocidades fue errónea. Igualmente, en los modelos de inhibición no competitiva, las abscisas al origen (intercepto x) fueron diferentes para la velocidad de consumo de O₂ en ausencia [-0.044 (%mol)⁻¹] y presencia [-0.024 (%mol)⁻¹] del inhibidor, y deberían ser muy parecidas. Las velocidades de producción de CO₂ también fueron diferentes, -0.046 (%mol)⁻¹ sin inhibidor y -0.024 (%mol)⁻¹ con inhibidor.

Estimación de parámetros

Las velocidades máximas y las constantes de afinidad para las velocidades de consumo de O₂ en ausencia del inhibidor (CO₂) fueron $V_{mO_2} = 49.5 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $K_{mO_2} = 22.9 \text{ mol\% O}_2$. En el caso de las

Table 1. Respiration model parameters for "Hass" avocado at 8±1°C
Cuadro 1. Parámetros del modelo de respiración para el aguacate "Hass" a 8±1°C.

Parameter	Inhibition model			
	Competitive	Uncompetitive	Non-competitive	Mixed
$V_{mO_2,app}$ (mL kg ⁻¹ h ⁻¹)	49.5	44.8	24.9	44.8
$V_{mCO_2,app}$ (mL kg ⁻¹ h ⁻¹)	51.0	53.9	28.1	53.9
$K_{mO_2,app}$ (mol%)	45.5	20.7	22.9	41.2
$K_{mCO_2,app}$ (mol%)	39.5	22.9	21.8	41.8
$R_{O_2,0\% CO_2}^2$	0.951	0.951	0.951	0.951
$R_{O_2,8\% CO_2}^2$	0.962	0.954	0.957	0.962
$R_{CO_2,0\% CO_2}^2$	0.958	0.958	0.958	0.958
$R_{CO_2,8\% CO_2}^2$	0.987	0.979	0.978	0.988

substrate complex. The apparent affinity constants ($K_{m_{O_2,app}}$ and $K_{m_{CO_2,app}}$) increased in the presence of the inhibitor with respect to those ($K_{m_{O_2}}$ and $K_{m_{CO_2}}$) without inhibitor, according to the kinetic model. In the case of mixed inhibition, the apparent maximum rate decreased for the O_2 consumption rate in the presence of the inhibitor, as it should be. However, for the CO_2 production rate this parameter increased, which is contrary to what the mixed inhibition establishes. The apparent affinity constants for both O_2 and CO_2 increased in the presence of the inhibitor, which indicates that the interaction of the enzyme-inhibitor predominates over that of the enzyme-substrate-inhibitor.

For the uncompetitive inhibition, the apparent maximum rate and affinity constant for O_2 decreased in the presence of the inhibitor in almost the same proportion, according to this type of inhibition. This effect was not found for the CO_2 , because contrary to what was expected, both apparent parameters increased. In the non-competitive inhibition, for both O_2 and CO_2 , the typical behavior was fulfilled, as the apparent maximum rate decreased, and the affinity constant did not change. Thus, given the high determination coefficients, the competitive or mixed inhibition models could be used to predict the O_2 consumption and CO_2 production rates as a function of oxygen and inhibitor concentrations.

Permeability estimations

Figure 2 shows the estimated and experimental total amount (Q) of diffused O_2 through the package as a function of time. In the regression analysis for the linear section of the graph, the amounts of diffused gas corresponding to 0, 0.25, and 0.5 h were not considered, and the steady state was adequately simulated ($R^2=0.999$). The estimated amount of diffused gas was satisfactorily modeled ($R^2=0.999$) using ten terms of the infinite series. The average permeabilities for the package at 8 ± 1 °C were 1.06×10^{-4} and 1.04×10^{-4} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹ for O_2 and CO_2 , respectively.

The order of the obtained permeabilities was higher than those reported for the usual polymer films used in MAP (Robertson, 2012), as well as for those reported for polyamides (Mangaraj *et al.*, 2009). In addition, Castellanos *et al.* (2017) stored avocado fruit in MAP at 12 °C; they used low density polyethylene and polypropylene bags with one

velocidades de producción de CO_2 , los parámetros cinéticos correspondientes fueron $\dot{V}_{m_{CO_2}}=51.0$ mL kg⁻¹h⁻¹ y $K_{m_{CO_2}}=21.8$ %mol CO_2 . El Cuadro 1 presenta los parámetros estimados de los modelos de velocidad de respiración basados en los diferentes tipos de inhibición. Las constantes de disociación de los complejos enzima-inhibidor y enzima-sustrato-inhibidor utilizados para modelar el efecto inhibitorio del CO_2 en la velocidad de consumo de O_2 fueron $K_{I_{O_2}}^c$, $K_{I_{O_2}}^n$, $K_{I_{O_2}}^{m_1}$ de 8.10 %mol y $K_{I_{O_2}}^u$, $K_{I_{O_2}}^{m_2}$ de 75.7 %mol. Para la velocidad de producción de CO_2 , las constantes de disociación fueron $K_{I_{CO_2}}^c$, $K_{I_{CO_2}}^n$, $K_{I_{CO_2}}^{m_1}$ de 9.78 %mol y $K_{I_{CO_2}}^u$, $K_{I_{CO_2}}^{m_2}$ de -152.2 %mol. En la inhibición competitiva, las velocidades de respiración máximas no cambiaron ($V_{m_{O_2,app}}=V_{m_{O_2}}$ y $V_{m_{CO_2,app}}=V_{m_{CO_2}}$), ya que el inhibidor no interfiere en la disociación del complejo enzima-sustrato. Las constantes de afinidad aparente ($K_{m_{O_2,app}}$ y $K_{m_{CO_2,app}}$) aumentaron en la presencia del inhibidor en comparación con aquellas sin inhibidor ($K_{m_{O_2}}$ y $K_{m_{CO_2}}$), esto conforme al modelo cinético. En el caso de la inhibición mixta, la velocidad máxima aparente disminuyó para la velocidad de consumo de O_2 en la presencia del inhibidor, como se esperaba. Sin embargo, para la velocidad de producción de CO_2 este parámetro aumentó, lo que difiere de lo establecido por la inhibición mixta. Las constantes de afinidad aparente para el O_2 y CO_2 aumentaron en la presencia del inhibidor y esto indica que la interacción del complejo enzima-inhibidor predomina sobre el complejo enzima-sustrato-inhibidor.

Para la inhibición acompetitiva la velocidad máxima aparente y la constante de afinidad para el O_2 disminuyeron en la presencia del inhibidor en casi la misma proporción, lo cual coincide con este tipo de inhibición. Este efecto no se observó para el CO_2 , ya que contrario a lo esperado, ambos parámetros aparentes aumentaron. En la inhibición no competitiva, para el O_2 y el CO_2 , se observó el comportamiento característico; es decir, la velocidad máxima aparente disminuyó y la constante de afinidad no cambió. Así, debido a los elevados coeficientes de determinación, los modelos de inhibición competitiva y mixta se podrían utilizar para predecir las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 como una función de las concentraciones de oxígeno y del inhibidor.

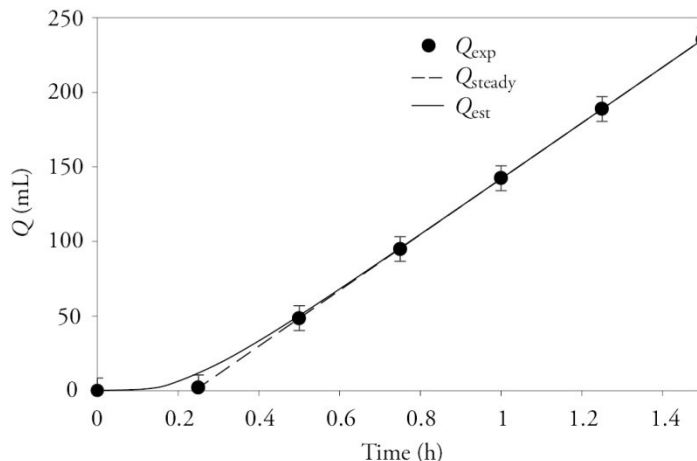


Figure 2. Estimated (est) and experimental (exp) total amount (Q) of diffused O_2 through the package in function of time at 8 ± 1 °C. LSD for $Q=16.7$ mL O_2 , $\alpha=0.05$). The dashed line indicates steady state.

Figura 2. Cantidad total (Q) estimada (est) y experimental (exp) de O_2 difundido a través del empaque en función del tiempo a 8 ± 1 °C. LSD para $Q=16.7$ mL O_2 , $\alpha=0.05$). La línea punteada indica el estado estacionario.

perforation of $280 \mu\text{m}$ and reported permeabilities to O_2 of 3.03×10^{-7} and 6.84×10^{-7} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹, and permeabilities to CO_2 of 1.39×10^{-6} and 5.36×10^{-6} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹, respectively. These differences in permeabilities can be attributed to the quantity and size of the microperforations in the package through which the gases were diffused.

Prediction of the O_2 and CO_2 concentrations inside the MAP

Figure 3 shows the estimated and experimental O_2 and CO_2 concentrations using the inhibition models at 8 ± 1 °C. During the first 48 h of storage, the experimental O_2 concentration inside the MAP rapidly decreased from 21 to 16 mol%, approximately. But the experimental CO_2 concentration progressively increased to establish a relative stability at around 7 mol% after 96 h of storage. The respiration rate was stabilized at 96 h allowing the package to establish a dynamic balance between the internal and external atmosphere. As expected, the atmosphere surrounding the fruit was modified, due to both the respiratory behavior of the fruit and the effect of the microperforations of the package (Radziejewska-Kubzdela and Czaczyk, 2017). This marked drop in O_2 concentration during the first hours of storage was described for other products stored under modified atmosphere packaging, as reported by Song *et al.*

Estimaciones de la permeabilidad

La Figura 2 muestra la cantidad total (Q) estimada y experimental del O_2 difundido a través del empaque en función del tiempo. En el análisis de regresión, para la sección lineal del gráfico, no se consideraron las cantidades de gas difundido a 0, 0.25 y 0.5 h, y el estado estacionario se simuló de forma adecuada ($R^2=0.999$). La cantidad estimada de gas difundido se modeló satisfactoriamente ($R^2=0.999$) utilizando diez términos de la serie infinita. El promedio de las permeabilidades para el empaque a 8 ± 1 °C fue 1.06×10^{-4} y 1.04×10^{-4} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹ para O_2 y CO_2 , respectivamente.

El orden de las permeabilidades obtenidas fue mayor al reportado para los polímeros de las películas que por lo general se usan para los MAP (Robertson, 2012), así como para los reportados para poliamidas (Mangaraj *et al.*, 2009). Además, Castellanos *et al.* (2017) almacenaron frutos de aguacate en MAP a 12 °C, emplearon bolsas de polietileno de baja densidad y de polipropileno con una perforación de $280 \mu\text{m}$, y reportaron permeabilidades al O_2 de 3.03×10^{-7} y 6.84×10^{-7} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹, y al CO_2 de 1.39×10^{-6} y 5.36×10^{-6} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹, respectivamente. Estas diferencias en la permeabilidad se pueden atribuir a la cantidad y tamaño de las microperforaciones en el empaque a través de las cuales se difunden los gases.

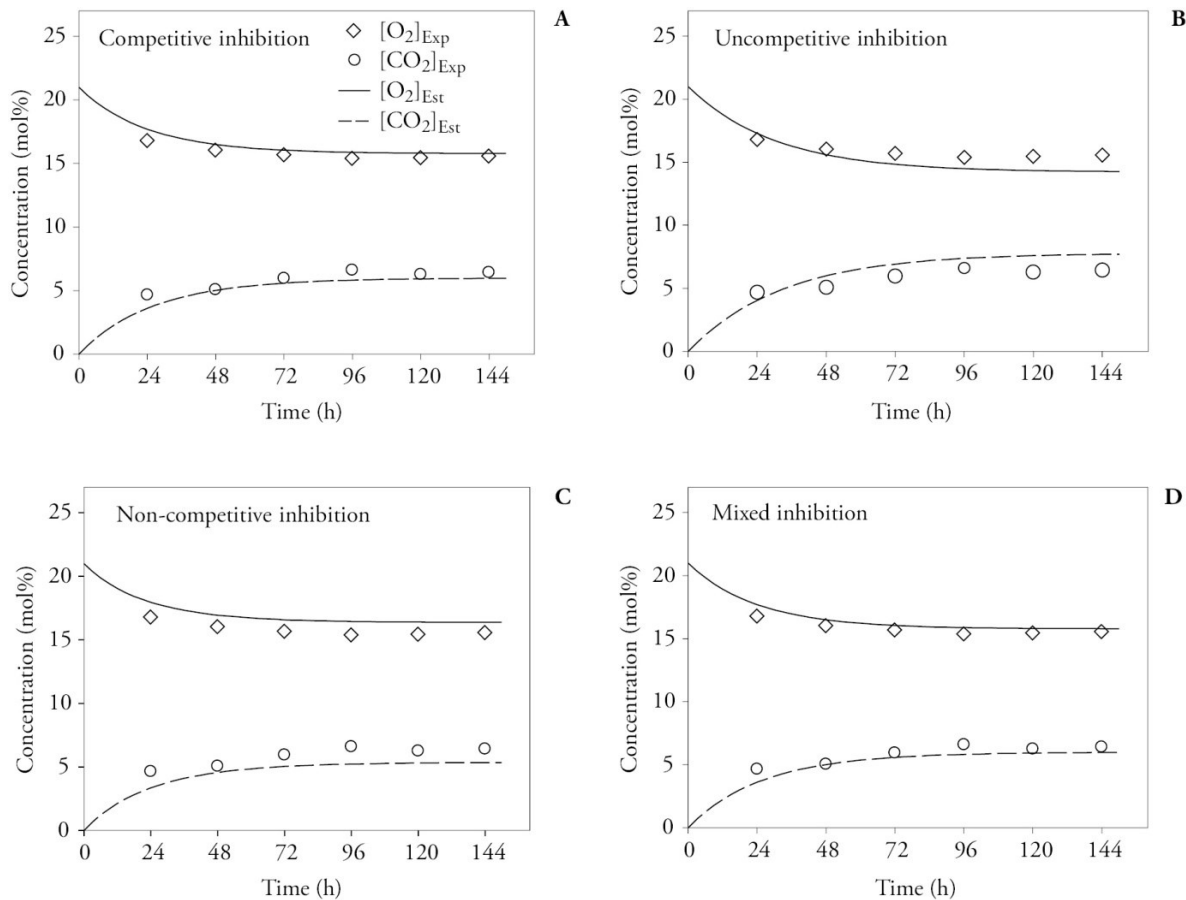


Figure 3. Estimated (est) and experimental (exp) O₂ and CO₂ concentrations inside the MAP with "Hass" avocado at 8±1 °C. LSD for [O₂]=0.57 mol% and [CO₂]=0.61 mol%, α=0.05).

Figura 3. Concentraciones estimadas (est) y experimentales (exp) de O₂ y CO₂ dentro del MAP con aguacate "Hass" a 8±1 °C. LSD para [O₂] = 0.57 %mol y [CO₂] = 0.61 %mol, α=0.05).

(2002) and Charoenchaitawornchit *et al.* (2002) who modeled the respiration in blackberry stored at 15 °C and mango cv. Nam Dok Mai at 13 °C. They observed a rapid increase in the CO₂ concentration inside the package at the beginning of the storage period.

A good correlation between the predicted and experimental concentrations for both O₂ and CO₂ was obtained using the enzymatic kinetic models with competitive inhibition (Figure 3A) ($R_{O_2}^2 = 0.983$; $R_{CO_2}^2 = 0.976$) and mixed inhibition (Figure 3D) ($R_{O_2}^2 = 0.984$; $R_{CO_2}^2 = 0.975$). This indicates that the predictions for O₂ and CO₂ concentrations using the mass balances with reaction and both competitive or mixed inhibition models adequately estimated

Predicción de las concentraciones de O₂ y CO₂ dentro del MAP

La Figura 3 muestra las concentraciones estimadas y experimentales de O₂ y CO₂ empleando los modelos de inhibición a 8±1 °C. Durante las primeras 48 h de almacenamiento, la concentración experimental de O₂ dentro del MAP tuvo una rápida disminución de 21 a 16 %mol, aproximadamente. Además, la concentración experimental de CO₂ aumentó de forma progresiva hasta alcanzar una estabilidad relativa a 7 %mol después de 96 h de almacenamiento. La velocidad de respiración se estabilizó a 96 h, lo que favoreció el establecimiento de un equilibrio dinámico dentro del empaque entre la atmósfera interna y externa. Como se esperaba, se obtuvo una atmósfera

the respiration of avocado inside the MAP. Morales-Castro *et al.* (1994) found a reasonable fit between the theoretical and experimental gas concentrations inside microporous packages for sweet corn on cob by using the differential equations from a mass balance. However, in the mixed inhibition model used in this study, the estimated kinetic parameters did not generate the expected behavior, that is, the apparent maximum rate for CO₂ did not decrease with the inhibitor and the dissociation constant of the enzyme-substrate-inhibitor complex for CO₂, $K_{I_{CO_2}}^{m_2}$ was negative (-152.2 mol%). In the case of the competitive inhibition model (Figure 3A), the estimated kinetic parameters produced the expected behavior, *i. e.*, the apparent affinity constant for both O₂ and CO₂ increased in the presence of the inhibitor, and the determination coefficients for the estimated and experimental concentrations for both O₂ and CO₂ were satisfactory ($R_{O_2}^2 = 0.983$; $R_{CO_2}^2 = 0.976$). For this reason, the competitive inhibition model was considered to be the best to estimate both concentrations during the storage of "Hass" avocado in the modified atmosphere package.

The uncompetitive (Figure 3B) and non-competitive (Figure 3D) inhibition models did not show an adequate adjustment ($R_{O_2}^2 = 0.956$; $R_{CO_2}^2 = 0.957$ and $R_{O_2}^2 = 0.989$; $R_{CO_2}^2 = 0.980$, respectively) to the O₂ and CO₂ concentrations inside the MAP. One of the fundamental aspects in MAP design is the knowledge of the package permeability to the gases for generating relative low O₂ and high CO₂ concentrations. Therefore, simulation using the competitive inhibition equation as the respiration rate model and the mass balance principles estimated the film permeabilities to generate concentrations close to 11 mol% of O₂ and 9.5 mol% of CO₂ (Figure 4), when a passive modified atmosphere is achieved using "Hass" avocado stored at 8 °C. Based on these proposed film permeabilities to O₂ (2.9×10^{-5} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹) and CO₂ (4.1×10^{-5} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹), the estimated O₂ and CO₂ concentrations inside the package after 72 h of storage were 13.1 and 7.9 mol%, respectively. In contrast, with the permeabilities of the package used in the present study, the correspondent concentrations were 16.0 and 5.6 mol%. After 144 h of storage, the estimated concentrations using the proposed film permeabilities were 11.0 and 9.5 mol%; while with the package permeabilities the respective

modificada alrededor del fruto debido al comportamiento respiratorio del mismo y al efecto de las microperforaciones en el empaque (Radziejewska-Kubzdela y Czaczyk, 2017). Esta disminución marcada en la concentración de O₂ durante las primeras horas de almacenamiento también se ha descrito para otros productos almacenados en empaques con atmósfera modificada, como reportan Song *et al.* (2002) y Charoenchaitawornchit *et al.* (2002) quienes modelaron la respiración en moras almacenadas a 15 °C y mango cv. Nam Dok Mai a 13 °C. Ellos observaron un aumento rápido en la concentración de CO₂ dentro del empaque al inicio del periodo de almacenamiento.

La correlación entre las concentraciones predichas y experimentales de O₂ y CO₂ fue buena con los modelos de cinética enzimática de inhibición competitiva (Figura 3A) ($R_{O_2}^2 = 0.983$; $R_{CO_2}^2 = 0.976$) e inhibición mixta (Figura 3D) ($R_{O_2}^2 = 0.984$; $R_{CO_2}^2 = 0.975$). Esto indica que las predicciones para las concentraciones de O₂ y CO₂ empleando los balances de masa con reacción y ambos modelos de inhibición, competitiva y mixta, estiman correctamente la respiración del aguacate dentro del MAP. Morales-Castro *et al.* (1994) encontraron un ajuste razonable entre las concentraciones de gas teóricas y experimentales dentro de los empaques con microperforaciones para la mazorca de maíz dulce empleando las ecuaciones diferenciales del balance de masa. Sin embargo, en el modelo de inhibición mixta usado en este estudio los parámetros cinéticos enzimáticos no generaron el comportamiento esperado; es decir, la velocidad máxima aparente para el CO₂ no disminuyó con el inhibidor, y la constante de disociación del complejo enzima-sustrato-inhibidor para el CO₂, $K_{I_{CO_2}}^{m_2}$, fue negativa (-152.2 %mol). En el modelo de inhibición competitiva (Figura 3A), los parámetros de cinética enzimática se comportaron conforme a lo esperado, es decir, la constante de afinidad aparente para el O₂ y CO₂ aumentó en la presencia del inhibidor, y los coeficientes de determinación para las concentraciones estimadas y experimentales de O₂ y CO₂ fueron satisfactorios ($R_{O_2}^2 = 0.983$; $R_{CO_2}^2 = 0.976$). Por esta razón, el modelo de inhibición competitiva se consideró el más adecuado para estimar ambas concentraciones durante el almacenamiento del aguacate "Hass" en el empaque con atmósfera modificada.

Los modelos de inhibición acompetitiva (Figura 3B) y no competitiva (Figura 3C) no presentaron

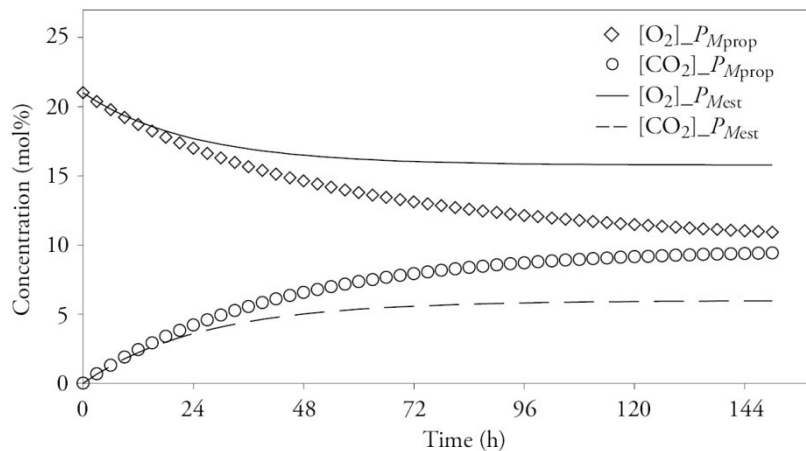


Figure 4. Estimated O₂ and CO₂ concentrations inside a MAP with “Hass” avocado at 8±1 °C using the proposed (prop) and estimated (est) permeabilities.

Figure 4. Concentraciones estimadas de O₂ y CO₂ dentro de un MAP con aguacate “Hass” a 8±1 °C empleando las permeabilidades propuestas (prop) y estimadas (est).

concentrations were 15.8 and 6.0 mol%. The gas concentrations inside the package were stabilized (10.0 and 9.5 mol% for O₂ and CO₂) after 240 h of storage. In this way, improving the permeabilities to O₂ and CO₂ of the package can be useful to prolong the shelf life of the “Hass” avocado.

CONCLUSIONS

The enzymatic kinetics of Michaelis-Menten with competitive inhibition allowed to adequately model the respiratory behavior of “Hass” avocado under different gaseous compositions using a closed system. A good adjustment was obtained for the estimations of O₂ consumption and CO₂ production rates with respect to the experimental ones. Based on the Fick's laws of diffusion, the permeability and the total amount of diffused gas (O₂ and CO₂) through the MAP film were satisfactorily estimated. The mathematical modeling, based on the mass balances in a non-stationary state and the O₂ consumption and CO₂ production rates, described with a model of competitive inhibition, allowed to satisfactorily predict the respiration process of “Hass” avocado stored in a MAP. In addition, the gas concentrations inside the package were simulated with proposed permeabilities in a way the system reaches stable concentrations, which could improve the internal atmosphere and extend the useful life of the “Hass” avocado when it is stored in a MAP.

un ajuste adecuado ($R_{O_2}^2=0.956$; $R_{CO_2}^2=0.957$ y $R_{O_2}^2=0.989$; $R_{CO_2}^2=0.980$, respectivamente) a las concentraciones de O₂ y CO₂ dentro del MAP. Uno de los aspectos fundamentales en el diseño de MAP es conocer la permeabilidad a los gases para generar concentraciones relativamente bajas de O₂ y altas de CO₂. Por lo tanto, la simulación con la ecuación de inhibición competitiva como modelo de velocidad de respiración y los principios de balance de masa estimaron las permeabilidades de la película para generar concentraciones cercanas a 11 %mol de O₂ y 9.5 %mol de CO₂ (Figura 4) cuando se alcanza una atmósfera modificada pasiva con aguacate “Hass” almacenado a 8 °C. Con base en estas permeabilidades propuestas al O₂ (2.9×10^{-5} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹) y CO₂ (4.1×10^{-5} mL cm cm⁻² h⁻¹ cmHg⁻¹), las concentraciones estimadas de O₂ y CO₂ dentro del empaque después de 72 h de almacenamiento fueron 13.1 y 7.9 %mol, respectivamente. En cambio, con las permeabilidades del empaque empleado en este estudio, las concentraciones correspondientes fueron 16.0 y 5.6 %mol. Después de 144 h de almacenamiento, las concentraciones estimadas con las permeabilidades propuestas de la película fueron 11.0 y 9.5 %mol; mientras que, con las permeabilidades del empaque, las concentraciones correspondientes fueron 15.8 y 6.0 %mol. Las concentraciones de gas dentro del empaque se estabilizaron (10.0 y 9.5 %mol para O₂ y CO₂) después de 240 h de almacenamiento.

LITERATURE CITED

- Ahmed, D., F. Ahmed, A. El-Mongy, B. Abu-Aziz, and A. Yousef. 2007. Postharvest storage of Hass and Fuerte avocados under modified atmosphere conditions. *J. Appl. Sci. Res.* 3: 267-274.
- Bill, M., D. Sivakumar, A. K. Thompson, and L. Korsten. 2014. Avocado fruit quality management during the postharvest supply chain. *Food Rev. Int.* 30: 169-202.
- Castellanos, D. A., R. Mendoza, R. Gavara, and A. O. Herrera. 2017. Respiration and ethylene generation modeling of "Hass" avocado and feijoa fruits and application in modified atmosphere packaging. *International J. Food Prop.* 20: 333-349.
- Charoenchaitawornchit, A., S. Kanlayanarat, and A. Tongta. 2002. Modeling of respiration and modified atmosphere packaging of mango "nam dok mai". *In: International Conference: Postharvest Unlimited 599*. pp: 489-494.
- Cliffe-Byrnes, V., and D. O'Beirne. 2007. Effects of gas atmosphere and temperature on the respiration rates of whole and sliced mushrooms (*Agaricus bisporus*)—Implications for film permeability in modified atmosphere packages. *J. Food Sci.* 72: E197-E204.
- Crank, J. 1975. *The Mathematics of Diffusion*. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford. 414 p.
- FAOSTAT, R. 2018. Faostat database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (Accessed: September 2019).
- Geysen, S., B. Verlinden, A. Conesa, and B. Nicolai. 2005. Modelling respiration of strawberry (cv. Elsanta) as a function of temperature, carbon dioxide, low and superatmospheric oxygen concentration. *Frutic* 5: 12-16.
- Gomes, M. H., R. M. Beaudry, D. P. Almeida, and F. X. Malcata. 2010. Modelling respiration of packaged fresh-cut 'Rocha' pear as affected by oxygen concentration and temperature. *J. Food Eng.* 96: 74-79.
- Hayakawa, K. i., Y. S. Henig, and S. G. Gilbert. 1975. Formulae for predicting gas exchange of fresh produce in polymeric film package. *J. Food Sci.* 40: 186-191.
- Iqbal, T., F. A. Rodrigues, P. V. Mahajan, and J. P. Kerry. 2009. Mathematical modeling of the influence of temperature and gas composition on the respiration rate of shredded carrots. *J. Food Eng.* 91: 325-332.
- Kader, A. A. and M. E. Saltveit. 2003. Respiration and gas exchange. *In: Bartz J. A., A., and J. K. Brecht.* (eds). *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp: 7-29.
- Kerbel, E. L., A. A. Kader, and R. J. Romani. 1990. Respiratory and glycolytic response of suspension-cultured 'Passe Crassane' pear fruit cells to elevated CO₂ concentrations. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115: 111-114.
- Lee, D., P. Hagggar, J. Lee, and K. Yam. 1991. Model for fresh produce respiration in modified atmospheres based on principles of enzyme kinetics. *J. Food Sci.* 56: 1580-1585.
- Lee, D. S., K. L. Yam, and L. Piergiiovanni. 2008. *Food Packaging and Science Technology*. CRC Press. Boca Raton, FL. 656 p.
- Mangaraj, S., T. Goswami, and P. Mahajan. 2009. Applications of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables: a review. *Food Eng. Rev.* 1: 133-158.
- Así, al mejorar las permeabilidades al O₂ y CO₂ del empaque se puede extender la vida útil del aguacate "Hass".

CONCLUSIONES

La cinética enzimática de Michaelis-Menten con inhibición competitiva permitió modelar adecuadamente el comportamiento respiratorio del aguacate "Hass" almacenado en un sistema cerrado bajo diferentes condiciones gaseosas. Una buena correlación se obtuvo de las estimaciones de las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ con respecto a las experimentales. Con base en las leyes de difusión de Fick, la permeabilidad y la cantidad total de gas difundido (O₂ y CO₂) a través de la película del MAP se estimaron satisfactoriamente. Los modelos matemáticos, basados en los balances de masa en un estado no estacionario y las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂, descritas con un modelo de inhibición competitiva, permitieron predecir el proceso de respiración del aguacate "Hass" almacenado en un MAP. Además, las concentraciones de gas dentro del empaque se simularon con las permeabilidades propuestas de forma que el sistema alcance concentraciones estables, lo cual podría mejorar la atmósfera interna y extender la vida útil del aguacate "Hass" almacenado en un MAP.

—Fin de la versión en Español—



- Mangaraj, S., and T. Goswami. 2011. Modeling of respiration rate of litchi fruit under aerobic conditions. *Food Bioprocess Technol.* 4: 272-281.
- Millar, A. H., J. Whelan, K. L. Soole, and D. A. Day. 2011. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 79-104.
- Montgomery, D. C. 2017. *Design and Analysis of Experiments*. 9th ed. John Wiley & Sons Inc. New York. 630 p.
- Morales-Castro, J., M. Rao, J. Hotchkiss, and D. Downing. 1994. Modified atmosphere packaging of head lettuce. *J. Food Process. Pres.* 18: 295-304.
- Oliveira, F., M. Sousa-Gallagher, P. Mahajan, and J. Teixeira. 2012. Development of shelf-life kinetic model for modified atmosphere packaging of fresh sliced mushrooms. *J. Food Eng.* 111: 466-473.
- Pandey, S. K., and T. K. Goswami. 2012. Modelling perforated mediated modified atmospheric packaging of capsicum. *Int. J. Food Sci. Tech.* 47: 556-563.

- Perez, K., J. Mercado, and H. Soto-Valdez. 2004. Note. Effect of storage temperature on the shelf life of Hass avocado (*Persea americana*). *Food Sci. Technol. Int.* 10: 73-77.
- Radziejewska-Kubzdela, E., and K. Czaczyk. 2017. The effect of organic acid pretreatment and modified atmosphere on shelf life of dry coleslaw mix. *J. Food Process. Pres.* 41: e13044.
- Rennie, T., and S. Tavoularis. 2009. Perforation-mediated modified atmosphere packaging. Part II. Implementation and numerical solution of a mathematical model. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 10-20.
- Robertson, G. L. 2012. *Food Packaging: Principles and Practice*. 3rd ed. CRC press. New York. 734 p.
- Russo, V. C., E. R. Daiuto, R. L. Vietes, and R. E. Smith. 2014. Postharvest parameters of the "Fuerte" avocado when refrigerated in different modified atmospheres. *J. Food Process. Pres.* 38: 2006-2013.
- SIAP. 2019. Sagarpa database. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php> (Accessed: September 2019).
- Song, Y., N. Vorsa, and K. L. Yam. 2002. Modeling respiration-transpiration in a modified atmosphere packaging system containing blueberry. *J. Food Eng.* 53: 103-109.
- Xiao, L., and M. Kiyota. 2000. Design of a modified atmosphere package for retaining freshness of avocado (*Persea americana*) fruits. *Environ. Control Biol.* 38: 157-164.
- Yahia, E. 1997. Modified/Controlled Atmospheres for Avocado (*Persea Americana* Mill). *In: Proceedings.* 3: 13-18. Davis: University of California.
- Yahia, E. M. 1998. Modified and controlled atmospheres for tropical fruits. *In: Janick, J. (ed). Horticultural Reviews.* J. Wiley & sons, Inc. New York. 22: 123-183.
- Yahia, E. M. 2012. Avocado. *In: D. Rees, G. Farrell, and J. Orchard (eds). Crop Post-Harvest: Science and Technology: Perishables.* Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 3: 159-186.

DESEMPEÑO DE ARQUETIPOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) EN DOS DENSIDADES DE POBLACIÓN

PERFORMANCE OF MAIZE IDEOTYPES (*Zea mays* L.) IN TWO PLANT DENSITIES

Marlen G. **Hidalgo-Sánchez**, Víctor A. **González-Hernández***, Leopoldo E. **Mendoza-Onofre**,
Nicacio **Cruz-Huerta**, Iván **Ramírez-Ramírez**

Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados, 56230. Montecillo, Estado de México. (vagh@colpos.mx)

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue contrastar las respuestas morfológicas y fisiológicas de arquetipos de maíz, al duplicar la densidad de siembra, además de identificar arquetipos eficientes para futuros programas de mejoramiento genético. Al respecto se postula que los arquetipos más rendidores de grano son también más eficientes en desempeño fisiológico. El diseño experimental fue de bloques al azar con arreglo de parcelas divididas; la parcela grande fue densidad de población, y la parcela chica el arquetipo, con cuatro repeticiones. Mediante variables morfológicas, fisiológicas y componentes del rendimiento se identificaron los genotipos con el mejor desempeño agronómico y mayor eficiencia fisiológica. El factor arquetipo (A) tuvo mayor efecto en las variables respecto a los factores densidad de población (D) e interacción $D \times A$. El aumento en la D causó un incremento del rendimiento de grano ($p \leq 0.05$) debido principalmente al aumento del índice de área foliar, sin modificar la tasa fotosintética ($p=0.05$). Los arquetipos sobresalientes fueron las líneas endogámicas L95 y L145, la variedad Dulce y los híbridos LPG133 y HS2 por sus índices de área foliar ($>3 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$), niveles de intercepción de radiación fotosintética ($>89\%$), altas tasas de fotosíntesis instantánea ($>39 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), prolificidad (>1.4 mazorcas por planta) y alto rendimiento de grano (6 a 18 t ha^{-1}), en promedio de las dos densidades.

Palabras clave: arquetipo de maíz, orientación de la hoja, LOV, fotosíntesis, índice de área foliar, rendimiento.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales que más se producen y consumen en el mundo (FAO-AMIS, 2018) y por el incremento de

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: agosto, 2018. Aprobado: enero, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 491-504. 2020.

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the morphological and physiological responses of maize ideotypes (*Zea mays* L.) at double planting density, as well as to identify efficient ideotypes for future breeding programs. It is postulated that higher grain-yielding ideotypes are also more physiologically efficient. The experimental design was random blocks arranged in a split plot design; the large plots corresponded to population densities, and the small plots to ideotypes, with four repetitions. Morphological and physiological variables, as well as yield components, allowed the identification of genotypes with better agronomic performance and greater physiological efficiency. The ideotype factor (A) had a more significant effect on the measured variables than population density (D) and $D \times A$ interaction factors. The increase in D caused an increment in grain yield ($p \leq 0.05$) mainly due to the increase in leaf area index, without modifying the photosynthetic rate ($p=0.05$). The outstanding ideotypes were inbred lines L95 and L145, the Dulce variety, and hybrids LPG133 and HS2, due to their higher values of leaf area index ($>3 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$), levels of photosynthetic radiation interception ($>89\%$), instant photosynthesis rate ($>39 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), prolificacy (>1.4 ears per plant), and grain yield (6 to 18 t ha^{-1}), on average of the two densities.

Key words: maize ideotype, leaf orientation, LOV, photosynthesis, leaf area index, yield.

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most produced and consumed cereals worldwide (FAO-AMIS, 2018), and the increasing population requires a corresponding increment in maize production. According to Rötter *et al.* (2015), the main challenge for producers and breeders in the 21st century is to achieve food security, as well

la población es evidente la necesidad de aumentar su producción. Según Rötter *et al.* (2015), el principal desafío para los productores y mejoradores del siglo XXI es lograr la seguridad alimentaria, además de mitigar los daños provocados por eventos climáticos extremos como sequías u olas de calor, por lo cual ellos remarcan la importancia de diseñar “plantas modelo” o arquetipos.

Mock y Pearce (1975) definieron al arquetipo ideal de maíz como una planta con hojas erectas arriba de la mazorca y horizontales debajo de la misma, espiga pequeña, tolerante a altas densidades y prolífica. A la fecha, la definición de arquetipo ha escalado de definir el comportamiento de una sola planta a basarse en el comportamiento del cultivo (Andrivon *et al.*, 2013) por lo cual se define como la combinación de rasgos morfológicos, fisiológicos y genéticos que optimicen el desarrollo del cultivo para un ambiente en particular (Martre *et al.*, 2015) que influyan en su fotosíntesis, crecimiento y producción de grano (Sharma *et al.*, 2013), con la finalidad de producir mayor calidad y cantidad de grano, aceites u otros productos de importancia antropocéntrica (Laurila *et al.*, 2012).

La estructura del dosel depende del índice de área foliar y de la geometría del cultivo (Stewart *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011). Una arquitectura óptima del dosel permite una captura de luz eficiente y una mejor circulación del aire, lo cual repercute de manera directa en la fotosíntesis y en el rendimiento final de grano (Liu *et al.*, 2012; Truong *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016).

El desempeño del cultivo depende de parámetros morfológicos y fisiológicos como área foliar, ángulo y orientación de la hoja, y tasa de fotosíntesis, por lo que su optimización puede constituir un método para incrementar el rendimiento de grano en maíz (Huang *et al.*, 2017). Esto es porque el rendimiento potencial está determinado por la energía radiante disponible, la eficiencia en la captura de la radiación y la conversión de la energía en biomasa aprovechable (Long *et al.*, 2015).

Según Zhu *et al.* (2012), el mejoramiento de maíz por medio de la selección de características morfológicas de plantas ha contribuido al reciente aumento del rendimiento y la resistencia a condiciones adversas como sequía y altas densidades de siembra, aunque ello no se ha reflejado en incremento de la tasa fotosintética por unidad de área. No obstante,

as to mitigate damages caused by extreme climatic events such as droughts or heat waves and, therefore, they emphasize the importance of designing “model plants” or ideotypes.

Mock and Pearce (1975) defined the ideal maize ideotype as a plant with erect short leaves above the ear and longer horizontal leaves under it, a small spike, tolerant to high plant densities, and prolific. To date, the definition of ideotype has escalated from defining the behavior of a single plant to the behaviour of a crop (Andrivon *et al.*, 2013). Thus, ideotype is the combination of morphological, physiological and genetic traits that optimize the crop development for a particular environment (Martre *et al.*, 2015), by increasing photosynthesis rate, plant growth, and grain production (Sharma *et al.*, 2013), in order to produce higher quality and quantity of grains, oils or other products of anthropocentric importance (Laurila *et al.*, 2012).

The canopy structure depends on the leaf area index and the crop geometry (Stewart *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011). An optimal canopy architecture allows efficient light capture and better air circulation, which directly affects photosynthesis and final grain yield (Liu *et al.*, 2012; Truong *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016).

Crop performance depends on morphological and physiological parameters such as leaf area, leaf angle and leaf orientation, and photosynthetic rate, so their optimization may be a method to increase grain yield in maize (Huang *et al.*, 2017). Altogether, the available radiant energy, the efficiency of radiation capture, and the conversion of energy into usable biomass determine potential yield (Long *et al.*, 2015).

According to Zhu *et al.* (2012), maize breeding through the selection of plant morphological traits has contributed to the recent increase in yield and resistance to adverse conditions such as drought and high planting densities, although the photosynthetic rate per leaf area unit has not increased. However, through genetic breeding the length of the photosynthetic period has increased due to longer growth cycles (Richards, 2000); thus, it is considered that higher canopy photosynthesis is essential for increased yield that meets future demands.

Grain yield is mainly determined by the number of grains per plant and by the weight of individual grains, which in turn are highly influenced by the

mediante el mejoramiento genético se ha conseguido aumentar la duración de la fotosíntesis debido al incremento del ciclo de crecimiento (Richards, 2000), por lo cual se considera que el aumento de la fotosíntesis del dosel es esencial para incrementar el rendimiento y afrontar las demandas futuras.

El rendimiento de grano está determinado de forma principal por el número de granos por planta y por el peso individual de grano, los cuales son altamente influenciados por el aumento en la densidad de siembra (Shi *et al.*, 2016) y por la prolificidad, la cual es la capacidad del maíz producir más de una mazorca en la misma planta (Tinca *et al.*, 2015).

Hoy en día, las técnicas de cultivo recientes se basan en las altas densidades de población. Sin embargo, si se establece un número de plantas superior al óptimo aumenta la competencia por luz, agua y nutrientes (Sher *et al.*, 2017); por el contrario, si se establecen pocas plantas por superficie se presentan problemas con malezas y desperdicio de suelo (Njoka *et al.*, 2005). Una planta de maíz tolerante a altas densidades de población debe tener hojas angostas, menor ángulo de inserción y mayor valor de orientación de la hoja (VOH) por arriba de la mazorca, hojas pequeñas y colgadas cerca de la mazorca y hojas pequeñas y erectas en la parte alta de la planta (Gou *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017).

El objetivo del presente estudio fue medir el desempeño en características morfológicas y fisiológicas de arquetipos de maíz, al duplicar la densidad de población, e identificar arquetipos eficientes para futuros programas de mejoramiento genético. Al respecto se postula que los arquetipos más eficientes en desempeño fisiológico son también más rendidores de grano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y localización del cultivo

El experimento se estableció en el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en Texcoco, Estado de México (19° 28' 4.16" N, 98° 53' 50.53" O, y altitud de 2250 m). El estudio incluyó nueve arquetipos de maíz (Cuadro 1) cultivados en dos densidades de población. Los arquetipos incluyeron seis líneas contrastantes en porte y orientación de hoja, una variedad regional llamada Dulce, y como testigos dos híbridos comerciales: HS2 de arquitectura convencional y PG133 de hoja erecta.

increase in plant density (Shi *et al.*, 2016) and by prolificity, which is the ability of maize to produce more than one ear on the same plant (Tinca *et al.*, 2015).

Nowadays, high plant population densities characterize modern cultivation techniques. However, a higher-than-optimal number of plants triggers an increased competition for light, water and nutrients (Sher *et al.*, 2017); on the contrary, problems with excess of weeds and soil waste arise when few plants per surface are established (Njoka *et al.*, 2005). A maize plant tolerant to high population densities should have narrow leaves, lower leaf insertion angle, higher leaf orientation value (LOV) above the ear, larger and hanging horizontal leaves near the cob, and small and erect leaves in the upper part of the plant (Gou *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017).

The objective of this study was to measure the performance of maize ideotypes in morphological and physiological characteristics, when doubling the population density, and to identify efficient ideotypes for future genetic breeding programs. It is postulated that the most efficient ideotypes in physiological performance will also yield more grain.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and crop location

The experiment was established at the Experimental Field of the Montecillo Campus, Colegio de Postgraduados, located in Texcoco, State of Mexico (19° 28' 4" N, 98° 53' 50" W, and altitude of 2250 m). The study included nine maize ideotypes (Table 1) grown in two population densities. These varieties included six experimental inbred lines contrasting on leaf angle and orientation, plus one regional variety called "Dulce", and two commercial hybrids as controls: HS2 of conventional architecture (tall plant with horizontal leaves), and PG133 (tall plant with erect leaves).

Sowing and cultivation conditions

Sowing was carried out on April 5, 2017, under irrigated field conditions. Each ideotype was established in two population densities (62,500 and 125 000 plants ha⁻¹), by sowing two seeds every 10 cm for the high density, or every 20 cm for the low density. At 58 d after planting (DAP), excess plants were removed to leave one plant per cluster. The experimental plot had four rows, 80 cm wide and 2 m long. To control the bud

Siembra y condiciones de cultivo

La siembra se efectuó el 5 de abril de 2017 en condiciones de riego, cada arquetipo se estableció en dos densidades de población (62 500 y 125 mil plantas ha⁻¹), con dos semillas cada 10 cm, para la densidad alta, y cada 20 cm, para la densidad baja. A los 58 d después de la siembra (dds) se eliminaron las plantas en exceso para dejar una planta por mata. La parcela experimental tuvo cuatro surcos de 80 cm de ancho y 2 m de largo. Para el control de gusano cogollero se hicieron dos aplicaciones de Malathion® 50 CE (515 g i. a. L⁻¹ de Malatión) con una dosis de 7.5 mL L⁻¹ agua, y dos aplicaciones de Gramoxone® (200 g L⁻¹ i.a. Paraquat) con una dosis de 6.66 mL L⁻¹ agua y dos deshierbes manuales para el control de malezas.

Variables morfológicas

Altura de mazorca y de planta

Las variables de altura se registraron con base en el Manual de Descriptores para Maíz (IBPGR, 1991), cuando las plantas alcanzaron su altura máxima en dos plantas útiles por parcela. La altura de mazorca se midió desde el nivel del suelo hasta el nudo de la mazorca superior, y la altura de planta desde el nivel del suelo a la base de la inflorescencia masculina (panícula).

Tamaño y orientación de la hoja

Las mediciones se efectuaron en las últimas tres hojas. Las variables de respuesta medidas fueron: ángulo de inserción de la hoja, longitud de la lámina foliar y longitud al cuelgue de la lámina foliar, las cuales se utilizaron para determinar un valor de

worm pest (*Spodoptera frugiperda*), Malathion® 50 CE (515 g i.a. L⁻¹ of Malathion) was sprayed twice at a dose of 7.5 mL L⁻¹ of water, and two applications of Gramoxone® at 6.66 mL L⁻¹ were made for weed control, plus two manual weeding events.

Morphological variables

Height of ear and plant

The height variables were recorded according to the Corn Descriptors Manual (IBPGR, 1991), on two plants per plot when they had reached their maximum height. Ear height was measured from the ground level to the upper ear node, while plant height was measured from the ground level to the base of the male inflorescence (panicle).

Leaf size and orientation

The following variables were measured on the upper three leaf blades: leaf insertion angle, leaf length, and hanging leaf length, which were used to calculate the leaf orientation value (LOV) through Equation 1, proposed by Ku *et al.* (2010).

$$VOH = \sum \frac{(90 - \theta) \times \left(\frac{Lf}{LL}\right)}{n} \quad (1)$$

where n : number of leaves measured per plant; θ : angle of leaf; Lf : distance from the ligule to the inclination point (hanging point); and LL : leaf blade length.

The leaf insertion angle (θ) was measured with the Clinometer® application installed on an iPhone 4S™ mobile

Cuadro 1. Características fenotípicas de los arquetipos de maíz evaluados.
Table 1. Phenotypic characteristics of the evaluated maize ideotypes.

Arquetipo	Características
L13	Valles altos, porte medio
L63	Valles altos, hojas erectas, porte bajo
L71	Tipo Tropicalita, prolífica, porte medio
L95	Valles altos/Tropicalita, prolífica
L126	Valles altos, hojas erectas, porte bajo
L145	Porte medio, hojas erectas
V. Dulce	Tipo Tropicalita/Valles altos, grano rojo, prolífica
T PG133	Híbrido de porte alto, hojas erectas, maíz blanco, prolífica
T HS2	Híbrido comercial del C.P. de porte alto y alto rendimiento.

L=Línea endogámica; V=Variedad; T=Testigo híbrido ♦ L=Inbred line; V=Variety; T=Hybrid control.

orientación de la hoja, VOH (LOV es su sigla en inglés, “Leaf Orientation Value”), mediante la Ecuación 1 propuesta por Ku *et al.* (2010).

$$VOH = \sum \frac{(90 - \theta) \times \left(\frac{Lf}{LL}\right)}{n} \quad (1)$$

donde n : número de hojas medidas, θ : ángulo de la hoja, Lf : distancia de la lígula al punto de inclinación (cuelgue), y LL : longitud de la lámina foliar.

El ángulo de inserción de la hoja se registró con la aplicación Clinometer® instalada en un teléfono móvil iPhone 4S™ y esta variable se definió desde la vertical del tallo a la lígula de la lámina foliar. La longitud de la lámina foliar (LL) se definió como la distancia desde la lígula al ápice de la lámina, y la longitud al cuelgue (Lf) como la distancia desde la lígula al punto en que la lámina cambia de orientación. Para clasificar los arquetipos evaluados según el ángulo de inserción de la hoja, se usó la Guía Técnica para la Descripción Varietal de Maíz (SNICS, 2014), la cual las cataloga como hojas erectas cuando tienen ángulos de inserción menores de 30° y semierectas cuando están entre 30° y 60°.

Variabes fisiológicas

Tasa instantánea de fotosíntesis (A)

La tasa instantánea de fotosíntesis (A) se midió en hojas maduras RFA igual o mayor a 1500 fotones $m^{-2} s^{-1}$, con el cielo despejado o escaso de nubes. La concentración de CO_2 en el aire osciló de 400 a 420 ppm.

Índice de área foliar (IAF) y radiación fotosintéticamente activa interceptada (RFAI)

Estas dos variables IAF y RFAI se midieron en la etapa de floración con un analizador de dosel vegetal LAI 2200C® (LICOR, Inc., USA). En cada parcela se hicieron dos lecturas por arriba del dosel y cuatro lecturas por debajo del mismo, a nivel del suelo y en forma diagonal entre los surcos intermedios. El sensor (lente) fue cubierto con un filtro de 45° para evitar el efecto de sombra de la persona que mide. Con los datos registrados el instrumento calculó el IAF promedio por parcela, así como el RFAI promedio por parcela (Ecuación 2).

$$IPAR(\%) = \frac{RFA_s}{PAR_i} \times 100 \quad (2)$$

phone; this variable was recorded as the distance from the stem vertical line to the leaf ligule. The leaf blade length (LL) was measured as the distance (cm) from the leaf ligule to the leaf apex, and the hanging leaf length (Lf) was recorded as the distance from the ligule to the point where the leaf changes orientation (*i.e.*, it starts to hang). Ideotypes were classified by the leaf insertion angle according to the Technical Guide for the Varietal Description of Corn (SNICS, 2014), which classifies the measured leaves as erect when their insertion angles are less than 30°, or semi-erect when the angle is between 30 and 60°.

Physiological variables

Instant photosynthesis rate (A)

The instantaneous photosynthesis rate (A) was measured on mature leaves where the upper ear is inserted, with a portable Li-6400® photosynthesis apparatus (LICOR, Inc., USA). These measurements were taken in the period from 65 to 100 DAP, between 11:00 and 14:00 when PAR was equal to or greater than 1500 $\mu mol photons m^{-2} s^{-1}$, corresponding to clear skies or scarce clouds. The CO_2 concentration in the air ranged from 400 to 420 ppm.

Leaf area index (LAI) and intercepted photosynthetically active radiation (IPAR)

These two variables were measured during the blooming stage with an LAI 2200C® canopy analyzer (LICOR, Inc., USA). In each plot two readings were made above the canopy and four readings at ground level and diagonally between the intermediate rows. The sensor (lens) was covered with a 45° filter to avoid the shadowing effect of the person measuring. With the data recorded, the instrument calculated the mean leaf area index per plot, as well as the average IPAR per plot (Equation 2):

$$IPAR(\%) = \frac{RFA_s}{PAR_i} \times 100 \quad (2)$$

Yield components

Prolificity

After each maize ideotype reached kernel physiological maturity stage, verified in each plot by the appearance of the black layer as proposed by Eastin *et al.* (1972), the total number of plants was counted in the intermediate rows, and the number of plants with two or more ears. The prolificity index (PI) was

Componentes del rendimiento

Prolificidad

Una vez que los arquetipos alcanzaron la madurez fisiológica del grano, verificada en cada parcela mediante la aparición de la capa negra conforme al método propuesto por Eastin *et al.* (1972), se contó el número de plantas finales de los surcos intermedios y las plantas con dos o más mazorcas. El IP (Ecuación 3) se calculó a partir del número de plantas a la cosecha.

$$IP = 1 + \frac{\text{Núm. de plantas con doble mazorca}}{\text{Núm. de plantas a la cosecha}} \quad (3)$$

Peso de grano por mazorca

En la etapa de madurez fisiológica se muestrearon dos plantas por parcela de cada arquetipo para determinar en ellas el peso seco de grano por planta. Para ello las mazorcas de cada planta se desgranaron, el grano se embolsó y se secó en una estufa con aire forzado Felisa 291 (México) a 72 °C durante 48 h.

Medición del rendimiento

El rendimiento de grano se determinó con el producto del peso de grano por planta y la densidad de población (Ecuación 4).

$$Rend(t\ ha^{-1}) = PGR \times DP \quad (4)$$

donde *Rend*: rendimiento de grano, *PGR*: peso de grano por planta, y *DP*: densidad de población.

Diseño experimental y análisis estadísticos

El diseño experimental en campo fue de bloques al azar con cuatro repeticiones, en arreglo factorial de parcelas divididas: la parcela grande (PG) fue la densidad de población y la parcela chica (PCH) fue el arquetipo. Para el análisis estadístico se utilizó un análisis de parcelas divididas en bloques al azar, mediante un análisis de varianza individual y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) con InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Previo a los análisis de varianza, con los datos de cada variable se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. En su caso, cuando fue necesario los datos se transformaron para cumplir la normalidad. Los resultados se presentaron en su escala original.

calculated from the number of plants harvested according to Equation 3:

$$PI = 1 + \frac{\text{Number of plants with two ears}}{\text{Number of harvested plants}} \quad (3)$$

Grain weight per ear

At physiological maturity, two plants of each ideotype were sampled per plot to determine the dry grain weight per plant. The ears of each plant were threshed, and the grain was bagged and dried in a forced air stove (Felisa 291, Mexico) at 72 °C for 48 h.

Grain yield

The grain yield was calculated with the product of grain weight per plant multiplied by the population density (Equation 4).

$$Rend(t\ ha^{-1}) = PGR \times DP \quad (4)$$

where *Rend*: grain yield; *PGR*: grain weight per plant (in t); and *DP*: population density.

Experimental design and statistical analyses

The statistical design in the field experiment was random blocks with four repetitions, in a factorial arrangement of a split plot design, where the large plots (PG) corresponded to the population densities, and the small plots (PCH) to the maize ideotypes. For the statistical analysis an analysis of variance of split plots divided into random blocks was used, through individual variance analysis and a means comparison by the Tukey test ($p \leq 0.05$), with the InfoStat statistical package (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Before the variance analyses, data for each variable were submitted to a normality and homogeneity variance tests, and data were transformed when necessary to meet normality. The results are reported in their original scale.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological characteristics

Height of ear and plant

The statistical analyses showed that the plant architecture (*i.e.*, the ideotype, A) was the only

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características morfológicas

Altura de mazorca y de planta

El análisis estadístico mostró que la arquitectura de la planta (*i. e.*, el arquetipo, A) fue el único factor que afectó significativamente a las alturas de planta y de mazorca ($p \leq 0.05$), mientras que los factores densidad de población (D) y la interacción D \times A no tuvieron efecto alguno. La altura de planta (AP) y la de mazorca (AMZ) son atributos importantes de la arquitectura de la planta, porque se asocian con el incremento histórico del rendimiento de maíz (Zhou *et al.*, 2016), con la tolerancia a altas densidades de población y con la resistencia al acame (Li *et al.*, 2016). El promedio de (AP) de los arquetipos de las dos densidades fluctuó de 136 a 294 cm, y la altura de mazorca de 59 a 175 cm (Figura 1). Según la comparación de medias se identificaron dos grupos: arquetipos de porte bajo (líneas L63, L71, L126 y L145), y de porte alto (líneas L13 y L95, Var. Dulce, e híbridos LPG133 y HS2). El arquetipo más bajo fue la línea L126 y el más alto el híbrido HS2, con

factor that significantly affected plant and ear heights ($p \leq 0.05$), while the population density (factor D) and the D \times A interaction factors had no significant effect. Plant height (AP) and ear height (AMZ) are essential attributes of plant architecture, because they are associated to the historical increase in maize yield (Zhou *et al.*, 2016), with tolerance to high population densities and resistance to lodging (Li *et al.*, 2016). The average plant height (AP) of the ideotypes evaluated in the two densities fluctuated from 136 to 294 cm, while ear height ranged from 59 to 175 cm (Figure 1). According to the mean comparison test, two groups were identified: low bearing ideotypes (lines L63, L71, L126, and L145) and high bearing (inbred lines L13 and L95, Var. Dulce, and hybrids LPG133 and HS2). The shortest ideotype was line L126, and the tallest was the HS2 hybrid, with a difference in plant height of 158 cm between the two ideotypes.

Leaf size and orientation

The ideotype factor (A) had a significant influence ($p \leq 0.05$) on the two leaf morphology variables (leaf insertion angle and leaf orientation value, LOV).

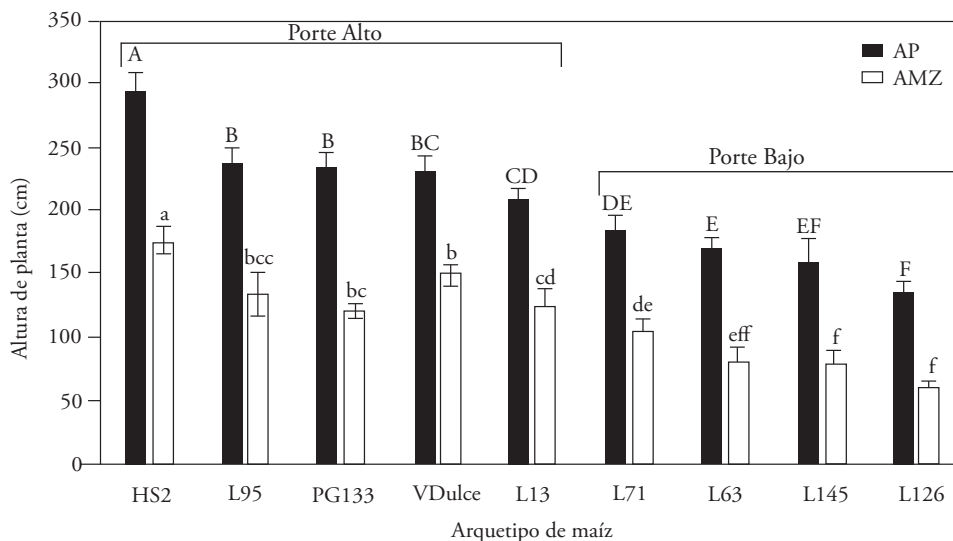


Figura 1. Alturas de mazorca (AMZ) y de planta (AP) de nueve arquetipos de maíz, en promedio de dos densidades de población (62 500 y 125 000 plantas ha^{-1}).

Medias con letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$) para altura de planta. Medias con letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$) para altura de mazorca.

Figure 1. Ear height (AMZ) and plant height (AP) of nine maize ideotypes, averaged in two population densities (62 500 and 125 000 plants ha^{-1}).

Means with different capital letters indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$) in plant height. Means with different lowercase letters indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$) for ear height.

una diferencia de 158 cm de altura de planta entre ambos.

Tamaño y orientación de la hoja

El factor arquetipo (A) ejerció influencia significativa ($p \leq 0.05$) en las dos variables de morfología de la hoja (ángulo de inserción y en la orientación de la hoja VOH). El factor densidad (D) sólo afectó ($p \leq 0.05$) VOH, pero no el ángulo de inserción (Cuadro 2); el efecto sobre VOH se atribuye al agrupamiento de las hojas en las condiciones de alta densidad. En contraste, Gou *et al.* (2017) reportaron en sus genotipos de maíz que el aumento de la densidad de población de 4.5 a 10.5 plantas m^{-2} ejerció efecto significativo en el ángulo de inserción de las hojas del dosel.

Los ángulos de inserción promedio entre arquetipos (Cuadro 2) fluctuaron entre 8 y 29°, y así fue posible identificar dos grupos de arquetipos: 1) con ángulos de inserción menores de 20° (L63, L126, L145 y PG133), cuyas hojas eran visiblemente erectas, y 2) con ángulos mayores de 20° (L13, L71, L95, VDulce y el híbrido HS2), que desarrollaron hojas

The plant density factor (D) only affected ($p \leq 0.05$) LOV, but not the insertion angle (Table 2); the effect on LOV is attributed to leaves overcrowding under conditions of high density. In contrast, Gou *et al.* (2017) reported in their studied maize genotypes that the increase in population density from 4.5 to 10.5 plants m^{-2} did have a significant effect on the insertion angle of leaves in the canopy.

The average insertion leaf angle ranged from 8 and 29° (Table 2) among ideotypes, so that it allowed identifying two groups of maize ideotypes: those with insertion angles of less than 20° (L63, L126, L145, and PG133) with visibly erect leaves, and ideotypes with leaf angles higher than 20° (L13, L71, L95, Var. Dulce and the HS2 hybrid), which developed more horizontal leaves. Regarding the leaf orientation value (LOV), ideotypes of erect leaves had values higher than 50, while LOV ranged from 22 to 45 in the ideotypes with horizontal leaves. Since maize leaves change their hanging point (LOV) as the population density is increased, without changing their insertion angles, it is convenient to use LOV as a selection criterion for maize leaf architecture breeding, as recommended by Pepper *et al.* (1977).

Cuadro 2. Medias de ángulo y de orientación de las hojas de nueve arquetipos de maíz crecidos en dos densidades de población (62 500 y 125 000 plantas ha^{-1}).

Tabla 2. Leaf angles and orientation mean values of nine maize ideotypes grown in two population densities (62 500 and 125 000 plants ha^{-1}).

Arquetipo	Ángulo de inserción de la hoja			Valor de orientación de la hoja (LOV)		
	DB	DA	Media de Arquetipos	DB	DA	Media de Arquetipos
L13	25.6	32.8	29.2 A	36.8	53.7	45.2 C
L63	8.0	8.8	08.4 D	81.8	81.1	81.5 A
L71	30.8	24.6	27.7 AB	24.2	42.3	33.3 DE
L95	23.7	20.1	21.9 BC	21.8	23.6	22.7 E
L126	16.0	14.3	15.2 CD	72.0	75.4	73.7 AB
L145	18.3	12.0	15.2 CD	66.0	75.0	70.5 B
VDulce	26.1	27.2	26.7 AB	26.0	36.9	31.4 DE
HS2	25.3	29.9	27.6 AB	27.1	28.6	27.8 DE
PG133	13.4	14.9	14.2 D	53.3	48.0	50.7 C
Media de DP	20.8 X	20.5 X		45.4 Y	51.6 X	

Medias con distintas letras mayúsculas (A-E) indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$) entre arquetipos (en promedio de densidades). Medias con distintas letras mayúsculas (X-Y) indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$) entre densidades (en promedio de arquetipos). DB: Densidad baja; DA: Densidad alta; DP: Densidad de población ♦ Means with different capital letters (A-E) indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$) between ideotypes (averaged over densities). Means with different capital letters (X-Y) indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$) between densities (averaged over ideotypes).

más horizontales. Los arquetipos de hojas erectas tuvieron VOH promedios por arquetipo mayores de 50, mientras que los VOH de los arquetipos con hojas más horizontales fluctuaron entre 22 y 45. Dado que al aumentar la densidad de población en maíz se modifica su orientación (VOH) y no su ángulo de inserción, es conveniente usar VOH como criterio de selección para el mejoramiento genético, como lo recomendaron Pepper *et al.* (1977).

Características fisiológicas

Los resultados indican que las tres variables fisiológicas medidas (tasa instantánea de fotosíntesis A, índice de área foliar IAF, y radiación fotosintéticamente activa interceptada RFAI) fueron influenciadas ($p \leq 0.05$) por el arquetipo, mientras que la densidad de población (D) afectó solo al IAF, y la interacción $D \times A$ tuvo un efecto significativo en IAF y a RFAI (Cuadro 3). La comparación entre arquetipos mostró que la tasa A osciló de 33.4 a 42.9 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, valores que concuerdan con Liu *et al.* (2012), quienes reportaron tasas de 23 a 33 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en maíz, y con Yan *et al.* (2017) quienes observaron tasas en maíz de 34 a 36.85 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Al respecto, Richards (2000) considera que mediante mejoramiento genético se ha incrementado el período de capacidad fotosintética debido a un mayor ciclo de crecimiento, porque una fotosíntesis más alta por el dosel es esencial para aumentar el rendimiento. Si bien la variación entre arquetipos es aprovechable, Zhu *et al.* (2012) señalan que el mejoramiento de maíz por medio de la selección de características morfológicas ha contribuido al aumento del rendimiento y a la resistencia a condiciones adversas como sequía y altas densidades de siembra, sin que ello se haya reflejado en incremento de la tasa fotosintética por unidad de área. Es decir, aún está pendiente la mejora de cultivos vía una tasa fotosintética mejor.

La manipulación de la densidad de siembra es una de las prácticas con impacto mayor en el IAF y por consiguiente en la intercepción de la radiación (Westgate *et al.*, 2004). Al respecto, el IAF promedio entre arquetipos varió de 2.3 a 4.1, donde los de porte alto (Var. Dulce y los híbridos HS2 y LPG133) alcanzaron los mayores IAF; cabe destacar que la línea endogámica de porte bajo L145 alcanzó un IAF similar al de los tres arquetipos anteriores.

Physiological characteristics

The results obtained indicate that the three physiological variables measured (instantaneous rate of photosynthesis A, leaf area index LAI, and photosynthetically active radiation intercepted PARI) were influenced ($p \leq 0.05$) by the ideotype, while the population density (D) affected only LAI, and the $D \times A$ interaction significantly affected LAI and PARI (Table 3). The comparison between ideotypes revealed that A ranged from 33.4 to 42.9 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, values that agree with Liu *et al.* (2012) who reported rates of 23 to 33 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in maize, and with Yan *et al.* (2017) who observed rates from 34 to 36 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in maize.

In that regard, Richards (2000) proposed that genetic improvement has increased the period of photosynthetic capacity due to longer growth cycles, since greater photosynthesis by the canopy is essential to increase yield. According to Zhu *et al.* (2012), although variation between ideotypes can be taken advantage of, they point out that maize breeding through the selection of morphological characteristics has contributed to the increase in yield and resistance to adverse conditions such as drought and high sowing densities, without this reflecting in an increase of the photosynthetic rate per area unit. Thus, crop improvement by enhancing photosynthetic rates is still pending.

Manipulation of plant density is one of the practices with the most significant impact on the LAI and, therefore, on radiation interception (Westgate *et al.*, 2004). Concerning this, the average LAI varied between ideotypes from 2.3 to 4.1, where the tallest ideotypes (Var. Dulce, and hybrids HS2 and LPG133) reached the highest LAI; however, it should be highlighted that a low-bearing inbred line (L145) reached a LAI value close to the three ideotypes quoted above.

Results showed small variation for PARI among ideotypes, since most of them intercepted about 90% of PAR, and only the inbred lines L13 and L63 showed a low percentage of interception (Table 3). The ideotypes with higher LAI also had higher PARI, which is consistent with Xue *et al.* (2016) who found that higher LAI is associated with higher radiation interception.

Cuadro 3. Desempeño fisiológico de nueve arquetipos de maíz crecidos en dos densidades de población (62 500 y 125 000 plantas ha⁻¹).
Table 3. Physiological performance of nine maize ideotypes grown in two population densities (62 500 and 125 000 plants ha⁻¹).

Arquetipo	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			IAF ($\text{m}^2 \text{ m}^{-2}$)		
	DB	DA	Media de arquetipos	DB	DA	Media de arquetipos
L13	34.3	32.4	33.4 B-C	1.7 i	2.9 d-g	2.3 D
L63	36.2	30.4	33.2 C	2.7 f-g	3.4 d-e	3.0 C-D
L71	39.6	39.9	39.8 A-C	2.4 g-i	3.6 c-d	3.0 C-D
L95	41.3	39.9	40.5 A	2.0 h-i	2.8 e-g	2.4 D
L126	42.7	43.2	42.9 A	2.5 g-h	2.9 d-g	2.7 D-E
L145	41.5	38.1	39.8 A-C	3.3 d-f	4.2 b-c	3.7 A-B
VDulce	38.5	40.0	39.2 A-C	2.3 g-i	4.5 b	3.4 B-C
HS2	36.6	41.4	38.9 A-C	2.6 f-h	5.3 a	4.0 A
PG133	40.9	38.6	39.7 A-C	3.5 d-e	4.6 a-b	4.1 A
Media de DP	39.02 X	38.19 X		2.6 Y	3.8 X	

Arquetipo	RFAI (%)		
	DB	DA	Media de arquetipos
L13	59.6 e	88.9 a-d	74.2 B
L63	52.8 e	81.3 d	67.1 B
L71	82.4 c-d	96.2 a-b	89.3 A
L95	86.0 a-d	92.5 a-d	89.2 A
L126	54.5 e	82.1 c-d	68.3 B
L145	93.3 a-d	93.8 a-d	93.6 A
VDulce	85.7 b-d	95.5 a-b	90.6 A
HS2	93.4 a-d	98.1 a	95.8 A
PG133	88.1 a-d	96.3 a-b	92.2 A
Media de DP	77.3 X	91.6 X	

Medias con distintas letras mayúsculas de inicio del alfabeto (A-E) indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$) entre arquetipos (en promedio de dos densidades). Medias con distintas letras mayúsculas del final (X-Y) indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$) entre densidades de población (en promedio de arquetipos). Medias con distintas letras minúsculas (a-e) indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$) entre las combinaciones de la interacción de los factores Densidad de Población y Arquetipo (D×A); DB: Densidad baja; DA: Densidad alta. A: Tasa fotosintética instantánea de mediodía ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); IAF: Índice de área foliar ($\text{m}^2 \text{ m}^{-2}$); RFAI: Radiación fotosintéticamente activa interceptada (%). DP: Densidad de población ♦ Means with different capital letters of the beginning of the alphabet (A-E) indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$) between ideotypes (on average of two densities). Means with different capital letters at the end (X-Y) indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$) between population densities (on average of ideotypes). Means with different lowercase letters (a-e) indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$) between the combinations of the interaction of the Population Density x Ideotype (D×A) factors. DB = Low plant population density; DA = High plant population density. A = Instant photosynthetic rate at noon ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); LAI = Leaf area index ($\text{m}^2 \text{ m}^{-2}$); PARI = photosynthetically active radiation intercepted (%). PD = Plant population density. Media de arquetipos = Ideotype average; Media de DP = Plant densities average.

Los resultados mostraron poca variación para RFAI entre arquetipos, porque la mayoría de ellos interceptaron cerca de 90% de la RFA, y sólo las líneas endogámicas L13 y L63 mostraron un porcentaje bajo de intercepción (Cuadro 3). Los arquetipos con

Grain yield and yield components

The increase in population density caused a decrease in the grain weight per ear and in prolificacy. Nonetheless, the overall effect of the increase in

IAF mayor tuvieron también RFAI más alto, lo cual concuerda con Xue *et al.* (2016) quienes encontraron que un IAF más elevado se asocia con una intercepción mayor de la radiación.

Rendimiento de grano y componentes del rendimiento

El aumento en la densidad de población disminuyó el peso de grano por mazorca y de la prolificidad. Sin embargo, el efecto global del aumento de la densidad produjo un incremento en el rendimiento final de grano (Figura 2). Lo anterior concuerda con lo reportado por Xu *et al.* (2017), quienes afirmaron que el aumento en rendimiento de grano en altas densidades de población se debe al incremento en el número de mazorcas por superficie, y no es afectado por el decremento de la prolificidad. El rendimiento de grano está determinado de forma principal por el número de granos por planta y por el peso individual de grano, los cuales son altamente influenciados por el aumento en la densidad de siembra (Shi *et al.*, 2016) y por la prolificidad que es la capacidad del maíz para producir más de una mazorca en la misma planta (Tinca *et al.*, 2015).

density produced an increase in the final grain yield (Figure 2). Similar results were reported by Xu *et al.* (2017) who claim that the increase in grain yield at high population densities is due to the increase in the number of ears per surface, and is not affected by the decrease in prolificacy. Grain yield is primarily determined by the number of grains per plant and by the size (weight) of individual grains, characteristics which are highly influenced by the increase in plant density (Shi *et al.*, 2016) and by the prolificacy which is the ability of maize to produce more than one ear on the same plant (Tinca *et al.*, 2015).

When considering yield components, results showed that the ideotypes that had a higher final grain yield (hybrids LPG133 and HS2) also had the highest rates of prolificacy and higher grain weight per ear, at both population densities (Table 4).

The statistical analyses showed that both population densities and ideotypes had a significant effect on prolificacy; however, in the variables grain weight per ear and grain yield, despite having vast differences between high and low density in several ideotypes, only the effect of the ideotype factor (A) had a highly significant effect ($p \leq 0.01$). This effect is mainly attributed to the wide variation (38 %) that the data sampled show (Figure 2).

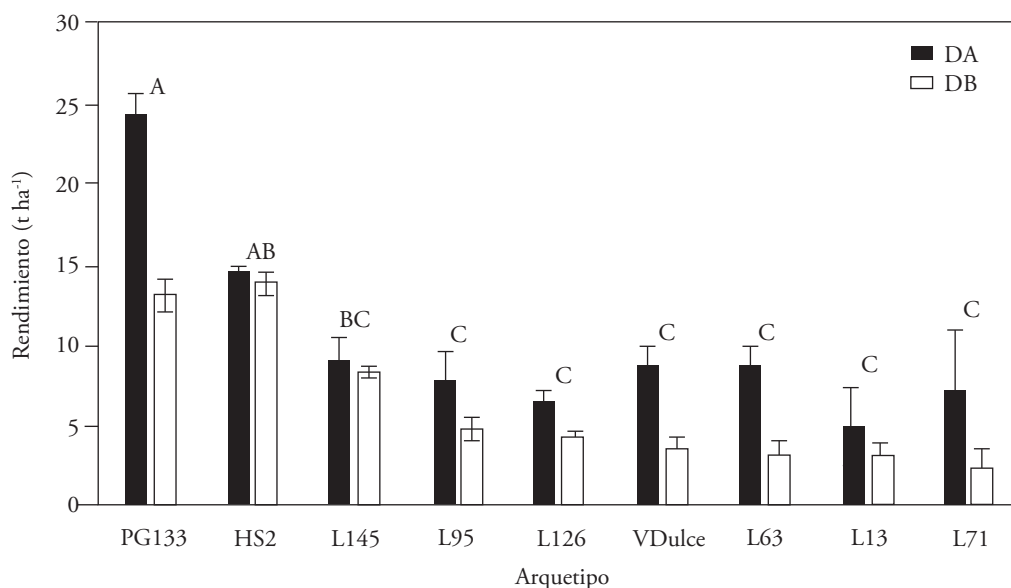


Figura 2. Rendimiento (t ha⁻¹) de nueve arquetipos de maíz cultivados en densidad baja (DB, 62,500 plantas ha⁻¹) y densidad alta (DA, 125,500 plantas ha⁻¹).

Figure 2. Grain yield (t ha⁻¹) of nine maize ideotypes grown in low density (DB, 62 500 plants ha⁻¹) and high density (DA, 125 500 plants ha⁻¹).

Al considerar los componentes del rendimiento, se detectó que los arquetipos que tuvieron un rendimiento final mayor de grano (los híbridos LPG133 y HS2) tuvieron también los índices más altos de prolificidad y peso mayor de grano por mazorca, en ambas densidades de población (Cuadro 4).

Los análisis estadísticos demostraron que las densidades de población y los arquetipos tuvieron efecto significativo en la prolificidad. Sin embargo, en las variables peso de grano por mazorca y rendimiento de grano, a pesar de haber amplias diferencias entre la densidad alta y baja en varios arquetipos, sólo el efecto del factor arquetipo (A) tuvo un efecto altamente significativo ($p \leq 0.01$); esto se atribuye principalmente a la variación amplia (38%) que presentaron los datos registrados en el muestreo (Figura 2).

CONCLUSIONES

El aumento de la densidad de población de 62 500 a 125 000 plantas ha^{-1} redujo el grado de cuelgue (inclinación) de las hojas y aumentó el índice de área foliar, la radiación interceptada y los componentes del rendimiento. El aumento del rendimiento de grano, asociado con un número mayor de plantas por superficie, se debió principalmente al aumento del área foliar; pero, no hubo ganancia en la tasa fotosintética unitaria al aumentar D.

CONCLUSIONS

The increase in population density from 62 500 to 125 000 plants ha^{-1} reduced the hanging degree (inclination) of leaves and increased the leaf area index, as well as the intercepted radiation and the yield components. The increase in grain yield, associated with a higher number of plants per surface area, was mainly due to the increase in leaf area index; instead, there was no gain in the photosynthetic rate when increasing plant population density.

The ideotypes that presented adaptation (tolerance) to the high population density were the hybrids HS2 and PG133, especially PG133, the Dulce variety, and two inbred lines, L95 and L145. Their performance was a result of high leaf area indices (except L95), which is why they could intercept a high proportion of the radiation received, produce more grains per ear and per surface, and form larger grains (except L95). The superior performance of the hybrids HS2 and PG133, compared to the other ideotypes, is explained mainly by heterosis. The inbred lines L95 and L145, without having heterosis, demonstrated high physiological efficiency in LAI, A, and PARI, as well as adequate prolificacy, thus demonstrating potential as parental lines of new, improved maize varieties.

—End of the English version—

-----*-----

Cuadro 4. Desempeño agronómico de nueve arquetipos de maíz crecidos en dos densidades de población (62 500 y 125 000 plantas ha^{-1}).

Table 4. Agronomic performance of nine maize ideotypes grown in two population densities (62 500 and 125 000 plants ha^{-1}).

Arquetipo	Prolificidad		Media de arquetipos	Peso de grano por mazorca (g)		Media de arquetipos
	Densidad baja	Densidad alta		Densidad baja	Densidad alta	
L13	1.5	1.3	1.36 CD	25.0	40.4	32.7 C
L63	1.4	1.3	1.32 DE	25.2	70.3	47.7 C
L71	1.7	1.4	1.52 BC	19.2	57.4	38.3 C
L95	1.5	1.2	1.32 DE	38.4	62.9	50.6 C
L126	1.4	1.1	1.26 DE	33.5	51.3	42.4 C
L145	1.6	1.2	1.40 CD	67.1	72.7	69.9 BC
VDulce	1.5	1.3	1.38 CD	27.8	71.4	49.6 C
HS2	1.7	1.4	1.57 B	111.3	117.5	114.4 AB
PG133	1.9	1.5	1.73 A	105.1	196.2	150.6 A
Media de DP	1.6 X	1.3 Y		111.4 X	86.2 X	

Medias con distintas letras indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$) ♦ Means with different letters indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$).

Los arquetipos con adaptación (tolerancia) a la densidad alta de población fueron los híbridos HS2 y PG133, en especial PG133, la variedad Dulce y dos líneas endogámicas L95 y L145, cuyo desempeño se debió a sus índices de área foliar elevados (excepto L95), por lo cual pudieron interceptar una proporción alta de la radiación recibida, producir mayor cantidad de granos por mazorca y por superficie, y formar granos más grandes (excepto L95). El desempeño superior de los híbridos HS2 y PG133 se explica por la heterosis. Las líneas endogámicas L95 y L145, sin tener heterosis, demostraron poseer alta eficiencia fisiológica en IAF, A y RFAI, así como una prolificidad adecuada, con lo cual demuestran potencial como líneas progenitoras de nuevas variedades mejoradas de maíz.

LITERATURA CITADA

- Andrивon, D., C. Giorgetti, A. Baranger, A. Calonnet, P. Cartolaro, R. Faivre, S. Guyader, P.-E. Lauri, F. Lescourret, and L. Parisi. 2013. Defining and designing plant architectural ideotypes to control epidemics? *Eur. J. Plant Pathol.* 135: 611-617.
- Di Rienzo, J., F. Casanoves, M. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y C. Robledo. 2008. InfoStat software estadístico, versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Eastin J.D., J. H. Hultquist, and C. Y. Sullivan. 1972. Physiological maturity in grain sorghum. *Crop Sci.* 13: 175-178. doi:10.2135/cropsci1973.0011183X001300020008x
- FAO-AMIS (Food and Agriculture Organization, Agricultural Management Information System Statistics). 2018. World Total Cereals at a glance. <http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html>. (Consulta: febrero 2018).
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2015. Perspectivas por sectores principales. Producción de cultivos. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/004/y3557s/y3557s04.pdf>. (Consulta: noviembre 2017).
- Gou, L., J. Xue, B. Qi, B. Ma, and W. Zhang. 2017. Morphological variation of maize cultivars in response to elevated plant densities. *Agron. J.* 109: 1443-1453.
- Huang, S., Y. Gao, Y. Li, L. Xu, H. Tao, and P. Wang. 2017. Influence of plant architecture on maize physiology and yield in the Heilonggang River valley. *The Crop J.* 5: 52-62.
- IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources, CIMMYT). 1991. Descriptors for Maize. https://archivecgpr.cgiar.org/fileadmin/biodiversity/publications/pdfs/104_Descriptors_for_maize.Descriptores_para_maiz.Descripteurs_pour_le_mais-cache=1415188810.pdf. (Consulta: noviembre 2016)
- Ku, L., W. Zhao, J. Zhang, L. Wu, C. Wang, P. Wang, W. Zhang, and Y. Chen. 2010. Quantitative trait loci mapping of leaf angle and leaf orientation value in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Gen.* 121: 951-959.
- Laurila, H. A., P. Mäkelä, J. Kleemola, and J. Peltonen. 2012. A comparative ideotype, yield component and cultivation value analysis for spring wheat adaptation in Finland. *Agric. Food Sci.* 21: 384-408.
- Li, X., Z. Zhou, J. Ding, Y. Wu, B. Zhou, R. Wang, J. Ma, S. Wang, X. Zhang, and Z. Xia. 2016. Combined linkage and association mapping reveals QTL and candidate genes for plant and ear height in maize. *Front. Plant Sci.* 7: 833.
- Liu, T., F. Song, S. Liu, and X. Zhu. 2011. Canopy structure, light interception, and photosynthetic characteristics under different narrow-wide planting patterns in maize at silking stage. *Spanish J. Agric. Res.* 9: 1249-1261.
- Liu, T., F. Song, S. Liu, and X. Zhu. 2012. Light interception and radiation use efficiency response to narrow-wide row planting patterns in maize. *Austr. J. Crop Sci.* 6: 506.
- Long, S. P., A. Marshall-Colon, and X.-G. Zhu. 2015. Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell* 161: 56-66.
- Martre, P., B. Quilot-Turion, D. Luquet, M.-M. O.-S. Memmah, K. Chenu, and P. Debaeke. 2015. Model-Assisted Phenotyping and Ideotype Design. *Crop Physiology* (Second Edition). Elsevier. pp: 349-373.
- Mock, J., and R. Pearce. 1975. An ideotype of maize. *Euphytica* 24: 613-623.
- Njoka, E., M. Muraya, and M. Okumu. 2005. Plant density and thinning regime effect on maize (*Zea mays*) grain and fodder yield. *Australian J. Exp. Agric.* 44: 1215-1219.
- Pepper, G., R. Pearce, and J. Mock. 1977. Leaf orientation and yield of maize. *Crop Sci.* 17: 883-886.
- Richards, R. 2000. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.* 51: 447-458.
- Rötter, R., F. Tao, J. Höhn, and T. Palosuo. 2015. Use of crop simulation modelling to aid ideotype design of future cereal cultivars. *J. Exp. Bot.* 66: 3463-3476.
- Sharma, D., G. S. Sanghera, P. Sahu, P. Sahu, M. Parikh, B. Sharma, P. Chaudhari, and B. K. Jena. 2013. Tailoring rice plants for sustainable yield through ideotype breeding and physiological interventions. *Afr. J. Agric. Res.* 8: 5004-5019.
- Sher, A., A. Khan, L. Cai, M. Ahmad, and U. Asharf. 2017. Response of maize grown under high plant density; Performance, issues and management. A critical review. *Adv. Crop Sci Tech.* 5: 2.
- SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). 2014. Guía Técnica para la Descripción Varietal de Maíz (*Zea mays* L.). <http://snics.sagarpa.gob.mx/dov/Documents/GUIAS/Maiz.pdf>. (Consulta: octubre 2016)
- Stewart, D., C. Costa, L. Dwyer, D. Smith, R. Hamilton, and B. Ma. 2003. Canopy structure, light interception, and photosynthesis in maize. *Agron. J.* 95: 1465-1474.
- Tinca, E., I. Has, and A. Copădean. 2015. Prolificacy study of maize (*Zea mays* L.) inbred lines and hybrids on ARDS-Turda. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture* 72: 547-550.
- Truong, S. K., R. F. McCormick, W. L. Rooney, and J. E. Mullet. 2015. Harnessing genetic variation in leaf angle to increase productivity of sorghum bicolor. *Genetics* 201: 1229-1238.
- Westgate, M. E., M. E. Otegui, and F. H. Andrade. 2004. Physiology of the corn plant. *In: Smith, C. W., J. Betrán, and R. A. Runge* (eds). *Corn: Origin, History, Technology and Production*. John Wiley & Sons. pp: 235-271.

- Xu, W., C. Liu, K. Wang, R. Xie, B. Ming, Y. Wang, G. Zhang, G. Liu, R. Zhao, and P. Fan. 2017. Adjusting maize plant density to different climatic conditions across a large longitudinal distance in China. *Field Crops Res.* 212: 126-134.
- Xue, J., L. Gou, Y. Zhao, M. Yao, H. Yao, J. Tian, and W. Zhang. 2016. Effects of light intensity within the canopy on maize lodging. *Field Crops Res.* 188: 133-141.
- Yan, P., J. Pan, W. Zhang, J. Shi, X. Chen, and Z. Cui. 2017. A high plant density reduces the ability of maize to use soil nitrogen. *PloS One* 12: 1-12.
- Zhou, Z., C. Zhang, Y. Zhou, Z. Hao, Z. Wang, X. Zeng, H. Di, M. Li, D. Zhang, and H. Yong. 2016. Genetic dissection of maize plant architecture with an ultra-high density bin map based on recombinant inbred lines. *BMC Genomics* 17: 178.
- Zhu, X.-G., Q. Song and D. R. Ort. 2012. Elements of a dynamic systems model of canopy photosynthesis. *Current Opinion Plant Biol.* 15: 237-244.

COMPUESTOS FENÓLICOS, CAROTENOIDES Y CAPSAICINOIDES EN FRUTOS DE *Capsicum* spp. DE TABASCO, MÉXICO

PHENOLIC COMPOUNDS, CAROTENOIDS AND CAPSAICINOIDS IN FRUITS OF SPECIES OF *Capsicum* spp. FROM TABASCO, MEXICO

Dario de la Cruz-Ricardez¹, Carlos F. Ortiz-García¹, Luz del C. Lagunes-Espinoza¹,
Magdiel Torres-de la Cruz², Edith Hernández-Nataren¹

¹Producción Agroalimentaria en el Trópico. Campus Tabasco. Colegio de Postgraduados. 86500. H. Cárdenas, Tabasco, México (lagunesc@colpos.mx). ²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas, Km 0.5, C.P. 86039, Villahermosa, Tabasco, México.

RESUMEN

Los chiles silvestres (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México, forman parte de la cultura gastronómica pero su composición nutricional y de metabolitos secundarios se conoce poco. Dado que estos chiles son fuente importante de metabolitos secundarios, los que pueden variar en función de la especie, estado de madurez y componente del fruto, el objetivo de este experimento fue determinar el contenido de carotenoides totales (CAT), polifenoles totales (PFT), flavonoides totales (FLT), capsaicina (CAP) y dihidro-capsaicina (DHC) en frutos inmaduros y maduros de especies silvestres: chile amashito (AMAS) (*C. annuum* var. *glabriusculum*), chile garbanzo (GARB) (*Capsicum* sp.), chile pico paloma (PICP) (*C. frutescens*) y una especie comercial de chile habanero (HABA) (*C. chinense*) cultivada en el estado de Tabasco. El diseño experimental fue completamente al azar por un arreglo factorial con tres repeticiones, considerando las especies y estado de madurez. Los chiles maduros mostraron el contenido mayor de CAT, sobresalieron el pericarpio de HABA maduro (52.23 mg g⁻¹), el fruto completo de PICP (46.16 mg g⁻¹) y el pericarpio de GARB (34.89 mg g⁻¹). El contenido menor de CAT correspondió a AMAS en todos los componentes del fruto. La madurez de los frutos no afectó a PFT y los pericarpios presentaron el contenido mayor (14.19 mg g⁻¹, AMAS, a 19.17 mg g⁻¹, HABA). Los intervalos de variación entre componentes y estado de madurez para FLT fueron 16.29-29.11 mg g⁻¹ (HABA), 11.92-28.17 mg g⁻¹ (PICP), 11.06-24.78 mg g⁻¹ (AMAS) y 1.7-26.36 mg g⁻¹ (GARB). En frutos completos, HABA tuvo más capsaicinoides en estado maduro (21.51 y 12.18 mg g⁻¹, CAP y DHC, respectivamente) e inmaduro (20.43 y 11.03 mg g⁻¹, CAP y DHC).

ABSTRACT

Wild chili peppers (*Capsicum* spp.) in Tabasco, Mexico, are a part of the culinary culture, although little is known about their nutritional composition and secondary metabolites. Given that these peppers are an important source of secondary metabolites, which can vary with the species, their stage of maturity and fruit components, the aim of this experiment was to determine the content of total carotenoids (CAT), total polyphenols (PFT), total flavonoids (FLT), capsaicin (CAP) and dihydrocapsaicin (DHC) in immature and mature fruits of wild species of amashito pepper (AMAS) (*C. annuum* var. *glabriusculum*), garbanzo pepper (GARB) (*Capsicum* sp.), pico paloma pepper (PICP) (*C. frutescens*) and a commercial species of habanero pepper (HABA) (*C. chinense*) grown in the state of Tabasco. The experimental design was completely randomized, with a factorial arrangement with three replications, considering the species and the stage of maturity. The mature peppers displayed the highest content of CAT, and the pericarp of mature HABA (52.23 mg g⁻¹), the complete PICP fruit (46.16 mg g⁻¹) and the pericarp of GARB (34.89 mg g⁻¹) stood out. The lowest content of CAT was displayed by AMAS in all the components of the fruit. Fruit maturity did not affect PFT and the pericarps displayed the highest contents (14.19 mg g⁻¹, AMAS, at 19.17 mg g⁻¹, HABA). The intervals of variation between components and the stage of maturity for FLT were 16.29-29.11 mg g⁻¹ (HABA), 11.92-28.17 mg g⁻¹ (PICP), of 11.06-24.78 mg g⁻¹ (AMAS) and 1.7-26.36 mg g⁻¹ (GARB). In whole fruits, HABA presented more capsaicinoids in mature fruits (21.51 and 12.18 mg g⁻¹, CAP and DHC, respectively) and immature (20.43 and 11.03 mg g⁻¹, CAP and DHC). CAP and DHC in immature AMAS fruits had 6.04 and 3.73 mg g⁻¹, and in mature fruits, 6.86 and 3.80 mg g⁻¹. The variation in secondary metabolites between the wild chili peppers evaluated shows their potential as a source of bioactive compounds.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2018. Aprobado: noviembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 505-519. 2020.

CAP y DHC en frutos inmaduros de AMAS presentaron 6.04 y 3.73 mg g⁻¹, y en maduros 6.86 y 3.80 mg g⁻¹. La variación en metabolitos secundarios entre los chiles silvestres evaluados, muestra su potencial como fuente de compuestos bioactivos.

Palabras clave: metabolitos secundarios, *Capsicum*, capsaicina, polifenoles totales, carotenoides.

INTRODUCCIÓN

Entre las especies del género *Capsicum*, *C. annuum* es una de las más importantes en el mundo; en México se encuentra y cultiva en casi todo el país (Pickersgill, 2007). Otras especies de *Capsicum* con importancia regional son *C. chinense*, cultivada principalmente en la Península de Yucatán, y *C. pubescens* en zonas altas de los estados de Michoacán, Querétaro, Oaxaca, Hidalgo, Veracruz y Chiapas (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). En el estado de Tabasco, además de cultivarse variedades de *C. annuum* y *C. chinense*, se encuentran en forma silvestre y semidomesticada a *C. annuum* var. *glabriusculum* y *C. frutescens*, respectivamente; y también otras variantes de *Capsicum* sin identificación taxonómica, y que podrían ser el resultado de la hibridación natural entre poblaciones de chiles silvestres en el estado (Narez-Jiménez *et al.*, 2014). A *C. frutescens* y *C. annuum* var. *glabriusculum* se les conoce con el nombre común de pico paloma y amashito, respectivamente (Castañón-Nájera *et al.*, 2008). Esta última especie es el pariente silvestre más cercano a las variedades cultivadas de *C. annuum*, tiene amplia distribución nacional, muestra diversidad morfológica y genética (Hernández-Verdugo *et al.*, 2012), presenta latencia de sus semillas (Prado-Urbina *et al.*, 2015), y posee compuestos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

Los frutos del género *Capsicum* producen metabolitos secundarios como carotenoides, alcaloides (capsaicinoides), compuestos fenólicos, ácido ascórbico y otros antioxidantes que les confieren importancia económica, valor nutricional, medicinal e incluso cosmético (Hoensch y Oertel, 2015; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). Estos compuestos varían en su concentración de acuerdo con la especie, el nivel de madurez, las condiciones de estrés, la fertilización, el manejo postcosecha de los frutos, e incluso la vida de anaquel (Butcher *et al.*, 2012; Loizzo *et al.*, 2015; Campos-Hernández *et al.*, 2018). También hay varia-

Keywords: secondary metabolites, *Capsicum*, capsaicin, total polyphenols, carotenoids.

INTRODUCTION

Out of the species of the *Capsicum* genus, *C. annuum*, is one of the most important worldwide; in Mexico, it is found and grown in almost the entire country (Pickersgill, 2007). Other regionally important *Capsicum* species are *C. chinense*, mainly in the Yucatan peninsula, and *C. pubescens* in the highlands of the states of Michoacán, Querétaro, Oaxaca, Hidalgo, Veracruz and Chiapas (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). In the state of Tabasco, varieties of *C. annuum* and *C. chinense* are grown and *C. annuum* var. *glabriusculum* and *C. frutescens* are found in the wild and semi-domesticated, respectively. In addition, there are other *Capsicum* variations, without a taxonomical identification, and that could be the result of a natural hybridization between populations of wild peppers in the state (Narez-Jiménez *et al.*, 2014). *Capsicum frutescens* and *C. annuum* var. *glabriusculum* are known with the common names of pico paloma and amashito, respectively (Castañón-Nájera *et al.*, 2008). The latter species is the nearest wild relative to the cultivated *C. annuum* varieties; it has a wide national distribution, it displays morphological and genetic diversity (Hernández-Verdugo *et al.*, 2012), as well as latency of its seeds (Prado-Urbina *et al.*, 2015), and it contains compounds with antioxidant and antimicrobial properties (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

The fruits of the *Capsicum* genus produce secondary metabolites such as carotenoids, alkaloids (capsaicinoids), phenolic compounds, ascorbic acid and other antioxidants that make them economically important and nutritionally, medicinally and even cosmetically valuable (Hoensch and Oertel, 2015; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). These compounds vary in their concentration, depending on their species, maturity level, stress conditions, fertilization, fruit postharvest handling, and even shelf life (Butcher *et al.*, 2012; Loizzo *et al.*, 2015; Campos-Hernández *et al.*, 2018). There is also variation in the total content of these compounds, between fruit components (pericarp, seeds and placenta). Capsaicinoids, capsaicin and dihydrocapsaicin, which give the spicy flavors, are synthesized in the placenta of the fruits, where they make up around

ción en el contenido total de estos compuestos, entre los componentes del fruto (pericarpio, semillas y placenta). Los capsaicinoides, capsaicina y dihidrocapsaicina, responsables del sabor picante, se sintetizan en la placenta de los frutos, donde constituyen alrededor del 90% del contenido total de capsaicinoides (Stewart *et al.*, 2005; Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

Entre los metabolitos secundarios, los compuestos fenólicos y carotenoides de los frutos de *Capsicum* presentan propiedades antifúngicas (Moreno-Limón *et al.*, 2012; Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015; Popelka *et al.*, 2017). En México hay registros de cuantificación de metabolitos secundarios para frutos de *C. chinense* (habanero) y *C. annuum* (serrano, jalapeño y morrón) los cuales son los más comercializados (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011; Butcher *et al.*, 2012; Campos-Hernández *et al.*, 2018). En las variantes silvestres, el contenido de metabolitos secundarios se ha evaluado en diferentes morfotipos de chiles de Oaxaca, Méx. (Vera-Guzmán *et al.*, 2011) y del norte de México (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2012). Al considerar la importancia nutritiva, medicinal, antioxidante y antifúngica de los compuestos bioactivos de frutos del género *Capsicum* de otras regiones de México, el objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides y capsaicinoides totales de cuatro especies de *Capsicum* presentes en Tabasco. La hipótesis fue que los chiles silvestres en Tabasco son fuente de metabolitos secundarios, los cuales varían en función de la especie y estado de madurez.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El estudio incluyó frutos completos maduros (color rojo) e inmaduros (color verde) de chile amashito (*C. annuum* var. *glabriusculum*), chile pico paloma (*C. frutescens*) y chile garbanzo (*Capsicum* sp.) recolectados de poblaciones silvestres en el ejido Rafael Martínez de Escobar del municipio de Huimanguillo (17° 43' 26" N, 93° 22' 97" O). Los frutos de chile habanero de color naranja (*C. chinense*) cultivados en el estado, se obtuvieron del mercado público del municipio de Cárdenas. De cada especie, los frutos seleccionados se lavaron para formar seis grupos con 100 frutos cada uno. Tres grupos se separaron por componentes (pericarpio, semilla y placenta), y los otros tres se formaron con frutos completos. Frutos completos y componentes se secaron al sol, pesaron y molieron. Las muestras molidas, por separado,

90% of the total content of capsaicinoids (Stewart *et al.*, 2005; Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

Among the secondary metabolites, the phenolic compounds and carotenoids in the *Capsicum* fruits display antifungal properties (Moreno-Limón *et al.*, 2012; Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015; Popelka *et al.*, 2017). In Mexico, there are records of the quantification of secondary metabolites for *C. chinense* (habanero) and *C. annuum* (serrano, jalapeño and bell pepper) fruits, which are the most widely commercialized (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011; Butcher *et al.*, 2012; Campos-Hernández *et al.*, 2018). In the wild variations, the content of secondary metabolites were evaluated in different morphotypes of peppers from Oaxaca, Mexico (Vera-Guzmán *et al.*, 2011) and Northern Mexico (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2012). When considering the nutritional, medicinal, antioxidant and antifungal importance of the bioactive compounds of fruits of the *Capsicum* genus from other regions in Mexico, the aim of this research was to determine the content of total carotenoids, phenolic compounds, flavonoids and capsaicinoids in four *Capsicum* species found in Tabasco. The hypothesis was that wild peppers in Tabasco are a source of secondary metabolites, which vary based on the species and stage of maturity.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The study included whole mature (red) and immature (green) amashito pepper (*C. annuum* var. *glabriusculum*), pico paloma pepper (*C. frutescens*) and garbanzo pepper (*Capsicum* sp.), which were gathered in wild populations in the Rafael Martínez de Escobar *ejido* in the municipal area of Huimanguillo (17° 43' 26" N, 93° 22' 97" W). Orange-colored habanero peppers (*C. chinense*) grown in the state were obtained in the public market of the municipal area of Cárdenas. The fruits of each species were washed and six groups were obtained with 100 fruits each. Three groups were separated by components (pericarp, seed and placenta), and the other three were obtained with whole fruits. Whole fruits and components were sun-dried, weighed and ground. The ground samples, separately, were stored at 5 °C until analyzed. Due to the low amounts of placentas obtained, these samples only underwent capsaicin and dihydrocapsaicin analyses.

se conservaron a 5 °C hasta su análisis. Debido a la baja cantidad obtenida de las placentas, en estas muestras solo se realizaron análisis de capsaicina y dihidrocapsaicina.

Carotenoides totales

Los carotenoides totales (CAT) se extrajeron con el método propuesto por Talcott y Howard (1999), usando una solución de acetona/etanol (1:1) mezclada con reactivo BHT [(2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-kresol) Sigma-Aldrich®]. Para la cuantificación, se leyó la absorbancia a 470 nm, en un espectrómetro UV-VIS (Multiskan Go modelo 51119300, Thermo Fisher Scientific, USA). El contenido de CAT se calculó de acuerdo con Gross (1991) y la ecuación $(AV \times 10^6) / (A^{1\%} \times 100G)$, donde A es la absorbancia a 470 nm, V es el volumen total de extracto, $A^{1\%}$ es el coeficiente de extinción para una mezcla de disolventes fijados arbitrariamente en 2500, y G es el peso seco (g) de la muestra.

Polifenoles totales (PFT)

Previo a la extracción de PFT, las muestras se desengrasaron con hexano al 95%, en una relación muestra/hexano 1:10 (p/v). El precipitado seco obtenido se conservó a 4 °C protegido de la luz hasta su uso. La extracción y cuantificación de los PFT se efectuó con el método descrito por Singleton *et al.* (1999) y se usó metanol al 80%. La cuantificación se hizo con el reactivo Folin-Denis al 50%, y carbonato de sodio anhidro al 15%. La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrómetro UV-VIS (Multiskan Go modelo 51119300, Thermo Fisher Scientific, USA). Una solución estándar de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) se utilizó para preparar la curva de calibración de 0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Flavonoides totales (FLT)

La extracción de FLT se realizó con el método de Alvarez-Parrilla *et al.* (2011) con metanol al 80%. La cuantificación de FLT se realizó de acuerdo con Menichini *et al.* (2009) con NaNO_3 al 5%, AlCl_3 al 10% (p/v) y NaOH 1 M. La absorbancia se leyó a 510 nm en un espectrómetro UV-VIS (Multiskan Go modelo 51119300, Thermo Fisher Scientific, USA). Una solución estándar de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetin al 95% (Sigma-Aldrich®) se usó para generar la curva de calibración de 100 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El contenido de FLT se expresó en mg g^{-1} de peso seco.

Capsaicinoides (CAP)

Los capsaicinoides CAP y dihidrocapsaicina (DHC) se extrajeron de acuerdo con Collins *et al.* (1995) y Nwokem *et al.*

Total carotenoids

Total carotenoids (CAT) were extracted using the method proposed by Talcott and Howard (1999), using an acetone/ethanol (1:1) solution, mixed with a BHT reagent [(2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-kresol) Sigma-Aldrich®]. For the quantification, absorbance was read at 470 nm in a UV-VIS spectrometer (Multiskan Go model 51119300, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.). The content of CAT was estimated according to Gross (1991) and the equation $(AV \times 10^6) / (A^{1\%} \times 100G)$, where A is the absorbance at 470 nm, V is the total volume of extract, $A^{1\%}$ is the extinction coefficient for a mixture of solvents, fixed arbitrarily at 2500, and G is the dry weight (g) of the sample.

Total polyphenols (PFT)

Before the extraction of PFT, we removed the grease from the samples using hexane at 95%, in a sample/hexane ratio 1:10 (p/v). The dry precipitate was kept at 4 °C, away from direct light until use. The extraction and quantification of the PFT was carried out with the method described by Singleton *et al.* (1999), and methanol at 80% was used. The quantification was carried out with the reagent Folin-Denis at 50%, and anhydrous sodium carbonate at 15%. Absorbance was read at 765 nm in a UV-VIS spectrometer (Multiskan Go model 51119300, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.). A standard solution of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of gallic acid (Sigma-Aldrich®) was used to prepare the calibration curve from 0 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Total flavonoids (FLT)

Extraction of FLT was carried out using the method described by Alvarez-Parrilla *et al.* (2011) with methanol at 80%. FLT quantification was performed according to Menichini *et al.* (2009) with NaNO_3 at 5%, AlCl_3 at 10% (p/v) and NaOH 1 M. Absorbance was read at 510 nm in a UV-VIS spectrometer (Multiskan Go model 51119300, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.). A standard solution of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of quercetin at 95% (Sigma-Aldrich®) was used to generate the calibration curve from 100 to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The content of FLT was expressed in mg g^{-1} of dry weight.

Capsaicinoids (CAP)

Capsaicinoids (CAP) and dihydrocapsaicin (DHC) were extracted according to Collins *et al.* (1995) and Nwokem *et al.* (2010) with methanol at 100% and a double boiler at 80 °C for 4 h. The identification and quantification of CAP and DHC contents were carried out in a gas chromatographer (GC) (Varian

(2010) con metanol al 100% y baño maría a 80 °C por 4 h. La identificación y cuantificación del contenido de CAP y DHC se hizo en un cromatógrafo de gases (GC) (Varian modelo 3900), acoplado a espectrometría de masas (MS) modelo Saturn 2100T. Las condiciones de separación fueron: columna capilar VF-5ms (95% metilpolisiloxano, 5% fenil), 30 m, 0.25 mm f y 0.25 μ m, inyector a 260 °C en modo Splitless, el gas portador fue He, 99.99% pureza, 1.2 mL min⁻¹. Un volumen de 1.0 μ L se inyectó a mano. La rampa de temperatura usada fue: inicial 232 °C por 1 min, incremento de 0.4 °C hasta 240 °C y se mantuvo constante 1.5 min. El tiempo total de análisis por muestra fue 22.5 min. El contenido de CAP y DHC se calculó con los cromatogramas obtenidos de la curva de calibración de 250, 500 y 1000 mg L⁻¹ de capsaicina (Sigma-Aldrich®) y dihidrocapsaicina (Sigma-Aldrich®). Los espectros de los extractos se compararon con los estándares y con la biblioteca NIST MS search 2.0 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) y los datos cuantitativos se obtuvieron, a partir de la integración de las áreas de los picos. Los resultados se expresaron en mg g⁻¹ de peso seco.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con ANDEVA, bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 4x2. El primer factor fue la especie (*C. annum* var. *glabriusculum*, *Capsicum* sp., *C. chinense* y *C. frutescens*), y el segundo factor fue el estado de madurez del fruto (maduro e inmaduro), así como su interacción. La diferencia entre los tratamientos se evaluó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), usando el software estadístico InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Carotenoides totales

Diferencias significativas se observaron en el contenido de carotenoides totales entre las especies, estado de madurez e interacción, tanto en fruto completo como en pericarpio (Cuadro 1). El mayor contenido de carotenoides se encontró en los chiles maduros de las especies evaluadas (Figura 1), y sobresalió el pericarpio de *C. chinense* (52.23 mg g⁻¹), seguido del fruto completo de *C. frutescens* (46.16 mg g⁻¹) y el pericarpio de *Capsicum* sp. (34.89 mg g⁻¹). El menor contenido de carotenoides lo presentó el chile amashito en todos los componentes del fruto. Pero este chile mostró la menor disminución en contenido de carotenoides entre los estados de madurez evaluados

model 3900), connected to a mass spectrometer (MS) model Saturn 2100T. The conditions of separation were: capillary column VF-5ms (95% methylpolysiloxane, 5% phenyl), 30 m, 0.25 mm f and 0.25 μ m, injector at 260 °C in Splitless mode, the carrier gas was He, 99.99% purity, 1.2 mL min⁻¹. A volume of 1.0 μ L was injected by hand. The temperature ramp used was, initially, 232 °C for 1 min, an increase of 0.4 °C until 240 °C and it was maintained constant for 1.5 min. The total time of analysis per sample was 22.5 min. The content of CAP and of DHC was calculated with the chromatograms obtained from the calibration curve of 250, 500 and 1000 mg L⁻¹ of capsaicin (Sigma-Aldrich®) and dihydrocapsaicin (Sigma-Aldrich®). The spectra of the extracts were compared with the standards and with the library NIST MS search 2.0 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, U.S.A.) and quantitative data were obtained from the integration of the areas of the peaks. The results were expressed in mg g⁻¹ of dry weight.

Statistical analysis

The data obtained were analyzed with an ANOVA, under a completely randomized design with a 4x2 factorial arrangement. The first factor was the species (*C. annum* var. *glabriusculum*, *Capsicum* sp., *C. chinense* and *C. frutescens*), and the second factor was the stage of maturity of the fruit (mature and immature), as well as their interaction. The difference between treatments was evaluated with Tukey's test ($p \leq 0.05$), using the statistical software InfoStat version 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017).

RESULTS AND DISCUSSION

Total carotenoids

Significant differences were found in the content of total carotenoids amongst species, stage of maturity and interaction, both in the whole fruit and in the pericarp (Table 1). The greatest carotenoid content was found in mature peppers of the species evaluated (Figure 1), and the pericarp of *C. chinense* stood out (52.23 mg g⁻¹), followed by the whole *C. frutescens* fruit (46.16 mg g⁻¹) and the *Capsicum* sp. pericarp (34.89 mg g⁻¹). The lowest content of carotenoids was displayed by the amashito pepper in all of the fruit components. But this pepper showed the lowest reduction in content of carotenoids between the stages of maturity evaluated (Figure 1). In seeds, the content of carotenoids was low and without statistical

Cuadro 1. Cuadrados medios del ANDEVA y nivel de significancia para el contenido de carotenoides y compuestos fenólicos de cuatro especies del género *Capsicum*.
Table 1. Average squares of the ANOVA and the level of significance for the content of carotenoids and phenolic compounds from four species of the genus *Capsicum*.

Variable	Especie (E)	Cuadrado medio			Error
		Estado de madurez (EM)	E*EM		
Capsaicina	Fruto completo	234.9***	16.5*	22.4**	2.8
	Pericarpio	95.5***	62.0***	57.6***	1.3
	Semilla	7.7*	0.04	2.39	1.4
	Placenta	2705.4***	448.3***	129.6**	7.2
Dihidrocapsaicina	Fruto completo	80.5***	2.7	4.4	1.4
	Pericarpio	54.6***	13.2**	17.2**	0.9
	Semilla	7.7*	2.5	0.3	1.6
	Placenta	519.9***	201.9***	35.3***	1.2
Carotenoides	Fruto completo	389.9***	1028.0***	277.4***	1.4
	Pericarpio	228.9***	2333.1***	470.0***	3.0
	Semilla	2.0	5.6*	2.4	0.7
	Placenta	519.9***	201.9***	35.3***	1.2
Compuestos fenólicos totales	Fruto completo	97.5***	4.0	9.0*	1.3
	Pericarpio	33.8***	8.1**	5.2**	0.4
	Semilla	12.1	5.8	9.2	5.8
	Placenta	519.9***	201.9***	35.3***	1.2
Flavonoides totales	Fruto completo	440.6***	0.6	61.2***	2.3
	Pericarpio	33.7*	42.1*	23.5*	3.8
	Semilla	177.6***	53.1***	43.9***	2.1

*** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

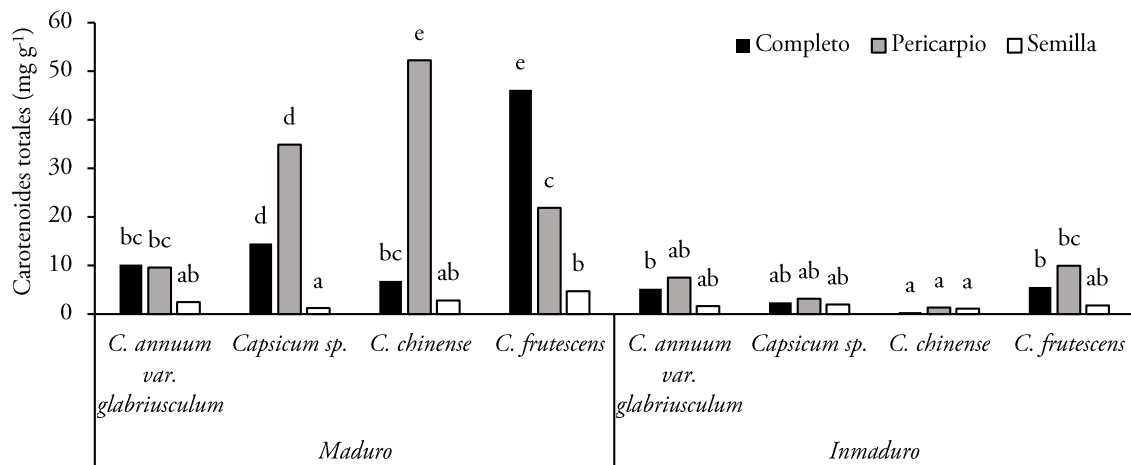


Figura 1. Contenido de carotenoides totales en los componentes del fruto por estado de madurez (mg g^{-1}) en cuatro especies de *Capsicum*.

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Content of total carotenoids in fruit components by stage of maturity (mg g^{-1}) in four species of *Capsicum*.

Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$).

(Figura 1). En semillas, el contenido de carotenoides fue bajo y sin diferencia estadística entre los estados maduro e inmaduro de los chiles estudiados. El rango de variación para carotenoides entre especies en estado maduro fue de 1.22 (*Capsicum* sp.) a 4.71 mg g⁻¹ (*C. chinense*), y en estado inmaduro de 1.09 (*C. chinense*) a 1.97 mg g⁻¹ (*Capsicum* sp.). En *C. chinense* Menichini *et al.* (2009) reportaron contenidos de carotenoides para semillas de frutos maduros e inmaduros de 3.62 y 0.62 mg g⁻¹ respectivamente, los cuales son similares a los encontrados en nuestro estudio para frutos inmaduros (0.38 mg g⁻¹) y maduros (6.83 mg g⁻¹) de la misma especie. Los carotenoides se encuentran en los amiloplastos en semillas de trigo y de maíz. En estas semillas están involucrados en la producción de ABA, aunque también contribuyen a disminuir la deterioración de las semillas por el envejecimiento al actuar sobre los radicales libres (Howitt y Pogson, 2006). El presente estudio es el primero en cuantificar el contenido de carotenoides por componentes en frutos de chiles silvestres de *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. frutescens* y *Capsicum* sp., en dos estados de madurez.

En el género *C. annuum* se han observado contenidos de carotenoides hasta de 13.2 mg g⁻¹ de peso seco, aunque contenidos altos de estos compuestos no siempre tienen un alto índice carotenogénico, dado por la relación R/Y (Hornero-Méndez *et al.*, 2000). Las variaciones en el contenido de estos compuestos entre diferentes recolectas o sitios se asociaron a la variación genotípica y condiciones precosecha y postcosecha (Butcher *et al.*, 2012).

Los contenidos de carotenoides encontrados para pericarpio fueron altos en *C. chinense* maduro (52.2 mg g⁻¹), *Capsicum* sp. (34.8 mg g⁻¹) y *C. frutescens* (21.8 mg g⁻¹), si se comparan con los resultados reportados por Daood *et al.* (2014) (11.5 mg g⁻¹ para *C. annuum* variedad Remény). El pericarpio de *C. annuum* var. *glabriusculum* presentó el menor contenido (9.5 mg g⁻¹). El contenido de carotenoides entre las especies y estado de maduración tuvo un rango amplio de variación (Figura 1), la cual se puede deber al color porque los frutos de los chiles tienen colores diferentes asociados con la madurez, lo que afecta el perfil de carotenoides. Kim *et al.* (2016) evaluaron 27 cultivares de *C. annuum* con diferentes colores de madurez (rojo, naranja y amarillo), formas y métodos de cultivo, encontraron variaciones de 0.11 a 1.90 mg g⁻¹, y los chiles de color naranja presentaron mayor

diferencias between the mature and immature stages of the peppers studied. The range of variation for carotenoids between species in the mature stage was of 1.22 (*Capsicum* sp.) to 4.71 mg g⁻¹ (*C. chinense*), and in the immature stage, 1.09 (*C. chinense*) to 1.97 mg g⁻¹ (*Capsicum* sp.). In *C. chinense* Menichini *et al.* (2009) reported carotenoids for seeds of mature and immature fruits of 3.62 and 0.62 mg g⁻¹, respectively, which are similar to those found in our study for immature (0.38 mg g⁻¹) and mature fruits (6.83 mg g⁻¹) of the same species. Carotenoids are found in the amyloplasts in wheat and maize seeds. In these seeds, they are involved in the production of ABA, although they also contribute to reduce deterioration of seeds due to aging by acting on the free radicals (Howitt and Pogson, 2006). The present study is the first to quantify the content of carotenoids by components in wild *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. frutescens* and *Capsicum* sp. fruits in two stages of maturity.

In the *C. annuum* genus, contents of carotenoids up to 13.2 mg g⁻¹ of dry weight were observed, although high contents of these compounds do not always have high carotenogenic levels, given by the ratio R/Y (Hornero-Méndez *et al.*, 2000). The variations in the content of these compounds between different recollections or sites were related to the genotypical variation and preharvest and postharvest conditions (Butcher *et al.*, 2012).

The contents of carotenoids found for pericarp were high in mature *C. chinense* (52.2 mg g⁻¹), *Capsicum* sp. (34.8 mg g⁻¹) and *C. frutescens* (21.8 mg g⁻¹), as compared to results reported by Daood *et al.* (2014) (11.5 mg g⁻¹ for *C. annuum*, variety Remény). The pericarp of *C. annuum* var. *glabriusculum* presented the lowest content (9.5 mg g⁻¹). The content of carotenoids between the species and the stage of maturity had a wide variation range (Figure 1), which may be due to the color, since the chili pepper fruits have different colors related to maturity, affecting the carotenoid profile. Kim *et al.* (2016) evaluated 27 *C. annuum* cultivars with different maturity colors (red, orange and yellow), shapes and cultivation methods; they found variations from 0.11 to 1.90 mg g⁻¹, and the orange-colored chili peppers showed the highest content of carotenoids. This coincides with findings from the present study because the *C. chinense* pericarp (orange-colored fruit in the stage of maturity) had the highest content of carotenoids.

contenido de carotenoides. Lo anterior concuerda con lo encontrado en el presente estudio porque el pericarpio de *C. chinense* (color de fruto naranja en estado maduro) mostró el mayor contenido de carotenoides.

Polifenoles totales

Para el contenido de polifenoles totales se observaron diferencias significativas entre especies para fruto completo y pericarpio, entre estado de madurez para pericarpio y semilla. La interacción especie*estado de madurez fue significativa para el contenido de polifenoles en fruto completo y pericarpio (Cuadro 1). Menichini *et al.* (2009) y Lutz *et al.* (2015) observaron que el estado de madurez de los frutos no tuvo efecto en el contenido de polifenoles totales de *C. chinense* Jacq. cv. *habanero*, y *C. annuum* cv. *almuden*.

El mayor contenido de polifenoles se encontró en el pericarpio de *C. chinense*, *Capsicum* sp. y *C. annuum* var. *glabriusculum* (Figura 2), y el pericarpio de *C. chinense* tuvo el contenido más alto (19.17 mg g⁻¹). En frutos completos, la variación entre especies fue de 7.44 (*C. annuum* sp.) a 15.57 mg g⁻¹ (*C. chinense*). Las semillas de todas las especies presentaron contenidos bajos de polifenoles totales, con un rango de 5.39 (*C. chinense*) a 8.79 mg g⁻¹ (*C. frutescens*).

Respecto al contenido de polifenoles totales entre especies y variedades de *Capsicum*, Alvarez-Parrilla *et al.* (2011) observaron una variación de 5.68 a

Total polyphenols

For the content of total polyphenols, significant differences were observed between species for whole fruit and pericarp, between the stage of maturity for pericarp and seed. The species*stage of maturity interaction was significant for the content of polyphenols in whole fruit and pericarp (Table 1). Menichini *et al.* (2009) and Lutz *et al.* (2015) observed that the stage of maturity of the fruits had no effect on the content of total polyphenols of *C. chinense* Jacq. cv. *habanero* and *C. annuum* cv. *almuden*.

The highest content of polyphenols was found in the pericarp of *C. chinense*, *Capsicum* sp. and *C. annuum* var. *glabriusculum* (Figure 2), and the pericarp of *C. chinense* had the highest content (19.17 mg g⁻¹). In whole fruits, the variation between species was 7.44 (*C. annuum* sp.) to 15.57 mg g⁻¹ (*C. chinense*). The seeds of all the species presented low contents of total polyphenols, with a range of 5.39 (*C. chinense*) to 8.79 mg g⁻¹ (*C. frutescens*).

Regarding the content of total polyphenols between species and varieties of *Capsicum*, Alvarez-Parrilla *et al.* (2011) observed a variation of 5.68 to 10.32 mg g⁻¹ in dried and processed *C. annuum* fruits (jalapeño and serrano), Vera-Guzmán *et al.* (2011) reported between 0.69 and 3.50 mg g⁻¹ in mature fruits and 1.13 to 4.02 mg g⁻¹ in immature fruits of nine varieties of *C. annuum* and *C. pubescens*, and

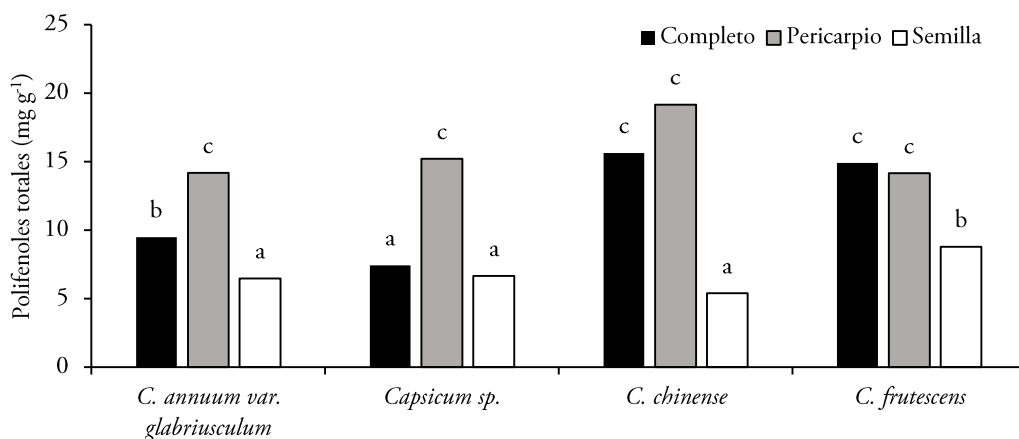


Figura 2. Contenido de polifenoles totales (mg g⁻¹) en frutos de especies de *Capsicum*.

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Content of total polyphenols (mg g⁻¹) in fruits of species of *Capsicum*.

Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$).

10.32 mg g⁻¹ en frutos frescos y procesados de *C. annuum* (chiles jalapeño y serrano), Vera-Guzmán *et al.* (2011) reportaron de 0.69 a 3.50 mg g⁻¹ en frutos maduros y 1.13 a 4.02 mg g⁻¹ en inmaduros de nueve variedades de *C. annuum* y *C. pubescens*, y Loizzo *et al.* (2015) encontraron 2.3 mg g⁻¹ en frutos de *C. chinense* y 71.4 mg g⁻¹ en *C. annuum*.

En chiles silvestres, Rodríguez-Maturino *et al.* (2012) observaron un contenido de 4.85 mg g⁻¹ de polifenoles en frutos frescos de *C. annuum* var. *glabriusculum*, valor inferior al de 9.49 mg g⁻¹ en nuestro estudio realizado en frutos secos. En frutos frescos de *C. chinense* esos autores también mostraron un valor bajo (5.92 mg g⁻¹) en comparación a lo observado en frutos secos en la presente investigación con *C. chinense*. Campos-Hernández *et al.* (2018) reportaron que el proceso y manejo postcosecha modifican el contenido de polifenoles en frutos de *Capsicum*, además del efecto de especie, variedad, y características del suelo y clima.

Flavonoides totales

El análisis de varianza para el contenido de flavonoides muestra diferencias significativas para la especie y estado de madurez, así como su interacción (Cuadro 1). El mayor contenido de flavonoides se encontró en el fruto completo y en los pericarpios de los chiles evaluados (Cuadro 2).

Los frutos maduros de *C. chinense* no presentaron diferencias significativas en el contenido de flavonoides

Loizzo *et al.* (2015) found 2.3 mg g⁻¹ in *C. chinense* fruits and 71.4 mg g⁻¹ in *C. annuum*.

In wild chili peppers, Rodríguez-Maturino *et al.* (2012) observed a content of 4.85 mg g⁻¹ of polyphenols in fresh *C. annuum*, var. *glabriusculum* fruits, a lower value than the 9.49 mg g⁻¹ found in our study performed on dried fruits. In fresh *C. chinense* fruits, these authors also showed a low value (5.92 mg g⁻¹) as compared to observations of dried fruits in our investigation with *C. chinense*. Campos-Hernández *et al.* (2018) reported that the postharvest process and management modify the content of polyphenols in *Capsicum* fruits, along with the effect of the species, variety, and soil and climate characteristics.

Total flavonoids

The analysis of variance for the content of flavonoids displays significant differences for the species and stage of maturity, as well as their interaction (Table 1). The highest content of flavonoids was found in the whole fruit and in the pericarps of the evaluated chili peppers (Table 2).

The mature *C. chinense* fruits did not present significant differences in content of flavonoids with immature fruits of the same species. The whole immature *C. frutescens* fruits displayed a higher content of flavonoids, as compare with the mature fruits (26.98 vs 19.36 mg g⁻¹). In *C. annuum* var. *glabriusculum*, the effect was the opposite: the immature fruits (13.93 mg g⁻¹) showed lower

Cuadro 2. Concentración de flavonoides totales (mg g⁻¹) en los componentes del fruto por nivel de madurez de cuatro especies de *Capsicum*.

Table 2. Concentration of total flavonoids (mg g⁻¹) in fruit components by stage of maturity (mg g⁻¹) in four species of *Capsicum*.

Estado de madurez	Componente fruto	Flavonoides totales (mg g ⁻¹)			
		<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	<i>C. frutescens</i>	<i>C. chinense</i>	<i>Capsicum</i> sp.
Inmaduro	Semilla	11.06 fghi	20.37 bcd	16.29 def	8.50 hi
	Pericarpio	24.78 ab	28.17 a	24.57 abc	26.36 a
	Completo	13.93 efg	26.98 a	29.11 a	6.15 ij
Maduro	Semilla	12.92 efgh	11.92 fgh	17.77 de	1.70 j
	Pericarpio	17.52 de	24.60 abc	26.89 a	24.27 abc
	Completo	20.56 bcd	19.36 cd	27.23 a	10.32 ghi

Valores promedio con letras diferentes son estadísticamente diferentes entre columnas e hileras (Tukey, p ≤ 0.05)

♦ Average values with different letters are statistically different between columns and rows (Tukey, p ≤ 0.05).

con los inmaduros de la misma especie. Los frutos completos inmaduros de *C. frutescens* mostraron un contenido mayor de flavonoides, comparado con los maduros (26.98 vs 19.36 mg g⁻¹). En *C. annuum* var. *glabriusculum* el efecto fue contrario: los frutos inmaduros (13.93 mg g⁻¹) presentaron contenidos menores que los maduros (20.56 mg g⁻¹). Las semillas de frutos maduros de *Capsicum* sp. tuvieron el menor contenido de flavonoides (1.70 mg g⁻¹), y las semillas de frutos inmaduros de *C. frutescens* el contenido más alto (20.37 mg g⁻¹). Los principales flavonoides encontrados en frutos de *Capsicum* son luteolina, quercetina, kaempferol y apigenina (Wahyuni *et al.*, 2013), cuya concentración puede variar entre cultivares y estado de maduración del fruto.

Respecto a los rangos de variación entre estados de madurez para el contenido de flavonoides totales, en *C. chinense* fue de 16.29 a 29.11 mg g⁻¹, en *C. frutescens* de 11.92 a 28.17 mg g⁻¹, en *C. annuum* var. *glabriusculum* de 11.06 a 24.78 mg g⁻¹, y en *Capsicum* sp. de 1.7 a 26.36 mg g⁻¹ (Cuadro 2). Estos rangos son superiores a los observados por Loizzo *et al.* (2015) en 20 cultivares de chiles, incluso un cultivar de *C. chinense* (0.9 a 11.1 mg g⁻¹) y a los reportados por Vera-Guzmán *et al.* (2011) en nueve morfotipos de chiles de Oaxaca. Variaciones en el contenido de flavonoides se observaron con frecuencia entre género y especies porque estos metabolitos secundarios se producen en las plantas en respuesta a factores de estrés biótico como enfermedades, ataque de insectos, o abiótico como estación del año, posición geográfica, método de procesado (Peterson *et al.*, 2015). Los altos contenidos de flavonoides presentes en las especies de *Capsicum* en estudio muestran la importancia que tendría el conocer el perfil de estos compuestos debido a sus efectos benéficos en la salud (Hoensch and Oertel, 2015).

Capsaicinoides

Los contenidos de capsaicina (CAP) y el de dihidrocapsaicina (DHC) mostraron diferencias significativas entre especie, estado de madurez y su interacción (Cuadro 1). En las especies evaluadas, CAP y DHC tuvieron mayor concentración en la placenta en los dos estados de madurez. El análisis de los frutos completos mostró que *C. chinense* tiene la mayor cantidad de CAP y DHC, respecto a las otras especies en estado maduro e inmaduro. Los chiles silvestres

contienen más que los maduros (20.56 mg g⁻¹). Las semillas de frutos maduros de *Capsicum* sp. tuvieron el menor contenido de flavonoides (1.70 mg g⁻¹), y las semillas de frutos inmaduros de *C. frutescens* el contenido más alto (20.37 mg g⁻¹). Los principales flavonoides encontrados en frutos de *Capsicum* son luteolina, quercetina, kaempferol y apigenina (Wahyuni *et al.*, 2013), cuya concentración puede variar entre cultivares y estado de maduración del fruto.

Respecto a los rangos de variación entre estados de madurez para el contenido de flavonoides totales, en *C. chinense* fue de 16.29 a 29.11 mg g⁻¹, en *C. frutescens* de 11.92 a 28.17 mg g⁻¹, en *C. annuum* var. *glabriusculum* de 11.06 a 24.78 mg g⁻¹, y en *Capsicum* sp. de 1.7 a 26.36 mg g⁻¹ (Table 2). These ranges are higher than those observed by Loizzo *et al.* (2015) in 20 chili pepper cultivars, including a cultivar of *C. chinense* (0.9 to 11.1 mg g⁻¹) and those reported by Vera-Guzmán *et al.* (2011) in nine Oaxacan chili pepper morphotypes. Variations in the content of flavonoids were frequently observed between genera and species, since these secondary metabolites are produced in the plant as a response to biotic stress factors such as diseases and insect attacks, or abiotic stress factors such as the seasons of the year, geographic location and processing method (Peterson *et al.*, 2015). The high flavonoid contents present in the *Capsicum* species studied show the importance of knowing the profile of these compounds, due to their beneficial effects on health (Hoensch and Oertel, 2015).

Capsaicinoids

Capsaicin (CAP) and dihydrocapsaicin (DHC) contents showed significant differences between species, stage of maturity and their interaction (Table 1). In the species evaluated, CAP and DHC had a higher concentration in the placenta in both stages of maturity. The analysis of the whole fruits showed that *C. chinense* contains the highest amounts of CAP and DHC, as compared to the other species in mature and immature stages. The wild chili peppers presented a lower content of CAP and DHC in both maturity stages than *C. chinense*, and only *C. frutescens* had an increase in the content of capsaicinoids in the immature stage (Tables 3 and 4).

The CAP content in the placenta of the mature *C. chinense* fruit was 84.96 mg g⁻¹, and in the immature

presentaron menor contenido de CAP y DHC en ambos estados de madurez que *C. chinense*, y solo *C. frutescens* tuvo un aumento en el contenido de capsaicinoides en estado inmaduro (Cuadros 3 y 4).

El contenido de CAP en la placenta del fruto de *C. chinense* en estado maduro fue 84.96 mg g⁻¹ y en el inmaduro 72.98 mg g⁻¹. Las semillas de los frutos de las cuatro especies de *Capsicum* en estado inmaduro y maduro presentaron un contenido menor. El mismo comportamiento se observó para DHC (Cuadro 4). La placenta del fruto de *C. chinense* maduro (43.45 mg g⁻¹) e inmaduro (29.70 mg g⁻¹) tuvo el mayor contenido

fruit, it was 72.98 mg g⁻¹. The seeds from mature and immature fruits of the four *Capsicum* species showed a lower content. The same behavior was observed for DHC (Table 4). The placenta of the mature *C. chinense* fruit (43.45 mg g⁻¹) and the immature fruit (29.70 mg g⁻¹) had the same DHC content, and the whole mature *Capsicum* sp. fruit showed the lowest content (0.79 mg g⁻¹).

CAP and DHC are the main capsaicinoids in chili peppers, and account for over 90% of their spiciness; the only difference between them is a double bond between carbons 6 and 7 in CAP, which is absent

Cuadro 3. Concentración de capsaicina (mg g⁻¹) en componentes del fruto de cuatro especies de *Capsicum* a dos estados de madurez.

Table 3. Concentration of capsaicin (mg g⁻¹) in fruit components by stage of maturity (mg g⁻¹) in four species of *Capsicum*.

Especie	Estado de madurez	Fruto completo	Pericarpio	Placenta	Semilla
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	Inmaduro	6.04 a	4.74 a	25.91 ab	2.89 a
	Maduro	6.86 a	5.88 ab	32.07 b	3.13 a
<i>Capsicum</i> sp.	Inmaduro	4.28 a	4.25 a	20.46 a	4.92 a
	Maduro	3.23 a	6.25 ab	19.10 a	2.63 a
<i>C. chinense</i>	Inmaduro	20.43 b	22.80 c	72.98 d	3.87 a
	Maduro	21.51 b	8.30 b	84.96 e	5.22 a
<i>C. frutescens</i>	Inmaduro	17.39 b	9.77 b	29.03 ab	6.11 a
	Maduro	8.40 a	5.38 ab	54.60 c	6.40 a

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (p≤0.05) ♦ Means with different letters are statistically different (p≤0.05).

Cuadro 4. Concentración de dihidrocapsaicina (mg g⁻¹) en componentes del fruto de cuatro especies de *Capsicum* a dos estados de madurez.

Table 4. Concentration of dihydrocapsaicin (mg g⁻¹) in fruit components in four species of *Capsicum* in two stages of maturity.

Especie	Estado de madurez	Fruto completo	Pericarpio	Placenta	Semilla
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	Inmaduro	3.73 a	2.75 ab	13.44 abc	1.23 a
	Maduro	3.80 a	3.39 abc	15.96 bc	1.44 a
<i>Capsicum</i> sp.	Inmaduro	1.56 a	1.22 a	9.96 a	1.09 a
	Maduro	0.79 a	3.20 abc	11.63 ab	2.19 a
<i>C. chinense</i>	Inmaduro	11.03 c	14.11 d	29.70 d	2.88 a
	Maduro	12.18 c	6.76 c	43.45 e	4.36 a
<i>C. frutescens</i>	Inmaduro	8.75 bc	6.26 bc	17.70 c	3.89 a
	Maduro	5.00 ab	3.70 abc	28.18 d	4.30 a

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (p≤0.05) ♦ Means with different letters are statistically different (p≤0.05).

en DHC, y el fruto completo de *Capsicum* sp. maduro mostró el menor contenido (0.79 mg g^{-1}).

La CAP y la DHC son los principales capsaicinoides en los frutos de chiles responsables de más de 90% del picor; se diferencian solo por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 6 y 7 en la CAP, que está ausente en la DHC (Ben-Chaim *et al.*, 2006). La proporción entre capsaicinoides no es similar en todas las especies, depende del genotipo, grado de madurez, e incluso de la época de recolección (Ben-Chaim *et al.*, 2006; Menichini *et al.*, 2009; Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011). Los capsaicinoides se sintetizan en las células epiteliales de la placenta y se acumulan en bolsas o ampollas a lo largo de estas células (Stewart *et al.*, 2005; Vázquez-Flota *et al.*, 2007), por ello en nuestro estudio el contenido mayor de CAP y DHC se encontró en las placentas de las cuatro especies de chiles.

En frutos completos, *C. chinense* contiene más capsaicinoides en estado maduro (21.51 y 12.18 mg g^{-1} , CAP y DHC, respectivamente) e inmaduro (20.43 y 11.03 mg g^{-1} , CAP y DHC), seguido de *C. frutescens* y *C. annuum* var. *glabriusculum*; y *Capsicum* sp. maduro presentó el menor contenido de CAP (3.23 mg g^{-1}) y DHC (0.79 mg g^{-1}). El rango de 3.23 a 21.51 mg g^{-1} de CAP está dentro de los contenidos reportados para frutos de chiles. Así, Popelka *et al.* (2017) encontraron una variación en CAP de 1.24 a 27.14 mg g^{-1} en siete cultivares de *C. chinense*.

Para los chiles silvestres *C. annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum* sp. hay pocos estudios del contenido de capsaicinoides. Montoya-Ballesteros *et al.* (2010) reportaron que en *C. annuum* var. *aviculare* sinónimo de *C. annuum* var. *glabriusculum* existe un contenido mayor de CAP y DHC en frutos maduros (8.22 y 1.28 mg g^{-1} , respectivamente) que en los inmaduros (4.24 y 0.52 mg g^{-1} , respectivamente). Pero Gonzalez-Zamora *et al.* (2015) observaron un contenido más alto y significativo de CAP en frutos inmaduros de la misma especie *C. annuum* var. *glabriusculum* proveniente de Sonora (CAP de 17.7 a 23.7 mg g^{-1} peso seco para frutos maduros e inmaduros, respectivamente). En los chiles evaluados solo se observaron diferencias significativas por estado de madurez en los contenidos de capsaicinoides en

in DHC (Ben-Chaim *et al.*, 2006). The proportion between capsaicinoids is not similar in all species; it depends on the genotype, degree of maturity, and even the harvesting season (Ben-Chaim *et al.*, 2006; Menichini *et al.*, 2009; Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011). Capsaicinoids are synthesized in the epithelial cells of the placenta and are accumulated in sacks or blisters along these cells (Stewart *et al.*, 2005; Vázquez-Flota *et al.*, 2007), which is why, in our study, the highest content of CAP and DHC was found in the placentas of the four chili pepper species.

In whole fruits, *C. chinense* contains more capsaicinoids in the mature (21.51 and 12.18 mg g^{-1} , CAP and DHC, respectively) and immature stages (20.43 and 11.03 mg g^{-1} , CAP and DHC), followed by *C. frutescens* and *C. annuum* var. *glabriusculum*; and mature *Capsicum* sp. showed the highest contents of CAP (3.23 mg g^{-1}) and DHC (0.79 mg g^{-1}). The range of 3.23 to 21.51 mg g^{-1} of CAP is within the contents reported for pepper fruits. Thus, Popelka *et al.* (2017) found a variation in CAP of 1.24 to 27.14 mg g^{-1} in seven *C. chinense* cultivars.

For wild *C. annuum* var. *glabriusculum* and *Capsicum* sp. peppers, there are few studies on the contents of capsaicinoids. Montoya-Ballesteros *et al.* (2010) reported that in *C. annuum* var. *aviculare*, synonymous with *C. annuum* var. *glabriusculum*, there are greater contents of CAP and DHC in mature fruits (8.22 and 1.28 mg g^{-1} , respectively) than in immature fruits (4.24 and 0.52 mg g^{-1} , respectively). Although Gonzalez-Zamora *et al.* (2015) observed a higher and significant CAP content in immature fruits of the same species of *C. annuum* var. *glabriusculum* from Sonora (CAP from 17.7 to 23.7 mg g^{-1} dry weight for mature and immature fruits, respectively). In the fruits evaluated, significant differences were only observed by the stage of maturity in the content of capsaicinoids in *C. frutescens* fruits, which showed 17.39 of CAP at an immature stage vs. 8.4 mg g^{-1} in a mature stage. By contrast, in the other wild peppers there were no significant differences between stages of fruit maturity. The contents of CAP and DHC in whole *C. annuum* var. *glabriusculum* fruits were 6.04 and 3.73 mg g^{-1} (immature), and 6.86 and 3.80 mg g^{-1} (mature); for *Capsicum* sp., 4.28 and 1.56 mg g^{-1} (immature), and 3.23 and 0.79 mg g^{-1} (mature).

frutos de *C. frutescens*, el cual mostró 17.39 de CAP en estado inmaduro vs. 8.4 mg g⁻¹ en estado maduro. En contraste, en los otros chiles silvestres no hubo diferencias significativas entre estados de madurez de frutos. Los contenidos de CAP y DHC en frutos completos de *C. annuum* var. *glabriusculum* fueron 6.04 y 3.73 mg g⁻¹ (inmaduro), y 6.86 y 3.80 mg g⁻¹ (maduro); para *Capsicum* sp. de 4.28 y 1.56 mg g⁻¹ (inmaduro), y 3.23 y 0.79 mg g⁻¹ (maduro).

CONCLUSIONES

Este estudio comprobó que las especies *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. frutescens*, *C. chinense* y *Capsicum* sp. en el estado de Tabasco, son fuente de metabolitos secundarios, como carotenoides, polifenoles totales, flavonoides y capsaicinoides totales; y sus concentraciones varían según la especie, los componentes y estado de madurez de los frutos. El contenido mayor de carotenoides totales se encontró en los pericarpios de los frutos maduros de todas las especies, y el de polifenoles totales en los pericarpios y frutos completos de *C. chinense* y *C. frutescens*. Los flavonoides son abundantes en frutos completos y pericarpio, independiente del estado de madurez. Entre los chiles silvestres, *C. annuum* var. *glabriusculum* presentó un contenido igual de polifenoles totales en estado maduro e inmaduro, pero el de flavonoides es menor en estado inmaduro. La capsaicina y la dihidrocapsaicina están en mayor concentración en la placenta de los frutos maduros e inmaduros de las especies, aunque *C. chinense* tuvo el contenido mayor de los dos capsaicinoides, seguido de *C. frutescens*, *C. annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum* sp. Esta variación en metabolitos secundarios de los chiles silvestres de Tabasco se podría usar en la alimentación por las propiedades bioactiva o en la agricultura por las propiedades antifúngicas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca al primer autor para la realización de sus estudios de posgrado.

LITERATURA CITADA

Aguilar-Rincón, V. H., T. Corona Torres, P. López López, L. Latournerie Moreno, M. Ramírez Meraz, H. Villalón Mendoza, y J. A. Aguilar Castillo. 2010. Los chiles de México y

CONCLUSIONS

This study showed that the species *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. frutescens*, *C. chinense* and *Capsicum* sp. in the state of Tabasco are a source of secondary metabolites such as carotenoids, total polyphenols, flavonoids and total capsaicinoids, and their concentrations vary depending on the species, the components and the stage of maturity of the fruits. The highest carotenoid contents were found in the pericarps of the mature fruits in all species, and the highest content of total polyphenols was in pericarps and whole fruits of *C. chinense* and *C. frutescens*. Flavonoids are abundant in whole fruits and pericarps, regardless of the stage of maturity. Regarding wild peppers, *C. annuum* var. *glabriusculum* presented equal amounts of total polyphenols in the mature and immature stages, but the content of flavonoids is lower in an immature stage. Capsaicin and dihydrocapsaicin are found in larger concentrations in the placentas of mature and immature fruits of the species, although *C. chinense* displayed the highest content of both capsaicinoids, followed by *C. frutescens*, *C. annuum* var. *glabriusculum* and *Capsicum* sp. This variation in secondary metabolites in wild peppers in Tabasco could be used in food, due to bioactive properties, or in agriculture, due to antifungal properties.

—End of the English version—

-----*-----

su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.

- Alvarez-Parrilla, E., L. A. De La Rosa, R. Amarowicz, and F. Shahidi. 2011. Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *J. Agric. Food Chem.* 59: 163–173.
- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B. C. Kang, I. Paran, and M. Jahn. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1481–1490.
- Butcher, J. D., K. M. Crosby, K. S. Yoo, B. S. Patil, A. M. H. Ibrahim, D. I. Leskovar, and J. L. Jifon. 2012. Environmental and genotypic variation of capsaicinoid and flavonoid concentrations in habanero (*Capsicum chinense*) peppers. *HortScience* 47: 574-579.
- Campos-Hernández, N., M. E. Jaramillo-Flores, D. I. Téllez-Medina, and L. Alamilla-Beltrán. 2018. Effect of traditional

- dehydration processing of pepper jalapeno rayado (*Capsicum annuum*) on secondary metabolites with antioxidant activity. *CyTA–J. Food* 16: 316–324.
- Castañón-Nájera, G., L. Latournerie-Moreno, M. Mendoza-Elos, A. Vargas-López, y H. Cárdenas-Morales. 2008. Colección y caracterización de chile (*Capsicum* spp) en Tabasco. *Int. J. Exp. Bot.* 77: 189–202.
- Collins, M. D., L. M. Wasmund, and P. W. Bosland. 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience* 30: 137–139.
- Daood, H. G., G. Palotás, G. Palotás, G. Somogyi, Z. Pék, and L. Helyes. 2014. Carotenoid and antioxidant content of ground paprika from indoor-cultivated traditional varieties and new hybrids of spice red peppers. *Food Res Int.* 65: 231–237.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y C. W. Robledo. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Gonzalez-Zamora, A., E. Sierra-Campos, R. Pérez-Morales, C. Vázquez-Vázquez, M. A. Gallegos-Robles, J. D. López-Martínez, and J. L. García-Hernández. 2015. Measurement of capsaicinoids in chiltepin hot pepper: A comparison study between spectrophotometric method and high-performance liquid chromatography analysis. *J. Chem.* Article ID 709150, 10 p.
- Gross, J. 1991. Carotenoids. *In: Pigments in Vegetables*. Springer, Boston, MA. pp: 75–278.
- Hayano-Kanashiro, C., N. Gámez-Meza, and L. Ángel Medina-Juárez. 2016. Wild pepper *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*: taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop Sci.* 56: 1–11.
- Hernández-Verdugo, S., F. Porras, A. Pacheco-Olvera, R. G. López-España, M. Villarreal-Romero, S. Parra-Terraza, y T. Osuna E. 2012. Caracterización y variación ecogeográfica de poblaciones de chile (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) silvestre del Noroeste de México. *Polibotánica* 33: 175–191.
- Hoensch, H. P., and R. Oertel. 2015. The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clin. Nutr. Experim.* 3: 8–14.
- Hornero-Méndez, D., R. Gómez-Ladrón de Guevara, and M. I. Mínguez-Mosquera. 2000. Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3857–3864.
- Howitt, C. A., and B. J. Pogson. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* 29: 435–445.
- Kim, J. S., C. G. An, J. S. Park, Y. P. Lim, and S. Kim. 2016. Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food Chem.* 201: 64–71.
- Loizzo, M. R., A. Pugliese, M. Bonesi, F. Menichini, and R. Tundis. 2015. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. *LWT. Food Sci. Technol.* 64: 623–631.
- Lutz, M., J. Hernández, and C. Henríquez. 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. *CYTA – J. Food* 13: 541–547.
- Menichini, F., R. Tundis, M. Bonesi, M. R. Loizzo, F. Conforti, G. Statti, B. De Cindio, P. J. Houghton, and F. Menichini. 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chem.* 114: 553–560.
- Montoya-Ballesteros, L. C., A. Gardea-Béjar, G. M. Ayala-Chávez, Y. Y. Martínez-Núñez, y L. E. Robles-Ozuna. 2010. Capsaicinoides y color en chiltepin (*Capsicum annuum* var. *aviculare*), efecto del proceso sobre salsas y encurtidos. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 9: 197–207.
- Moreno-Limón, S., S. M. Salcedo-Martínez, M. L. Cárdenas-Ávila, J. L. Hernández-Piñero, y M. A. Núñez-González. 2012. Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*. *Polibotánica* 34: 171–184.
- Narez-Jiménez, C. A., E. De la Cruz-Lázaro, A. Gómez-Vázquez, C. Márquez-Quiroz, y P. García-Alamilla. 2014. Colecta y caracterización morfológica *in situ* de chiles (*Capsicum* spp.) cultivados en Tabasco, México. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 20: 269–281.
- Nwokem, C. O., E. B. Agbaji, J. A. Kagbu, and E. J. Ekanem. 2010. Determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. *N Y Sci. J.* 33: 17–21.
- Peterson, J. J., J. T. Dwyer, P. F. Jacques, and M. L. McCullough. 2015. Improving the estimation of flavonoid intake for study of health outcomes. *Nutr. Rev.* 73: 553–576.
- Pickersgill, B. 2007. Domestication of plants in the Americas: Insights from mendelian and molecular genetics. *Ann. Bot.* 100: 925–940.
- Popelka, P., P. Jevinová, K. Šmejkal, and P. Roba. 2017. Antibacterial activity of *Capsicum* extract against selected strains of bacteria and micromycetes. *J. Food Sci.* 11: 223–229.
- Prado-Urbina, G., L. C. Lagunes-Espinoza, E. García-López, C. del C. Bautista-Muñoz, W. Camacho-Chiu, F. Mirafuentes, y V. Heber Aguilar-Rincón. 2015. Germinación de semillas de chiles silvestres en respuesta a tratamientos pre-germinativos. *Ecosist. Recur. Agropec.* 2: 139–149.
- Rodríguez-Maturino, A., A. Valenzuela-Solorio, R. Troncoso-Rojas, D. González-Mendoza, O. Grimaldo-Juarez, M. Aviles-Marin, and L. Cervantes-Diaz. 2012. Antioxidant activity and bioactive compounds of Chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) and Habanero (*Capsicum chinense*): A comparative study. *J. Med. Plants Res.* 6: 1758–1763.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 299: 152–178.
- Stewart C. J., K. Byoung-Cheorl, L. Kede, M. Michael, L. M. Shanna, Y. Y. Eun, K. Byung-Dong, P. Ilan, and M. J. Molly. 2005. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant J.* 42: 675–688.
- Talcott, S. T., and L. R. Howard. 1999. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2109–2115.

- Vázquez-Flota, F., M. de L. Miranda-Ham, M. Monforte-González, G. Gutiérrez-Carbajal, C. Velázquez-García, y Y. Nieto-Pelayo. 2007. La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 353-360.
- Vera-Guzmán, A. M., J. L. Chávez-Servia, J. C. Carrillo-Rodríguez, y M. G. López. 2011. Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) from Oaxaca, Mexico. *Chil. J. Agric. Res.* 71: 578-585.
- Wahyuni, Y., A.-R. Ballester, E. Sudarmonowati, R. J. Bino, and A. G. Bovy. 2013. Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *J. Nat. Prod.* 76: 783-793.

ETIOLOGÍA DEL ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO DE NOPAL TUNERO (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) EN MÉXICO

ETIOLOGY OF CLADODE THICKENING OF PRICKLY PEAR CACTUS (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) IN MEXICO

Fernando Martínez-Salgado¹, Jesús Pérez-Moreno², Daniel L. Ochoa-Martínez¹,
Reyna I. Rojas-Martínez^{1*}, Gregorio Arellano-Ostoa³

¹Fitosanidad-Fitopatología, ²Edafología, ³Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura.
Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo 56230 México. (rojas@colpos.
mx)

RESUMEN

México ocupa el primer lugar en producción de tuna en el mundo y una de las principales zonas productoras del país está en el oriente del estado de México. El engrosamiento del cladodio es una de las enfermedades más importantes en esta región y afecta la producción de tuna. En México, las investigaciones para determinar la causa de la enfermedad han demostrado la presencia de un fitoplasma asociado a ella; sin embargo, la etiología definitiva se desconoce. El objetivo de esta investigación fue transmitir por injerto el fitoplasma asociado al engrosamiento del cladodio en 20 plantas sanas de nopal obtenidas por cultivo *in vitro*, y la hipótesis fue que éstas mostrarán síntomas de engrosamiento debido al fitoplasma. Todas las plantas injertadas mostraron amarillamiento, reducción de crecimiento y deformación de cladodios jóvenes. La presencia del fitoplasma en las plantas injertadas se corroboró mediante PCR anidada con iniciadores universales que amplifican un fragmento de aproximadamente 1200 bp. La etiología de engrosamiento de cladodios de nopal tunero se debe a *Candidatus* fitoplasma.

Palabras clave: fitoplasma, PCR anidada, planta macho del nopal (*Opuntia ficus indica*).

INTRODUCCIÓN

El nopal (*Opuntia ficus-indica*) es una planta nativa de las regiones templadas semiáridas de México. Su distribución es amplia desde Canadá hasta Argentina y se ha extendido a países africanos, europeos y asiáticos. La especie se cultiva

ABSTRACT

Mexico ranks first in prickly pear production in the world and one of the main producing areas of the country is located at the eastern of the state of Mexico. Cladode thickening is one of the most important diseases in this region and reduces prickly pear production. In Mexico, research to determine the cause of this disease has shown the presence of an associated phytoplasma; however, its ultimate etiology remains unknown. The objective of this research was to transmit by grafting, in 20 healthy *in vitro* cultured prickly pear cactus plants, phytoplasma associated to cladode thickening. The hypothesis was that these plants would show symptoms of thickening due to the associated phytoplasma. All grafted plants showed yellowing, reduced growth and deformation of young cladodes. The presence of the phytoplasma in the grafted plants was corroborated by nested PCR with universal primers that amplify a fragment of approximately 1200 bp. Evidence showed that the etiology of cladode thickening in prickly pear is due to *Candidatus* phytoplasma.

Key words: phytoplasma, nested PCR, male cactus plant (*Opuntia ficus indica*).

INTRODUCTION

Prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) is a plant native to the semi-arid temperate regions of Mexico. It is widely distributed from Canada to Argentina and it also has spread to African, European and Asian countries. The species is cultivated in 25 countries for its fruits (prickly pears), “nopalitos” or young (stems) and mature cladodes (Callejas *et al.*, 2009). Young cladodes are used as vegetables for salads and special dishes, and mature cladodes are used as fodder, mainly during the dry season (Pimienta,

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 521-530. 2020.

en 25 países por sus frutos (tunas), los “nopalitos” o cladodios jóvenes (tallos) y maduros (Callejas *et al.*, 2009). Los cladodios jóvenes se usan como verdura para elaborar ensaladas y guisos especiales, y los cladodios maduros se utilizan como forraje, principalmente en la época de estiaje (Pimienta, 1990). Los cladodios poseen compuestos bioactivos con actividades antioxidantes y con potencial de uso en la industria alimenticia y farmacéutica (Bayar *et al.*, 2016; Chaouch *et al.*, 2016) y sus polisacáridos constituyen un adsorbente de metales pesados en agua potable, a costo bajo, (Onditi *et al.*, 2016). Además, extractos de esta planta poseen actividad contra parásitos gastrointestinales en borregos (Féboli *et al.*, 2016).

México es el principal productor internacional de tuna (Flores *et al.*, 1995; SIAP, 2016) y tiene la diversidad genética mayor del género *Opuntia* (Flores y Gallegos, 1993). En 2015 se produjeron 408 000 h de tuna, de las cuales 44% correspondió al estado de México, en particular los municipios San Martín de las Pirámides, Otumba, Axapusco, Nopaltepec y Temascalapa. En Nopaltepec se usaron 2890 ha para producir tuna en ese año (Ramírez *et al.*, 2015).

Diversas enfermedades afectan a este cultivo, en su mayoría causadas por hongos como *Alternaria* sp. y *Macrophomina* sp., y por bacterias (Borrego y Burgos, 1986). La enfermedad “engrosamiento del cladodio” es quizá la más grave (Suaste *et al.*, 2012a; Pimienta, 1990) y es el principal factor limitante de la producción de tunas en México debido a su incidencia alta y diseminación. Las plantas afectadas presentan cladodios con deformación, proliferación de tunas, engrosamiento y detención del crecimiento (Suaste *et al.*, 2012a). Esta enfermedad la causa un fitoplasma (Pimienta, 1990; Bertaccini *et al.*, 2007) que ocasiona un aumento del volumen del parénquima esponjoso, obstrucción del floema, acumulación de mucílago y detención de la brotación con la reducción consiguiente del número de cladodios y flores. Las plantas afectadas producen frutos pequeños, cortos y con cáscara gruesa, carentes de valor comercial (Hernández-Pérez *et al.*, 2009).

En el 2009, en California se encontraron plantas de nopal con síntomas de engrosamiento en las cuales se detectó un virus del género *Umbravirus* (Felker *et al.*, 2009). En 2012 se observó la coinfección de un virus y un fitoplasma en cladodios con engrosamiento en Nopaltepec (Suaste *et al.*, 2012b), pero no se ha demostrado la etiología de la enfermedad en México.

1990). Cladodes have bioactive compounds with antioxidant activities and potential use in the food and pharmaceutical industries (Bayar *et al.*, 2016; Chaouch *et al.*, 2016) and their polysaccharides are a low-cost heavy metal adsorbent in tap water (Onditi *et al.*, 2016). In addition, extracts of prickly pear cactus have shown anti-gastrointestinal parasite activity in sheep (Féboli *et al.*, 2016).

Mexico is the main international producer of prickly pear (Flores *et al.*, 1995; SIAP, 2016) and it harbors the greatest genetic diversity of the genus *Opuntia* (Flores and Gallegos, 1993). In 2015, 408 000 h of prickly pear were produced in Mexico, of which 44% corresponded to the state of Mexico, particularly the municipalities of San Martín de las Pirámides, Otumba, Axapusco, Nopaltepec and Temascalapa. In Nopaltepec, 2890 ha were used to produce prickly pear that year (Ramírez *et al.*, 2015).

Several diseases affect this crop, mostly caused by fungi such as *Alternaria* sp. and *Macrophomina* sp., and by some bacteria (Borrego and Burgos, 1986). However, the disease “cladode thickening” is perhaps the most serious (Suaste *et al.*, 2012a; Pimienta, 1990) and it is the main limiting factor of prickly pear production in Mexico due to high incidence and dissemination. The affected plants present cladodes with deformations, proliferation of prickly pears, thickening and growth reduction (Suaste *et al.*, 2012a). This disease is caused by a phytoplasma (Pimienta, 1990; Bertaccini *et al.*, 2007) that causes an increase in the volume of the spongy parenchyma, phloem obstruction, mucilage accumulation, sprouting inhibition and the consequent reduction in the number of cladodes and flowers. Affected plants produce small, short and thick-shelled fruits, lacking commercial value (Hernández-Pérez *et al.*, 2009).

In 2009, prickly pear cactus with symptoms of thickening were found in California, in which a virus of the genus *Umbravirus* was detected (Felker *et al.*, 2009). In 2012, a virus and phytoplasma coinfection were observed in cladodes with thickening in Nopaltepec (Suaste *et al.*, 2012b), but the disease etiology has not been demonstrated in Mexico. The objective of this research was to determine if the phytoplasma associated with cladode thickening is the causal agent of this disease, and the hypothesis was that prickly pear cactus plants grafted with the phytoplasma would show thickening symptoms.

El objetivo de esta investigación fue determinar si el fitoplasma asociado al engrosamiento de cladodio es el agente causal de esta enfermedad, y la hipótesis fue que los nopales injertados con el fitoplasma mostrarán síntomas de engrosamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de plantas

En abril de 2013 se recolectaron cladodios de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento en el municipio de San Martín de las Pirámides, estado de México (Figura 1). Los cladodios se sembraron en macetas con suelo estéril y se mantuvieron en invernadero para su estudio.

MATERIALS AND METHODS

Plant collection

In April 2013, cladodes of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) with symptoms of thickening were collected in the municipality of San Martín de las Pirámides, Mexico (Figure 1). The cladodes were planted in pots with sterile soil and kept in greenhouses for study.

DNA extraction

The DNA was extracted from the upper, middle and basal parts of cladodes showing thickening and yellowing symptoms, as well as from the roots in 18 plants following the method



Figura 1. Plantas de nopal en campo con síntomas asociados a fitoplasma. A) Proliferación de brotes. B) Deformación y engrosamiento de cladodio. C) Amarillamiento y reducción de tamaño de frutos. D) Disminución de la producción de brotes nuevos.

Figure 1. Prickly pear cactus plants in the field with symptoms associated with phytoplasma. A) Sprout proliferation. B) Cladode deformation and thickening. C) Fruit size reduction and yellowing. D) New sprout inhibition.

Extracción del ADN

El ADN se extrajo de la parte superior, media y basal de cladodios que presentaban síntomas de engrosamiento y amarillamiento, así como de la raíz en 18 plantas y el método utilizado fue el descrito por Doyle y Doyle (1990). En todos los casos se maceraron 0.3 g de tejido en morteros con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino al cual se agregó de inmediato 1 g de PVP. Este macerado se colocó en tubos de 1.5 mL con 700 μ L de amortiguador CTAB 3% a 60 °C e incubados en baño María a la misma temperatura (Wheanton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) por 30 min con agitación por inmersión cada 10 min. Después se agregaron 600 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) a los tubos, se agitaron 10 min por inmersión y se centrifugaron a 10 000 *g* a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos de 1.5 mL a los cuales se añadieron 600 μ L de isopropanol frío y se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 min. Después se centrifugaron 5 min a 11 200 *g* y se desechó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 800 μ L de etanol 70% y se centrifugó 2 min a 10 000 *g*. La pastilla se secó a 24 °C y se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

Detección de fitoplasma por PCR

La PCR anidada se realizó con los iniciadores universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Schneider *et al.*, 1995) para fitoplasma, los cuales amplifican un fragmento de 1800 pb (primera amplificación) en un volumen final de 25 μ L que contenía: 1 X de amortiguador para PCR (10 X, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Invitrogen®), 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 10 pmol de cada iniciador (Sigma-Aldrich®), 1 U de ADN polimerasa (Invitrogen®) y 100 ng de ADN molde. La amplificación se realizó en un termociclador Techne® TC-300 con este programa: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min, 72 °C por 2 min con una extensión final de 72 °C por 5 min. La segunda amplificación (anidada) se realizó con los iniciadores R16F2n / R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican un fragmento de 1200 pb de la región 16S rADN de los fitoplasmas. Como ADN molde se utilizó el producto amplificado de la primera reacción de PCR diluido en agua libre de nucleasas estéril 1:20, y las mismas concentraciones y reactivos que en la primera amplificación directa. La amplificación se hizo en un termociclador Thermo scientific (Arktik™) con este programa: desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 3 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

described by Doyle and Doyle (1990). In all cases 0.3 g of tissue were macerated in mortars with liquid nitrogen until a fine powder was obtained to which 1 g of PVP was immediately added. This macerate was placed in 1.5 mL tubes with 700 μ L of CTAB 3% buffer at 60 °C and incubated in a water bath at the same temperature (Wheanton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) for 30 min with immersion agitation every 10 min. Then 600 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) were added to the tubes, agitated for 10 min by immersion and centrifuged at 10 000 *g* at 4 °C. The supernatant was transferred to 1.5 mL tubes to which 600 μ L of cold isopropanol was added and kept at room temperature for 30 min. Then the tubes were centrifuged for 5 min at 11 200 *g* and the supernatant was discarded. The obtained tablet was washed with 800 μ L of 70% ethanol and centrifuged for 2 min at 10 000 *g*. The tablet was dried at 24 °C and resuspended in 50 μ L of nuclease-free water.

Phytoplasma detection by PCR

Nested PCR was performed with the universal P1 (Deng and Hiruki, 1991) and P7 (Schneider *et al.*, 1995) primers for phytoplasmas that amplify a 1800 bp fragment (first amplification) in a final volume of 25 μ L containing: 1 X of PCR buffer (10 X, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Invitrogen®), 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen®), 10 pmol of each primer (Sigma-Aldrich®), 1 U of DNA polymerase (Invitrogen®) and 100 ng of template DNA. Amplification was performed in a Techne® TC-300 thermal cycler with the following program: denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 57 °C for 1 min, 72 °C for 2 min with a final extension of 72 °C for 5 min. The second (nested) amplification was performed with the R16F2n / R16R2 primers (Gundersen and Lee, 1996) which amplify a 1200 bp fragment of the 16S rDNA region of the phytoplasma. The amplified product of the first PCR reaction diluted in sterile nuclease-free water 1:20 and the same concentrations and reagents as in the first direct amplification were used as the template DNA. The amplification was done in a Thermo scientific (Arktik™) thermocycler with the following program: denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 2 min, 72 °C for 3 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

Sequencing and phylogenetic analysis

The positive plant PCR product was purified with the Zymo® Clean Gel DNA Recovery Kit for sequencing at the Laboratorio

Secuenciación y análisis filogenético

El producto de PCR de plantas positivas se purificó con el kit Zymo® Clean Gel ADN Recovery Kit para su secuenciación en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-SENASICA. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2016) de EEUU (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el uso de la herramienta BLAST. Con la secuencia obtenida se realizó un análisis filogenético con otras especies de fitoplasmas. El árbol óptimo se obtuvo con la suma de la longitud de rama = 0.81814157. Para el porcentaje de árboles replicados en los cuales se agruparon los taxones asociados se consideraron 500 repeticiones (bootstrap). El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon con el método de distancia p y están en las unidades del número de diferencias de base por sitio. El análisis involucró 21 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1o + 2o + 3o + no codificantes. Todas las posiciones que contenían huecos y datos faltantes se eliminaron, hubo un total de 1103 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con el programa MEGA7.

Propagación *in vitro* de *O. ficus-indica*

Para obtener plantas libres de patógenos se establecieron cultivos de cladodios a partir de cultivo de meristemos sanos una vez que se obtuvieron explantes de aproximadamente 10 cm de longitud. El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) se complementó con 0.1 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 1.0 mg L⁻¹ de benciladenina (BAP) y se gelificó con agar. Los explantes se incubaron en condiciones de temperatura y luminosidad controladas. Una vez alcanzada una longitud aproximada de 10 cm se realizó el injerto en medios asépticos.

Transmisión por injerto

Debido a que no se contaba con segmentos de cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento, amarillamiento, reducción del crecimiento y deformación, se injertaron sobre cladodios (de aproximadamente 20 cm de longitud) de 20 plantas sanas obtenidas por cultivo *in vitro*. Para ello, en la parte media del cladodio sano se realizaron cortes triangulares del borde y se retiraron. Después se cortaron secciones triangulares de cladodios

de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-SENASICA. The sequences obtained were analyzed and compared with the database of the US National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2016) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and the use of the BLAST tool. A phylogenetic analysis with other phytoplasma species was performed with the obtained sequence. The optimal tree was obtained with the sum of branch length = 0.81814157. For the percentage of replicated trees in which the associated taxa were grouped, 500 replications (bootstrap) were considered. The tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were calculated with the p-distance method and are in the units of the number of base differences per site. The analysis involved 21 nucleotide sequences. The codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + non-coding. All positions that contained gaps and missing data were deleted, there were a total of 1103 positions in the final data set. The evolutionary analysis was performed with the MEGA7 program.

In vitro propagation of *O. ficus-indica*

In order to obtain pathogen-free plants, cladode cultures were established from healthy meristem cultures when explants of approximately 10 cm in length were obtained. The MS medium (Murashige and Skoog, 1962) was supplemented with 0.1 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (ANA) and 1.0 mg L⁻¹ benzyladenine (BAP) and gelled with agar. Explants were incubated under controlled temperature and light conditions. After reaching a length of approximately 10 cm, the grafting was carried out in aseptic media.

Transmission by grafting

Since there were no segments of prickly pear cladodes with symptoms of thickening, yellowing, reduced growth and deformation, they were grafted on cladodes (approximately 20 cm long) of 20 healthy plants obtained by *in vitro* culture. For this purpose, triangular cuts were made in the middle of the healthy cladode and then removed, leaving a gap in the cladode border. Triangular sections of cladodes with symptoms were then cut out to fill those gaps in healthy cladodes. The grafted cladodes were covered with plastic wrap, plants were kept in a controlled environment chamber at 26 °C and a photoperiod of 16 h light, and 8 h dark for 30 d, at the end of which they were analyzed by PCR for phytoplasmas as described above.

con síntomas y se introdujeron en las zonas retiradas de los cladodios sanos. Los cladodios injertados se cubrieron con plástico adherible y las plantas se mantuvieron en cámara de ambiente controlado a 26 °C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad durante 30 d, al término de los cuales se analizaron por PCR para la detección de fitoplasmas de la manera ya descrita.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Daños en plantas injertadas

Todas las plantas injertadas mostraron proliferación de brotes, engrosamiento de cladodios, deformación de frutos y detención de la producción de nuevos brotes (Figura 2).

Los síntomas que se observaron en las plantas de nopal recolectadas en San Martín de las Pirámides en este estudio son diferentes de los hallados por Suaste *et al.* (2012b) en la zona de Nopaltepec, quienes encontraron cladodios con engrosamiento, mosaico, proliferación excesiva de frutos, amarillamiento de pencas y frutos. Estas diferencias pueden deberse a que esos autores detectaron un fitoplasma y, además, un virus. En EE.UU. se informó la presencia de un virus del género *Umbravirus* como el causante del engrosamiento de cladodio (Felker *et al.*, 2009).

Detección de fitoplasmas por PCR

Las plantas sanas injertadas con segmentos de cladodio infectados con fitoplasmas mostraron síntomas y amplificaron por PCR el fragmento esperado para fitoplasmas. En la primera amplificación hecha con los iniciadores P1 / P7 se obtuvo el producto esperado de 1800 pb en los 14 cladodios analizados, mientras que en la segunda amplificación (anidada) sólo en 12 casos se obtuvo el amplicon esperado de 1200 pb (Figura 3).

Secuenciación y análisis filogenético

Con las secuencias se obtuvo una secuencia consenso que mostró 99% de similitud con *Candidatus* Phytoplasma y se depositó en el GenBank (No. de acceso KP271498). El análisis filogenético mostró que el aislamiento obtenido de nopal es muy similar al encontrado por Leyva-López *et al.*, (1999) (Figura 4). La imposibilidad de cultivar estos patógenos *in vitro* involucra un problema mayor para

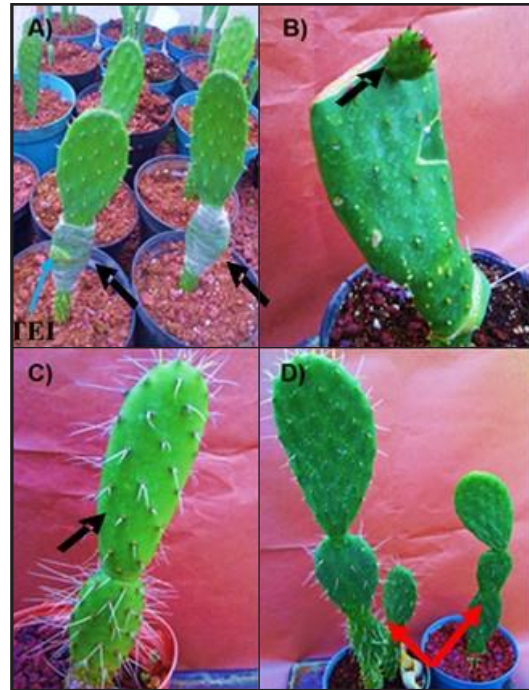


Figura 2. A) Plantas sanas de un mes y medio de edad con tejido enfermo injertado (TEI). B) Deformación de brotes jóvenes. C) Reducción del crecimiento, amarillamiento y engrosamiento. D) Engrosamiento y reducción de producción de nuevos brotes.

Figure 2. A) Healthy plants one and a half month old grafted with ill tissue (TEI). B) Deformation of young sprouts. C) Growth reduction, yellowing and thickening. D) Thickening and new sprouts inhibition.

RESULTS AND DISCUSSION

Damage on grafted plants

All the grafted plants showed sprout proliferation, cladode thickening, fruit deformation and new sprouts inhibition (Figure 2).

The symptoms observed in the prickly pear cactuses collected in San Martin de las Pirámides in this study are different from those found by Suaste *et al.* (2012b) in the Nopaltepec area. They found cladodes with thickening, mosaic, excessive fruit proliferation, and yellowing of stalks and fruits. These differences may be due to the fact that those authors detected phytoplasma and also virus. A virus of the genus *Umbravirus* was reported to be the cause of cladodes thickening in USA (Felker *et al.*, 2009).

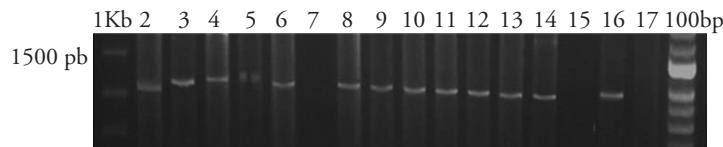


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, del producto de PCR anidada para fitoplasmas con los iniciadores R16F2n y R16R2. Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen®), Carriles 2 a 14: plantas con síntomas que resultaron positivas para fitoplasma, a excepción de los carriles 7 y 15 que fueron negativos. Carril 16: testigo positivo (amarillamiento letal del cocotero). Carril 17: testigo negativo (agua libre de nucleasas, Invitrogen®).

Figure 3. Agarose 1% gel electrophoresis of the nested PCR product for phytoplasmas with R16F2n and R16R2 primers. Lane 1: molecular weight marker 1 kb (Invitrogen®), Lane 2 to 14: plants with symptoms that were phytoplasma positives, except for lanes 7 and 15 which were negative. Lane 16: positive control (lethal yellowing of the coconut tree). Lane 17: negative control (nuclease-free water, Invitrogen®).

su identificación y clasificación, pero gracias a la secuenciación de nucleótidos y el desarrollo de programas para su interpretación se pueden distinguir las relaciones filogenéticas entre los grupos de estos microorganismos.

Phytoplasma detection by PCR

Healthy plants grafted with cladode segments infected with phytoplasmas showed symptoms and amplified by PCR the fragment expected for

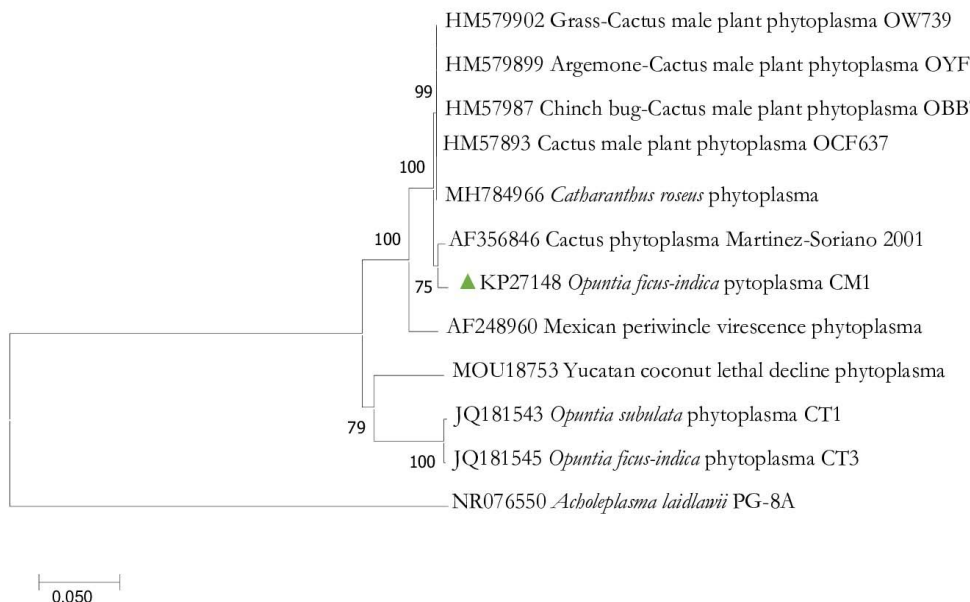


Figura 4. Árbol filogenético que muestra la relación entre *Opuntia ficus Phytoplasma* (KP271498) identificado en huertos de San Martín de las Pirámides, con diferentes aislamientos de fitoplasmas, y *Candidatus cactus* phytoplasma (AF356846). *Acholeplasma laidlawii* se utilizó como raíz. Las relaciones genéticas se infirieron con el método de vecinos cercanos (Neighbor-Joining). Los análisis evolutivos se realizaron con el programa MEGA. El porcentaje de árboles replicados con los taxones asociados se hizo con 500 bootstrap.

Figure 4. Phylogenetic tree showing the relationship between *Opuntia ficus Phytoplasma* (KP271498) identified in orchards of San Martín de las Pirámides, with different phytoplasma isolations, and *Candidatus cactus* phytoplasma (AF356846). *Acholeplasma laidlawii* was used as a root. Genetic relationships were inferred with the Neighbor-Joining method. Evolutionary analyses were performed with the MEGA program. The percentage of trees replicated with the associated taxa was done with 500 bootstrap.



Figura 5. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores R16F2n y R16R2n en gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Los fragmentos amplificados corresponden al gen RNAr 16S de fitoplasmas de plantas de nopal sanas injertadas con segmentos de cladodio infectados con fitoplasma. 1 kb: Marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen®); Carriles 2 a 7: plantas de nopal que presentaron engrosamiento; (+) Testigo positivo (amarillamiento letal del cocotero); (-) Testigo negativo (agua libre de nucleasas, Invitrogen®).

Figure 5. PCR products obtained with the R16F2n and R16R2n primers in 1% agarose gel in TAE 1X. The amplified fragments correspond to the RNAr 16S gene of phytoplasmas from healthy prickly pear cactus plants grafted with cladode segments infected with phytoplasma. 1 kb: molecular weight of 1 kb marker (Invitrogen®); Lane 2 to 7: prickly pear cactus plants that showed thickening; (+) Positive control (lethal yellowing of the coconut tree); (-) Negative control (nuclease-free water, Invitrogen®).

Transmisión por injerto

Las plantas sanas, injertadas con segmentos de cladodios con síntomas de engrosamiento, expresaron síntomas similares a las plantas recolectadas en campo. A pesar de ello, dos plantas injertadas no resultaron positivas (Figura 5, carriles 3 y 5); en ocasiones los fitoplasmas se concentran en el tejido del floema y en muy bajas concentraciones en el resto de la planta (Wei *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2002). Por lo tanto en algunas ocasiones es difícil detectarlos y, además, el cultivo de nopal posee grandes cantidades de carbohidratos en un compuesto hidrofílico mucilaginoso, el cual dificulta la extracción de los ácidos nucleicos (Nobel *et al.*, 1992). En Italia, Granata *et al.* (2006) observaron que los síntomas en plantas injertadas comenzaron a aparecer después de dos meses de realizado el injerto, y fueron similares a los de las plantas originales.

Los fitoplasmas son bacterias patógenas carentes de pared celular que infectan numerosas plantas, son parásitos obligados limitados al floema y se transmiten por insectos, estructuras de reproducción vegetativa e injerto (Lee *et al.*, 2010; Tedeschi *et al.*, 2014). Dentro del taxón *Candidatus* Phytoplasma se han propuesto 31 especies (IRPCM, 2004). Diversos aislamientos de dicho grupo están consignados como causantes del amarillamiento letal del cocotero en Mozambique (Bila *et al.*, 2015), del amarillamiento y escoba de bruja de la soya en India (Kumar *et al.*, 2011), y del amarillamiento de la vid (enfermedad de

phytoplasmas. In the first amplification made with P1 / P7 primers, the expected product of 1800 bp was obtained in all of the 14 analyzed cladodes, while in the second amplification (nested) the expected amplicon of 1200 bp was obtained only in 12 cases (Figure 3).

Sequencing and phylogenetic analysis

With the sequences a consensus sequence was obtained which showed 99% similarity to *Candidatus* Phytoplasma and was deposited in GenBank (Access No. KP271498). Phylogenetic analysis showed that the isolation obtained from prickly pear is very similar to that found by Leyva-López *et al.* (1999) (Figure 4). The impossibility of cultivating these pathogens *in vitro* involves a major problem for their identification and classification. However through nucleotide sequencing and the development of programs for their interpretation, the phylogenetic relationships among groups of these microorganisms can be distinguished.

Transmission by grafting

Healthy plants grafted with segments of cladodes with thickening symptoms showed similar symptoms similar to those observed in plants collected in the field. In spite of this, two grafted plants did not test positive (Figure 5, lanes 3 and 5). Sometimes the phytoplasmas are concentrated in the phloem

Blackwood) en viñedos de países europeos del Mediterráneo (Murolo y Romanazzi, 2015). Además, *Candidatus* Phytoplasma es patógeno de cactáceas en el sureste y norte de China, en las provincias de Yunan (Cai *et al.*, 2008; Zheng-Nan *et al.*, 2012) y Shaanxi (Li *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La transmisión del engrosamiento del cladodio por injerto, y la detección de *Candidatus* Phytoplasma por reacción en cadena de la polimerasa en plantas injertadas confirmaron que este es el agente causal de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la investigación y los estudios del primer autor. Al Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-SENASICA por su apoyo para la secuenciación.

LITERATURA CITADA

- Bayar, N., M. Kriaa, and R. Kammoun. 2016. Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. *Int. J. Biol. Macromol.* 92: 441-450.
- Bertaccini, A., A. Calari, and P. Felker. 2007. Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bull. Insectol.* 60: 257-258.
- Bila, J., N. Höberg, A. Mondjana, and B. Samils. 2015. African fan palm (*Borassus aethiopum*) and oil palm (*Elaeis guineensis*) are alternate hosts of coconut lethal yellowing phytoplasma in Mozambique. *Afr. J. Biotechnol.* 14: 3359-3367.
- Borrego, E. F., y Burgos V. N. 1986. El Nopal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. pp: 7 y 85.
- Callejas, N., J. Matus, J. García, M. Martínez, y J. Salas. 2009. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y derivados en el Estado de México. *Agrociencia* 43: 73-82.
- Cai, H., W. Wei, R. E. Davis, H. Chen, and Y. Zhao. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1448-1457.
- Chaouch, M. A., J. Hafsa, C. Rihouey, D. Le Cerf, and H. Majdoub. 2016. Effect of pH during extraction on the antioxidant and antiglycated activities of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*. *J. Food Biochem.* 40: 316-325.
- Deng, S., and C. Hiruki 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by

tissue but at very low concentrations in the rest of the plant (Wei *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2002). Therefore, in some cases it is difficult to detect them, and in addition, prickly pear cactus culture has large amounts of carbohydrates in a hydrophilic mucilaginous compound, which makes nucleic acids extraction more difficult (Nobel *et al.*, 1992). In Italy, Granata *et al.* (2006) observed that symptoms in grafted plants began to appear two months after grafting and were similar to those of the original plants.

Phytoplasmas are pathogenic bacteria without a cell wall that infect numerous plants; they are forced parasites limited to phloem and are transmitted by insects, vegetative reproduction structures and grafting (Lee *et al.*, 2010; Tedeschi *et al.*, 2014). Within the *Candidatus* Phytoplasma taxon 31 species have been proposed (IRPCM, 2004). Several isolates from this group are reported to cause lethal coconut yellowing in Mozambique (Bila *et al.*, 2015), soybean yellowing and witches'-broom disease in India (Kumar *et al.*, 2011), and Blackwood's disease in vineyards of European Mediterranean countries (Murolo and Romanazzi, 2015). In addition, *Candidatus* Phytoplasma is a cactus pathogen in southeastern and northern China, in the Yunnan (Cai *et al.*, 2008; Zheng-Nan *et al.*, 2012) and Shaanxi (Li *et al.*, 2012) provinces.

CONCLUSIONS

The transmission of cladode thickening disease by grafting, and the detection of *Candidatus* Phytoplasma by polymerase chain reaction in grafted plants confirmed that this is the causal agent of the disease.

—End of the English version—



- nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81: 1475-1479.
- Doyle, J. J., and J.L. Doyle .1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Féboli, A., A. C. Laurentiz, S. C. S. Soares, J. G. Augusto, L. A. Anjos, L. G. Magalhães, R. S. Filardi, and R. S. Laurentiz. 2016. Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 226: 65-68.

- Felker, P., R. Bunch, G. Russo, y J. A. Tine. 2009. Progreso en la identificación del agente causal de “Engrosamiento del cladodio o planta macho”. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er. Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal”. Campus de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Escobedo, Nuevo León, México. pp: 37-47.
- Flores, V.C.A., y C. Gallegos V. 1993. Situación y perspectivas de la producción y comercialización de tuna en la región centro y norte de México. CRUCEN-CIESTAAM. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 5-27.
- Flores, V. C. A., J. M. de Luna E., y P. P. Ramírez M. 1995. Mercado Mundial del Nopalito. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. 176 p.
- Granata, G., S. Paltrinieri, S. Botti, and A. Bertaccini. 2006. Aetiology of *Opuntia ficus-indica* malformations and stunting disease. *Ann. Appl. Biol.* 149: 317-325.
- Gundersen, D. E., and I. M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 144-151.
- Harrison, N. A., W. Myrrip, P. Jones, M. L. Carpioi, M. M. Castillo, M. Doyle, and C. Oropeza. 2002. 16SrRNA interperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Ann. Appl. Biol.* 141: 183-193.
- Hernández-Pérez, R., J. C. Noa-Carrazana, R. Gaspar, P. Mata, and N. Flores-Estévez. 2009. Detection of phytoplasma on indian fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region. *OnLine J. Biol. Sci.* 9: 62-66.
- IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology). 2004. Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1243-55.
- Kumar, P. L., K. Sharma, H. Tefera, S. Boahen, and M. Tamò. 2011. First report of soybean witches’-broom disease caused by group 16SrII Phytoplasma in soybean in Malawi and Mozambique. *Plant Dis.* 95: 492.
- Lee, I. M., K. D. Bottner-Parker, Y. Zhao, R. E. Davis, and N. A. Harrison. 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2887-2897.
- Leyva-López, N. E., D. S. Aguilar R., D. S. Leal-Klevezas, and J. P. Martínez-Soriano. 1999. Presence of phytoplasmas in Mexican cacti. *Phytopathology* 89: S45.
- Murolo, S., and G. Romanazzi. 2015. In-vineyard population structure of ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ using multilocus sequence typing analysis. *Infect. Genet. Evol.* 31: 221-230.
- Murashige, F., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2016. Blast®. www.ncbi.nlm.nih.gov/ (Consulta: noviembre 2016).
- Nobel, P. S., J. Cavelier, and J. L. Andrade. 1992. Mucilage in cacti: Its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *J. Exp. Bot.* 43: 641-648.
- Onditi, M., A. A. Adelodun, E. O. Changamu, and J. C. Ngila. 2016. Removal of Pb²⁺ and Cd²⁺ from drinking water using polysaccharide extract isolated from cactus pads (*Opuntia ficus-indica*). *J. Appl. Polym. Sci.* 43913: 1-9.
- Pimienta, B. E. 1990. El Nopal Tunero. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara, Jalisco, México. 246 p.
- Ramírez, A. O., H. Figueroa E., y T. L. Espinosa E. 2015. Análisis de rentabilidad de la tuna en los municipios de Nopaltepec y Axapusco, estado de México. *Rev. Mex. Agron.* 19: 1199-1210.
- Suaste-Dzul, A., R.I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía y D. Pérez-Brito. 2012a. Detección molecular de fitoplasmas en nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento del cladodio. *Rev. Mex. Fitopatol.* 30:1-9.
- Suaste-Dzul, A. R.I. Rojas-Martínez, D. Ochoa-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, D. Pérez-Brito, C. Hernández-Juárez and D. Rodríguez-Martínez. 2012b. Virus associated with thickening of the cladodes of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* Mill.). *J. Biotechnol. Biodivers.* 4:100-107.
- Wei, W., H. Kawakita, and M. Sato. 2000. Detection of a small population of mulberry dwarf (MD)-phytoplasmas in symptomless-mulberry trees by nested PCR. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 69:261-269.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM HIERBA SANTA (*Piper auritum*) AND JARILLA (*Baccharis glutinosa*) AGAINST *Fusarium* spp.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE HIERBA SANTA (*Piper auritum*) Y JARILLA (*Baccharis glutinosa*) CONTRA *Fusarium* spp.

César Chacón¹, Johana Miranda-Granados¹, Nancy Ruiz-Lau^{2*}, Selene Lagunas-Rivera², Víctor M. Ruíz-Valdiviezo¹, Federico A. Gutiérrez-Miceli¹

¹Instituto Tecnológico de Tuxtla-Gutiérrez, Carretera Panamericana Km 1080, Tuxtla Gutiérrez 29050, Chiapas, México. (ingecesarfigueroa10@hotmail.com), (jmirandagranados@gmail.com), (bioqvic@hotmail.com), (fgmiceli@gmail.com). ²CONACYT-Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Tuxtla-Gutiérrez, Carretera Panamericana Km 1080, Tuxtla Gutiérrez 29050, Chiapas, México. (nruizla@conacyt.mx), (slagunari@conacyt.mx).

ABSTRACT

Diseases caused by *Fusarium* in *Agave* are increasing and causing economic losses. Then, it is necessary to seek alternatives in pathogenic prevention and control to reduce the use of chemical fungicides, thus promoting a type of disease control which is friendly to the environment. The oils and leaf extracts of some plants are efficient in controlling pests and diseases. *Piper auritum* (“hierba santa”) contains essential oils, which fulfill ecological functions such as attracting pollinators and causing allelopathic effects. *Baccharis glutinosa* (“jarilla”) is also used in the treatment of various infectious diseases. Different extracts from plants have biological activity against microorganisms that affect important crops. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial activity of essential oil and extracts from two plants with traditional use in the state of Chiapas on the phytopathogenic (*Fusarium* spp.) fungi of *Agave* spp. Extracts from *P. auritum* and *B. glutinosa* were tested against phytopathogenic fungi, in a complete randomized experimental design. ANOVA was performed with six treatments and three replicates per treatment, used on three species of *Fusarium*. The essential oil from leaves of *Piper auritum* had the greatest (96 h) significant inhibition effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *comiteca* (75.32%), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tequilana* (86.57%) and *Fusarium solani* f. sp. *comiteca* (63.36%). Thus, *P. auritum* showed a clear fungistatic effect.

Key words: *Piper auritum*, *Baccharis glutinosa*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, agave, extracts.

RESUMEN

Las enfermedades causadas por *Fusarium* en *Agave* aumentan, lo cual significa importantes pérdidas económicas. Es necesario entonces buscar alternativas en la prevención y control de patógenos para reducir el uso de fungicidas químicos, y así promover un tipo de control de enfermedades que sea amigable con el ambiente. Los aceites y extractos de hojas de algunas plantas son eficientes en el control de plagas y enfermedades. *Piper auritum* (“hierba santa”) contiene aceites esenciales que cumplen funciones ecológicas, como las de atraer polinizadores y causar efectos alelopáticos. *Baccharis glutinosa* (“jarilla”) también se usa en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. Hay diferentes extractos de plantas que tienen una actividad biológica contra microorganismos que afectan cultivos importantes. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos de dos plantas con uso tradicional en el estado de Chiapas sobre los hongos fitopatógenos (*Fusarium* spp.) de *Agave* spp. Los extractos de *P. auritum* y *B. glutinosa* se probaron contra los hongos fitopatógenos, como parte de un diseño experimental completamente aleatorizado. Un ANOVA se realizó con seis tratamientos y tres repeticiones por tratamiento, utilizados en tres especies de *Fusarium*. El aceite esencial extraído de las hojas de *Piper auritum* tuvo el mayor efecto inhibitorio significativo (96 h) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *comiteca* (75.32%), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tequilana* (86.57%) y *Fusarium solani* f. sp. *comiteca* (63,36%). Por lo tanto, *P. auritum* mostró un claro efecto fungistático.

Palabras clave: *Piper auritum*, *Baccharis glutinosa*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, agave, extractos.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: November, 2018. Approved: August, 2019.

Published as NOTE in *Agrociencia* 54: 531-538. 2020.

INTRODUCTION

In Mexico, the cultivation of *Agave* spp. has various uses, especially in the alcoholic beverage industry and as a source of natural fibers (Bezazi *et al.*, 2014). In Comitán, Chiapas, Mexico, a typical alcoholic beverage called “Comiteco” is produced from *Agave americana* distillation. *Agave* spp. is then an important plant resource with clear economic benefits in that region, but it is affected by diseases caused by fungi, mainly *Fusarium* (Ramírez *et al.*, 2017). *Fusarium oxysporum* is one of the most important soil-borne pathogens, which causes wilt diseases in several crops. This pathogen has the ability to persist for very long periods in soil without a host (Sharma *et al.*, 2016). As a consequence, the use of chemical fungicides has increased in order to control the fungi, but it causes damage to the soil and environment. Therefore, it is necessary to search for bioactive compounds with antifungal properties to control and prevent fungi damage on *Agave* spp.

Oils and leaf extracts of some plants are efficient for controlling pests and diseases (Silva *et al.*, 2014), as the genus *Piper*, which contains essential oils. The essential oil of *Piper auritum* Kunth tested against three isolates of *Fusarium* spp. (F2 and F5 of *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend Snyder & Hansen and F3 of *Fusarium redolens* Wollenweber) inhibited their growth (Duarte *et al.*, 2013a). Also, the hexane extract of *P. auritum* tested against *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* and *Botryodiplodia theobromae* showed relative control against those three pathogens (Pineda *et al.*, 2012). *Baccharis glutinosa* Pers. is a plant used in traditional medicine by the native people of northwest Mexico (Rosas-Burgos *et al.*, 2011). The crude methanolic extract of *B. glutinosa* used against three phytopathogenic fungi showed inhibition of their radial growth after 336 h (Rosas-Burgos *et al.*, 2009).

Therefore, the objective of this experiment was to evaluate the antifungal activity of essential oil and extracts from *P. auritum* and *B. glutinosa* against the genus *Fusarium*. And the hypothesis was that at least one of these plant species may control fungi growth effectively.

INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de *Agave* spp. tiene varios usos, en especial en la industria de bebidas alcohólicas y como fuente de fibras naturales (Bezazi *et al.*, 2014). En Comitán, Chiapas, México, se produce una bebida alcohólica típica llamada “Comiteco”, a partir de la destilación de *Agave americana*. *Agave* spp. es entonces un importante recurso vegetal con claros beneficios económicos en esa región, pero también es afectado por enfermedades causadas por hongos, principalmente *Fusarium* (Ramírez *et al.*, 2017). *Fusarium oxysporum* es uno de los patógenos transmitidos por el suelo más importante, que causa enfermedades de marchitez en varios cultivos. Este patógeno puede permanecer en el suelo durante períodos muy largos, sin un huésped (Sharma *et al.*, 2016). Como consecuencia, el uso de fungicidas químicos ha incrementado los intentos por controlar hongos, pero causa daños al suelo y al ambiente. Por lo tanto, es necesario buscar compuestos bioactivos con propiedades antifúngicas para controlar y prevenir el daño por hongos en *Agave* spp.

Los aceites y extractos de hojas de algunas plantas son efectivos en el control de plagas y enfermedades (Silva *et al.*, 2014), como el género *Piper*, que contiene aceites esenciales. El aceite esencial de *Piper auritum* Kunth probado contra tres aislados de *Fusarium* spp. (F2 y F5 de *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend Snyder & Hansen, y F3 de *Fusarium redolens* Wollenweber) inhibió su crecimiento (Duarte *et al.*, 2013a). Además, el extracto hexánico de *P. auritum* probado contra *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae*, tuvo un control relativo sobre esos tres patógenos (Pineda *et al.*, 2012). *Baccharis glutinosa* Pers. es una planta utilizada en medicina tradicional por los nativos del noroeste de México (Rosas-Burgos *et al.*, 2011). El extracto metanólico crudo de *B. glutinosa* utilizado contra tres hongos fitopatógenos mostró inhibición de su crecimiento radial después de 336 h de ensayo (Rosas-Burgos *et al.*, 2009).

Por lo tanto, el objetivo de este experimento fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial y los extractos de *P. auritum* y *B. glutinosa* sobre hongos del género *Fusarium*. La hipótesis fue que al menos una de estas especies vegetales puede controlar el crecimiento de hongos de manera efectiva.

MATERIAL AND METHODS

Plant collection and extract preparation

Piper auritum was collected in Villaflores, Chiapas (16° 14' 00" N 93° 16' 09" O; 560 msnm) and *B. glutinosa* in San Cristóbal de las Casas, Chiapas (16° 44' 12" N 92° 38' 18" O; 2200 msm). All the plant materials were dried for 25 d in the shade. Essential oil was extracted from fresh leaves by hydro-distillation method (Li *et al.*, 2014). For the ethereal extract, the powder of the dried leaves was macerated with ethyl ether for 35 d. The crude extract was filtered through sterile gauze and concentrated to dryness. The Soxhlet extract, from leaves of *P. auritum*, was extracted with ethyl ether for 4 h, also the ethanolic extracts of leaves and roots were put through a reflux system for other 4 h. Afterwards, the solvent was evaporated to dryness. The essential oil and extracts were stored in amber flasks at 4 °C until use. The efficiency of the essential oil and extracts was calculated using the formula (Mesa *et al.*, 2012):

$$\% \text{ Extraction} = \frac{\text{Extract weight}}{\text{Weight plant material}} \times 100$$

In the bioassays each extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and prepared at a concentration of 200 mg mL⁻¹ (Al akeel *et al.*, 2017), while the essential oil was used pure.

Fungi culture

The species of *Fusarium oxysporum* f. sp. *comiteca* (FoC-ITTG), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tequilana* (FoT-ITTG) and *Fusarium solani* f. sp. *comiteca* (FsC-ITTG) were propagated in Petri dishes with Potato-Dextrose-Agar (PDA) incubated at 28 ± 2 °C for seven days. Whatman No. 1 6 mm diameter filter paper discs were placed to promote mycelial growth on paper (Miranda-Granados *et al.*, 2018). Fungi strains used were provided by the Microbiology Laboratory of the Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) and they are part of the microbiota collection in that laboratory.

Antifungal activity of plant extracts

In the first bioassay, testing the biocontrol effect by direct contact of the extracted fractions on the microorganisms, Whatman No. 1 paper discs were impregnated with 10 µL of the corresponding extract. Afterwards, discs with the fungi species were placed on the disks with the extract. In a second bioassay, it was assessed the effect of the vapors of the extract that showed satisfactory results previously. A paper disc with essential oil

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de plantas y preparación de extractos

Piper auritum se recolectó en Villaflores, Chiapas (16° 14' 00" N 93° 16' 09" O; 560 msnm) y *B. glutinosa* en San Cristóbal de las Casas, Chiapas (16° 44' 12" N 92° 38' 18" O; 2200 msnm). Todo el material vegetal se secó durante 25 d a la sombra. El aceite esencial se extrajo de las hojas frescas con el método de hidrodestilación (Li *et al.*, 2014). Para el extracto etéreo, el polvo de las hojas secas se maceró con éter etílico durante 35 d. El extracto crudo se filtró a través de una gasa estéril y se concentró hasta sequedad. El extracto Soxhlet, de hojas de *P. auritum*, se extrajo con éter etílico durante 4 h, además los extractos etanólicos de hojas y raíces se obtuvieron por un sistema de reflujo durante otras 4 h. Después, el disolvente se evaporó hasta sequedad. El aceite esencial y los extractos se almacenaron en frascos ámbar a 4 °C hasta su uso. La eficiencia del aceite esencial y los extractos se calculó con la siguiente fórmula (Mesa *et al.*, 2012):

$$\% \text{ Extraction} = \frac{\text{Extract weight}}{\text{Weight plant material}} \times 100$$

En los bioensayos, cada uno de los extractos se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se preparó a una concentración de 200 mg mL⁻¹ (Al akeel *et al.*, 2017), mientras que el aceite esencial se usó puro.

Cultivo de hongos

Las especies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *comiteca* (FoC-ITTG), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tequilana* (FoT-ITTG) y *Fusarium solani* f. sp. *comiteca* (FsC-ITTG) se propagaron en placas Petri con papa-dextrosa-agar (PDA) incubadas a 28 ± 2 °C durante siete días. Discos de papel filtro Whatman No. 1 de 6 mm de diámetro se colocaron para promover el crecimiento del micelio en el papel (Miranda-Granados *et al.*, 2018). El Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) proporcionó las cepas de hongos utilizadas y son parte de la colección microbiana de ese laboratorio.

Actividad antifúngica de extractos de plantas

En el primer bioensayo, al probar el efecto de biocontrol por contacto directo de las fracciones extraídas sobre los microorganismos, los discos de papel Whatman No. 1 se impregnaron con 10 µL del extracto correspondiente. Después, los discos con las especies fúngicas se colocaron sobre los discos con el extracto. En un segundo bioensayo se evaluó el efecto de los vapores del

was placed in the center of Petri dishes and at 5 mm distance, four discs were planted with the microorganism. Growth was measured every 24 h, sterile distilled water (H₂O) was a positive control and a solvent test was also performed using a filter paper disc treated with sterile DMSO. The inhibition percentage of radial growth (PIRG) was calculated using the Abbot formula: $PIRG (\%) = [(RC - RT) / RC] \times 100$, where, RC is the radius of the control and RT the radius of the treatment (Miranda-Granados *et al.*, 2018).

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized experimental design of six treatments with three replicates each was used to analyze plant compounds effect on the three fungi species, and the response variable was PIRG (percentage of inhibition of radial growth). One-way ANOVA was performed, and means were compared with Tukey multiple comparison test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Plants extraction yield

The yields obtained for the bioextracts of *P. auritum* were 0.308% of fresh weight (FW) for essential oil. For ethereal extract and Soxhlet extract, the yields were 3.47% of dry weight (DW) and 1.56% (FW), respectively (Table 1). The density of the essential oil was 1.09 g mL⁻¹, while the viscosity values were 1.57 mPa (dynamic) and 1.44 mm² s⁻¹ (kinematics). Pineda *et al.* (2012) indicated that the essential oil of *P. auritum* leaves have a performance of 0.12% (FW). Also, the hexane extract obtained by maceration showed efficiency of 0.19% (DW) (Delgado *et al.*, 2012) and 0.24% by percolation (FW) (Sánchez *et al.*, 2011). Thus, in our study

extracto que previamente tuvo resultados satisfactorios. Un disco de papel con aceite esencial se colocó en el centro de las placas Petri y, a una distancia de 5 mm, se colocaron cuatro discos con el microorganismo. El crecimiento se midió cada 24 h, agua destilada estéril (H₂O) se usó como control positivo y también se realizó una prueba con disolvente usando un disco de papel filtro tratado con DMSO estéril. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRG) se calculó con la fórmula de Abbot: $PIRG (\%) = [(RC - RT) / RC] \times 100$, donde RC es el radio del control y RT el radio del tratamiento (Miranda-Granados *et al.*, 2018).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y seis tratamientos con tres repeticiones cada uno para analizar el efecto de los compuestos vegetales en las tres especies fúngicas, y la variable de respuesta fue PIRG (porcentaje de inhibición del crecimiento radial). Un ANOVA de una vía se realizó, y las medias se compararon con la prueba Tukey de comparación múltiple ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos vegetales

Los rendimientos obtenidos para los bioextractos de *P. auritum* fueron 0.308% del peso fresco (FW) para el aceite esencial. Para el extracto etéreo y Soxhlet, los rendimientos fueron 3.47% del peso seco (DW) y 1.56% del peso fresco (FW), respectivamente (Cuadro 1). La densidad del aceite esencial fue 1.09 g mL⁻¹, mientras que los valores de viscosidad fueron 1.57 mPa (dinámica) y 1.44 mm² s⁻¹ (cinemática). Pineda *et al.* (2012) indicaron que el aceite esencial de las hojas de *P. auritum* tiene un rendimiento de 0.12% (FW). Además, el extracto hexá-

Table 1. Extraction yields of *P. auritum* and *B. glutinosa*.

Cuadro 1. Rendimientos de los extractos de *P. auritum* y *B. glutinosa*.

Bioextract	Efficiency
Essential oil of <i>P. auritum</i>	0.308% (w/w FW) [†]
Ethereal extract of <i>P. auritum</i> leaves	3.47% (DW) [‡] ; 0.59% (FW)
Soxhlet Extract of <i>P. auritum</i> leaves	9.14% (DW); 1.56% (FW)
Ethanol extract of <i>B. glutinosa</i> leaves	25.61% (DW)
Ethanol extract of <i>B. glutinosa</i> root	9.23% (DW)

[†]FW: fresh weight, [‡]DW: dry weight (leaf humidity: 82.9%) ♦ [†]FW: peso fresco, [‡]DW: peso seco (humedad de la hoja: 82.9%).

the efficiency of essential oil and extracts are higher than those reports. This difference may be due to the solvent and the extraction technique used in our experiment. Crude methanolic extracts obtained by maceration from *B. glutinosa* had yields of 26% (DW) (Rosas-Burgos *et al.*, 2009), which is similar to the yield in our study (25.61% (DW)).

Antifungal activity of plant extracts

The greatest antifungal activity of the Soxhlet extract of *Piper auritum* leaves was observed on *FoC* and *FsC* (57.50%) and for the ethereal extract was on *FoT* (62.75%) at 24 h. However, at 96 h these results of inhibition decreased. The ethanolic extracts of *B. glutinosa* obtained by reflux showed a statistically significant difference only at 96 h in *FoC*. Nevertheless, in *FoT* and *FsC* those extracts had the same effect on each fungus (Table 2).

The essential oil obtained from leaves of *P. auritum* showed the best inhibition results with values of 100% at 24 h and 63-86.57% at 96 h for the three fungi (Figure 1); inhibitory effect was evaluated by volatility (Table 3). The results obtained were: *FoC*, 72%; *FoT*, 89.71% and *FsC*, 56.60% at 24h. However, the inhibitory effect decreased considerably over time.

nico obtenido por maceración mostró una eficiencia de 0.19% (DW) (Delgado *et al.*, 2012) y 0.24% por percolación (FW) (Sánchez *et al.*, 2011). Por lo tanto, en nuestro estudio, la eficiencia del aceite esencial y los extractos es más elevada que lo reportado en esos estudios. Esta diferencia puede deberse al disolvente y la técnica de extracción utilizada en nuestro experimento. El extracto metanólico crudo obtenidos por maceración de *B. glutinosa* tuvo un rendimiento de 26% (DW) (Rosas-Burgos *et al.*, 2009), que es similar al rendimiento obtenido en nuestro estudio (25.61% (DW)).

Actividad antifúngica de extractos de plantas

La mayor actividad antifúngica del extracto Soxhlet de hojas de *Piper auritum* se observó en *FoC* y *FsC* (57.50%) y para el extracto etéreo en *FoT* (62.75%) a las 24 h. Sin embargo, a las 96 h estos resultados de inhibición disminuyeron. Los extractos etanólicos de *B. glutinosa* obtenidos por reflujo mostraron una diferencia estadísticamente significativa solo a las 96 h en *FoC*. Sin embargo, en *FoT* y *FsC* esos extractos tuvieron el mismo efecto en cada hongo (Cuadro 2).

El aceite esencial obtenido de hojas de *P. auritum* mostró los mejores resultados de inhibición con valores de 100% a las 24 h y 63-86.57% a las 96 h

Table 2. Percent inhibition by direct contact of ethanolic extracts (200 mg mL⁻¹) of *B. glutinosa* and essential oil of *P. auritum* on phytopathogenic *Fusarium* species.

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición por contacto directo de extractos etanólicos (200 mg mL⁻¹) de *B. glutinosa* y aceite esencial de *P. auritum* en especies fitopatógenas de *Fusarium*.

Treatment	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>comiteca</i>				<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tequilana</i>				<i>F. solani</i> f. sp. <i>comiteca</i>			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
C (+) [†]	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
EEM-HS [‡]	42.50 b	32.07 b	14.39 b	15.06 bc	62.75 c	14.81 b	12.80 ab	18.41 bc	42.50 b	19.35 b	21.88 cd	18.32 c
AE-HS [§]	100 c	100 d	87.02 d	75.32 d	100 d	100 d	97.23 d	86.57 d	100 c	97.42 d	84.38 e	63.36 d
EESx-HS [‡]	57.50 b	43.48 c	38.60 c	15.58 bc	23.53 b	36.51 c	33.56 c	11.19 b	57.50 b	38.71 c	24.65 d	5.60 ab
EER-HJ [¶]	37.50 b	36.96 bc	23.86 b	25.97 c	56.86 c	33.33 c	24.57 bc	23.88 c	35.00 b	9.68 ab	12.85 b	13.49 bc
EER-RJ ^{**}	40.00 b	28.26 b	13.68 b	11.17 ab	50.00 c	11.64 ab	11.76 ab	19.90 bc	35.00 b	16.13 b	14.58 bc	14.25 bc

Data reported in PIRG; [†]C (+): sterile distilled water, [‡]EEM-HS: ethereal extract of *P. auritum* leaves obtained by maceration, [§]AE-HS: *P. auritum* essential oil, [‡]EESx-HS: ethereal extract of *P. auritum* leaves obtained by Soxhlet technique, [¶]EER-HJ: ethanolic extract of *B. glutinosa* leaves, ^{**}EER-RJ: ethanolic extract of *B. glutinosa* root. Different letters in a row indicate statistical difference (Tukey, p≤0.05)
 ♦ Datos reportados en PIRG; [†]C (+): agua destilada estéril, [‡]EEM-HS: extracto etéreo de hojas de *P. auritum* obtenido por maceración, [§]AE-HS: aceite esencial de *P. auritum*, [‡]EESx-HS: extracto etéreo de hojas de *P. auritum* obtenido por técnica Soxhlet, [¶]EER-HJ: extracto etanólico de hojas de *B. glutinosa*, ^{**}EER-RJ: extracto etanólico de raíz de *B. glutinosa*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística (Tukey, p≤0.05).

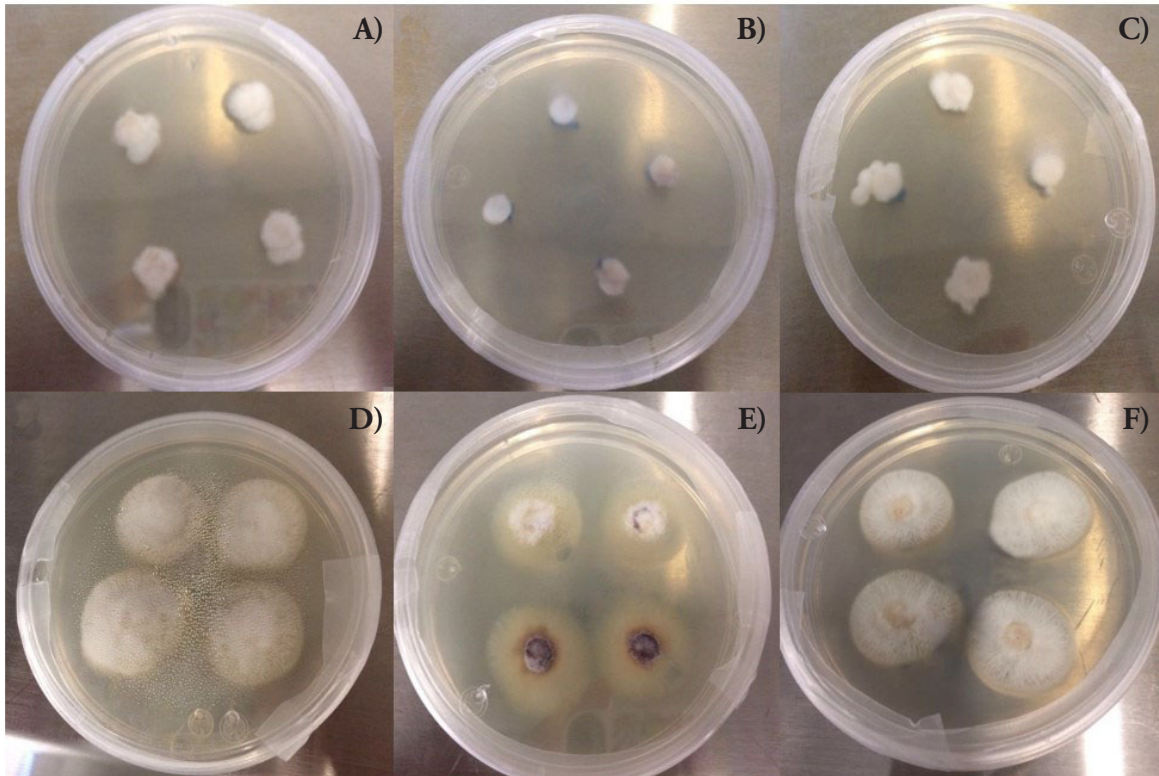


Figure 1. Effect of *P. auritum* essential oil by direct contact on *Fusarium* spp at 72 h. Essential oil treatment on *F. oxysporum* f. sp. *comiteca* (A), *F. oxysporum* f. sp. *tequilana* (B) and *F. solani* f. sp. *comiteca* (C). Control treatment (sterile distilled water) on *F. oxysporum* f. sp. *comiteca* (D), *F. oxysporum* f. sp. *tequilana* (E) and *F. solani* f. sp. *comiteca* (F).

Figure 1. Efecto del aceite esencial de *P. auritum* por contacto directo sobre *Fusarium* spp a las 72 h. Tratamiento de aceite esencial en *F. oxysporum* f. sp. *comiteca* (A), *F. oxysporum* f. sp. *tequilana* (B) y *F. solani* f. sp. *comiteca* (C). Tratamiento control (agua destilada estéril) en *F. oxysporum* f. sp. *comiteca* (D), *F. oxysporum* f. sp. *tequilana* (E) y *F. solani* f. sp. *comiteca* (F).

Our results suggest that the antifungal effect of the essential oil of *P. auritum* is more efficient than the extracts and in the bioassay by direct contact, and the effect decreased slightly at 96 h but not in volatility. Duarte *et al.* (2014) mentioned that the oils of *P. auritum* and *P. aduncum* showed a high

para los tres hongos (Figura 1); el efecto inhibitorio mediante la volatilidad también se evaluó (Cuadro 3). Los resultados obtenidos fueron: *FoC*, 72%; *FoT*, 89.71% y *FsC*, 56.60% a las 24h. Sin embargo, el efecto inhibitorio disminuyó de manera considerable con el tiempo.

Table 3. Inhibition percent by volatility of essential oil of *P. auritum* on phytopathogenic *Fusarium* species.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición por volatilidad de aceite esencial de *P. auritum* en especies fitopatógenas de *Fusarium*.

Treatment	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>comiteca</i>			<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tequilana</i>			<i>F. solani</i> f. sp. <i>comiteca</i>		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
C (+) [†]	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AE-HS [‡]	72.00 b	37.01 b	17.09 b	89.71 b	45.93 b	28.23 b	56.60 b	33.09 b	19.25 b

Data reported in PIRG; [†]C (+): sterile distilled water, [‡]AE-HS: *P. auritum* essential oil. Different letters in a row indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$) ♦ Datos reportados en PIRG; [†]C (+): agua destilada esterilizada, [‡]AE-HS: aceite esencial de *P. auritum*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

antifungal activity four days after inoculation on *Curvularia lunata*, *Sarocladium oryzae* and *Bipolaris oryzae*.

Piper essential oils and extracts have a high metabolic diversity and were reported with antifungal properties (Da Silva *et al.*, 2014). The effect caused by these substances extracted from plants on phytopathogenic fungi is due to mechanisms of direct fungitoxic action (Silva *et al.*, 2014). The biological activity is attributed to secondary metabolites from alkaloids, terpenes, iridoids, lactones, flavonoids, naphthoquinones and anthroquinones, coumarins, phenylpropanoids and other phenolic resins (Céspedes *et al.*, 2015).

The volatile effect of the essential oil of *P. auritum* could be associated to oil evaporation, which leads to a higher concentration of vapors during the initial evaluation period as well as changes in the time and the quantitative composition of the bioactive compounds in the vapor phase of the oils. Whilst the mode of action of the essential oil could be associated with affectations in the synthesis of the cellular wall of the hyphae (Duarte *et al.*, 2013b).

The antifungal activity of the essential oil is possibly related to the presence of terpene substances and it may be due to their ability to destroy cellular integrity, inhibit respiration and ion transport processes, thus increasing membrane permeability. The essential oils are complex mixtures which biological activity may be due to their major components or to synergistic effects among them. It is then possible to identify compounds which might serve as source for the development of molecules with antifungal activity (Tangarife-Castaño *et al.*, 2014).

CONCLUSIONS

The techniques used in this study showed higher yields of the essential oil and extracts of *Piper auritum* and *Baccharis glutinosa* extracts. These findings suggest that the inhibitory effect presented by the studied extracts and essential oils in plants of *P. auritum* and *B. glutinosa* are fungistatic on *FoC*, *FoT* and *F5C*. Besides, it was the essential oil of *P. auritum* that showed the greatest activity on the three phytopathogenic fungi evaluated.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el efecto antifúngico del aceite esencial de *P. auritum* es más eficiente que los extractos; sin embargo, el efecto disminuyó ligeramente a las 96 h en el bioensayo por contacto directo, pero no en el de volatilidad. Duarte *et al.* (2014) mencionaron que los aceites de *P. auritum* y *P. aduncum* mostraron una elevada actividad antifúngica cuatro días después de la inoculación en *Curvularia lunata*, *Sarocladium oryzae* y *Bipolaris oryzae*.

Los aceites esenciales y extractos de Piper tienen una alta diversidad metabólica, como también propiedades antifúngicas (Da Silva *et al.*, 2014). El efecto causado por estas sustancias extraídas de las plantas sobre hongos fitopatógenos se debe a mecanismos de acción fungitóxica directa (Silva *et al.*, 2014). La actividad biológica se atribuye a metabolitos secundarios del tipo alcaloides, terpenos, iridoides, lactonas, flavonoides, naftoquinonas y antroquinonas, cumarinas, fenilpropanoides y otras resinas fenólicas (Céspedes *et al.*, 2015).

El efecto volátil del aceite esencial de *P. auritum* podría estar relacionado con la evaporación del aceite, lo que conduce a una mayor concentración de vapores durante el período de evaluación inicial, así como a cambios en el tiempo y la composición cuantitativa de los compuestos bioactivos en la fase de vapor de los aceites. A su vez, el modo de acción del aceite esencial podría estar asociado con afectaciones en la síntesis de la pared celular de las hifas (Duarte *et al.*, 2013b).

La actividad antifúngica del aceite esencial está probablemente relacionada con la presencia de sustancias terpénicas y puede deberse a su capacidad para destruir la integridad celular, inhibir la respiración y los procesos de transporte de iones, y así aumenta la permeabilidad de la membrana. Los aceites esenciales son mezclas complejas cuya actividad biológica puede deberse a sus componentes principales o a efectos sinérgicos entre ellos. Es posible, entonces, identificar compuestos que podrían servir como fuente para el desarrollo de moléculas con actividad antifúngica (Tangarife-Castaño *et al.*, 2014).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)-Mexico [grant numbers 594550 and 597369]. César Chacón and Johana Miranda-Granados are also acknowledged for performing bioassays.

LITERATURE CITED

- Al Akeel R., A. Mateen, K. Janardhan, and V. Gupta. 2017. Analysis of anti-bacterial and antioxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvents extracts. Saudi J. Biol. Sci. 24: 11–14.
- Bezazi A., A. Belaadi, M. Bourchak, F. Scarpa, and K. Boba. 2014. Novel extraction techniques, chemical and mechanical characterization of *Agave americana* L. natural fibres. Composites Part B: Eng. 66: 194-203.
- Céspedes C., J. Alarcon, P. Aqueveque, T. Lobo, J. Becerra, C. Balbontin, J. Avila, I. Kubo, and D. Seigler. 2015. New environmentally-friendly antimicrobials and biocides from Andean and Mexican biodiversity. Environ. Res. 142: 549–562.
- Da Silva J. K. R., J. R. A. Silva, S. B. Nascimento, S. F. M. da Luz, E. N. Meireles, C. N. Alves, A. R. Ramos, and J. G. S. Maia. 2014. Antifungal activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* infection in black pepper. Molecules. 19: 17926-17942.
- Delgado B. E., M. del R. García-Mateos, M. del C Ybarra-Moncada, C. Luna-Morales, and M. T. Martínez-Damián, 2012. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. Rev. Chapingo Serie Hort. 18: 55-69.
- Duarte Y., O. Pino, and B. Martínez. 2013a. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium* spp. Rev. Protección Veg. 28: 232-235.
- Duarte Y., O. Pino and B. Martínez. 2014. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre hongos asociados al manchado del arroz. Rev. Protección Veg. 29: 62-65.
- Duarte Y., O. Pino, D. Infante, Y. Sánchez, M. del C. Travieso, and B. Martínez. 2013b. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. Rev. Protección Veg. 28: 54-59.
- Li R., J. Yang, Y. Wang, Q. Sun, and H. Hu. 2014. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiinflammatory activities of the stem and leaf essential oils from *Piper flaviflorum* from Xishuangbanna, SW China. Nat. Prod. Commun. 9: 1011-1014.
- Mesa V. A. M., J. F. Toro S, F. Cardona N and S. Blair T. 2012. Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género *Piper*. Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat. 11: 154-162.
- Miranda-Granados J., C. Chacón, N. Ruiz-Lau, M. E. Vargas-Díaz, L. G. Zepeda, P. Alvarez-Gutiérrez, R. Meza-Gordillo, and S. Lagunas-Rivera. 2018. Alternative use of extracts of chipilín leaves (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn) as antimicrobial. Sustainability. 10: 1-7.

CONCLUSIONES

Las técnicas utilizadas en este estudio revelaron rendimientos mayores del aceite esencial y los extractos de *Piper auritum* y *Baccharis glutinosa*. Estos hallazgos sugieren que el efecto inhibitorio presentado por los extractos estudiados y los aceites esenciales en plantas de *P. auritum* y *B. glutinosa* son fungistáticos en *FoC*, *FoT* y *FsC*. Además, el aceite esencial de *P. auritum* fue el que presentó la mayor actividad en los tres hongos fitopatógenos evaluados.

—Fin de la versión en Español—



- Pineda R., S. Vizcaíno, C. García, J. Gil, and D. Durango. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper boltonii* C. Dc. against phytopathogenic fungi. Chil. J. Agr. Res. 72: 507-515.
- Ramírez-Ramírez M. J., N. A. Mancilla-Margalli, L. Meza-Álvarez, R. Turincio-Tádeo, D. Guzmán-de Peña, and M. E. Avila-Miranda. 2017. Epidemiology of *Fusarium* Agave Wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. Plant Protect. Sci. 53: 144-152.
- Rosas-Burgos E., M. Cortez-Rocha, F. Cinco-Moroyoqui, R. Robles-Zepeda, J. López-Cervantes, D. Sánchez-Machado, and F. Lares-Villa. 2009. Antifungal activity *in vitro* of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 2257-2261.
- Rosas-Burgos E., M. Cortez-Rocha, M. Plascencia-Jatomea, F. Cinco-Moroyoqui, R. Robles-Zepeda, J. López-Cervantes, D. Sánchez-Machado, and F. Lares-Villa. 2011. The effect of *Baccharis glutinosa* extract on the growth of mycotoxigenic fungi and fumonisin B1 and aflatoxin B1 production. World J. Microbiol. Biotechnol. 27: 1025-1033.
- Sánchez Y., O. Pino, F. J. Lazo, Y. Abreu, E. Naranjo, and A. Iglesia. 2011. Actividad promisorio de aceites esenciales de especies pertenecientes a la tribu *Pipereae* frente a *Artemia salina* y *Xanthomonas albilineans*. Rev. Protección Veg. 26: 45-51.
- Sharma A., S. Rajendran, A. Srivastava, S. Sharma, and B. Kundu. 2016. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. J. Biosci. Bioeng. 123: 308-313.
- Silva J., P. Souza, F. Monteiro, M. Freitas, M. Silva Júnior, and L. Belan. 2014. Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. Rev. Bras. Pl. Med. 16: 539-544.
- Tangarife-Castaño V., J. B. Correa-Royero, V. C. Roa-Linares, N. Pino-Benitez, L. A. Betancur-Galvis, D. C. Durán, E. E. Stashenko, and A. C. Mesa-Arango. 2014. Antidermatophyte, anti-*Fusarium* and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. J. Essent. Oil Res. 26: 221-227.

CRECIMIENTO DE *Pinus cembroides* ZUCC. EN VIVERO EN DIVERSOS SUSTRATOS Y FERTILIZANTES

NURSERY GROWTH OF *Pinus cembroides* ZUCC. IN DIVERSE SUBSTRATES AND FERTILIZERS

Rosa E. Madrid-Aispuro¹, José Á. Prieto-Ruiz^{2*}, Arnulfo Aldrete³, José C. Hernández-Díaz⁴,
Christian Wehenkel⁴, Jorge A. Chávez-Simental⁴

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango. ²Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango. (jprieto@ujed.mx). ³Ciencias Forestales, Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados 56230. Montecillo, Estado de México. ⁴Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera, Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango.

RESUMEN

Los sustratos a base de aserrín crudo de pino y corteza compostada de pino, con fertilizantes de liberación controlada, son una alternativa para producir planta forestal en vivero. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del sustrato, fertilizante de liberación controlada (FLC) y fertilizante hidrosoluble (FH) en el crecimiento de *Pinus cembroides* Zucc. en vivero. Las mezclas evaluadas fueron corteza compostada de pino (*P. douglasiana* Martínez), aserrín crudo de pino (*P. engelmannii* Carr., *P. cooperi* Blanco y *P. durangensis* Martínez) y turba de musgo (*Sphagnum* sp.): M1 (60:0:40), M2 (35:30:35), M3 (25:50:25), M4 (15:70:15), con tres esquemas de fertilización basados en combinaciones seleccionadas de las dosis 0, 4 y 8 kg m⁻³ de FLC (Multicote®), y 0.0, 0.5 y 1.0 g L⁻¹ de FH (Triple 19° de N, P y K). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 4 x 3. Las variables evaluadas fueron: altura, diámetro, biomasa total, índice de calidad de Dickson, volumen radical (VR) y concentración de N, P y K en el follaje. La mezcla de sustratos y el esquema de fertilización afectaron significativamente (p ≤ 0.0001) las variables estudiadas. Las plantas con altura y biomasa total mayores, fueron las del tratamiento con 4 kg m⁻³ de FLC más 0.5 g L⁻¹ de FH. El diámetro y los VR mayores se obtuvieron con 8 kg m⁻³ de Multicote®. Los valores inferiores, en la mayoría de las variables, ocurrieron cuando se aplicó sólo aserrín crudo de pino y en mezclas con mayor proporción de aserrín. En los tratamientos que contuvieron FLC y FH se obtuvieron plantas con atributos morfológicos mayores, independientemente del sustrato.

ABSTRACT

Substrates based on raw pine sawdust and composted pine bark, with controlled-release fertilizers, are an alternative for producing forest plants in nurseries. The aim of this study was to evaluate the effect of substrate, controlled-release fertilizer (FLC) and water-soluble fertilizer (FH) on the growth of *Pinus cembroides* Zucc. in nursery. The mixtures evaluated were composted pine bark (*P. douglasiana* Martínez), raw pine sawdust (*P. engelmannii* Carr., *P. cooperi* Blanco and *P. durangensis* Martínez) and peat moss (*Sphagnum* sp.): M1 (60:0:40), M2 (35:30:35), M3 (25:50:25), M4 (15:70:15), with three fertilization schemes based on selected combinations of doses 0, 4 and 8 kg m⁻³ of FLC (Multicote®), and 0.0, 0.5 and 1.0 g L⁻¹ of FH (Triple 19° of N, P and K). The experimental design was completely randomized with a 4 x 3 factorial arrangement. The variables evaluated were: height, diameter, total biomass, Dickson's quality index, root volume (VR) and concentration of N, P and K in the foliage. The mixture of substrates and the fertilization scheme significantly affected (p ≤ 0.0001) the variables studied. The seedlings with greater height and total biomass were those treated with 4 kg m⁻³ FLC plus 0.5 g L⁻¹ FH. The largest diameter and VR were obtained with 8 kg m⁻³ of Multicote®. In most variables, the lower values occurred when only raw pine sawdust was applied and in mixtures with a higher proportion of sawdust. In treatments containing FLC and FH, plants with higher morphological attributes were obtained, regardless of the substrate.

Key words: nutrition, sawdust, pine bark, peat, morphology, plant quality.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2018. Aprobado: julio, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 539-554. 2020.

Palabras clave: nutrición, aserrín, corteza de pino, turba, morfología, calidad de planta.

INTRODUCCIÓN

Pinus cembroides Zucc. es el pino piñonero más abundante y con distribución mayor en el sur de EE.UU., norte y centro de México (Martínez, 1948; Luna *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2015). Crece en zonas de transición, entre el matorral xerófilo y los bosques templados (Granados *et al.*, 2015; Rosas *et al.*, 2015), con precipitación anual entre 365 y 450 mm y temperaturas hasta 40 °C (Treviño, 2001; Pompa y Yerena, 2014). La resiliencia que presenta, bajo condiciones de disturbio, lo convierte en una especie viable para reforestaciones en regiones áridas y semiáridas (De los Ríos *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2013; Granados *et al.*, 2015). La semilla se usa con fines alimenticios, por lo cual tiene alta demanda y valor comercial (Perry, 1991; Farjon *et al.*, 1997); además, la madera se aprovecha para obtener leña y para la construcción (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Ante el aumento de la demanda por servicios y productos forestales, la producción de planta en vivero se ha enfocado principalmente a especies nativas; además, el uso de planta de calidad tiene mejores tasas de supervivencia y crecimiento donde se planta (Bautista *et al.*, 2005; Davis y Jacobs, 2005; Carpenedo *et al.*, 2016; Robles *et al.*, 2017). Lo anterior implica desarrollar sistemas de producción innovadores que optimicen los insumos para favorecer la calidad de la planta en vivero, aspectos donde destacan los sustratos y los fertilizantes, los cuales sirven de soporte a las plantas, son el medio a través del cual absorben el agua y proveen los nutrimentos para su crecimiento (Navarro *et al.*, 2013).

Para elegir el sustrato a utilizar se deben considerar aspectos diversos y entre ellos destacan sus características físicas y químicas; además, considerar su costo y disponibilidad (Martínez y Soriano, 2014). En México, los sustratos más utilizados están compuestos por la mitad o más del componente turba de musgo, combinado con vermiculita y agrolita, conocida como mezcla base (Sánchez *et al.*, 2008); sin embargo, con el paso del tiempo el uso de dichos materiales ha disminuido, debido al costo elevado (Maldonado *et al.*, 2011) y a consideraciones medioambientales al obtenerse de bancos de extracción de materiales (Mañas *et al.*, 2009; Buendía *et al.*,

INTRODUCTION

Pinus cembroides Zucc. is the most abundant and widely distributed stone pine in the southern USA, northern and central Mexico (Martínez, 1948; Luna *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2015). It grows in transition areas, between xerophytic scrub and temperate forests (Granados *et al.*, 2015; Rosas *et al.*, 2015), with annual rainfall between 365 and 450 mm and temperatures up to 40 °C (Treviño, 2001; Pompa and Yerena, 2014). Its resilience under disturbance conditions makes it a viable species for reforestation in arid and semi-arid regions (De los Ríos *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2013; Granados *et al.*, 2015). The seed is used for food purposes, which is why it has high demand and commercial value (Perry, 1991; Farjon *et al.*, 1997); in addition, the wood is used for firewood and for construction (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Given the increased demand for forest services and products, nursery plant production has focused mainly on native species; furthermore, the use of quality plants has better survival and growth rates where they are planted (Bautista *et al.*, 2005; Davis and Jacobs, 2005; Carpenedo *et al.*, 2016; Robles *et al.*, 2017). This implies developing innovative production systems that optimize inputs to favor the quality of the plant in nursery, aspects where the substrates and fertilizers, which serve as support for the seedlings, are the means through which they absorb water and provide nutrients for their growth (Navarro *et al.*, 2013).

In order to choose the substrate to be used, various aspects must be considered, including its physical and chemical characteristics, cost and availability (Martínez and Soriano, 2014). In Mexico, the most commonly used substrates are composed of half or more of the peat moss component, combined with vermiculite and agrolite, known as base mix (Sánchez *et al.*, 2008). However, over time the use of these materials has decreased, due to the high cost (Maldonado *et al.*, 2011) and environmental considerations when obtained from material extraction banks (Mañas *et al.*, 2009; Buendía *et al.*, 2016). Sawdust and pine bark are materials that can be used as part of the substrate because they have successful results in the production of *P. montezumae* Lamb. (Hernández *et al.*, 2014; Aguilera *et al.*, 2016a), *P. greggii* var. *australis* (Castro *et al.*, 2018)

2016). El aserrín y la corteza de pino son materiales que pueden utilizarse como parte del sustrato porque han tenido resultados exitosos en la producción de planta de *P. montezumae* Lamb. (Hernández *et al.*, 2014; Aguilera *et al.*, 2016a), *P. greggii* var. *australis* (Castro *et al.*, 2018) y *P. cooperi* Blanco (González *et al.*, 2018); en particular, el aserrín se proyecta como una alternativa viable por su abundancia y creciente producción a largo plazo (Isogis Corp, 2010).

Después del riego, la fertilización es la práctica cultural más importante en los viveros forestales (Bustos *et al.*, 2008), porque influye en el crecimiento de las partes aérea y radical de la planta (Navarro *et al.*, 2013). Cada especie responde de manera diferente a la adición de nutrientes (Escamilla *et al.*, 2015), y su eficiencia depende del tipo de fertilizante y dosis aplicadas. De acuerdo con Rose *et al.* (2004) y Bustos *et al.* (2008), el uso de fertilizantes de liberación controlada en forma de gránulos, incorporados durante la preparación del sustrato con diferentes formulaciones de nitrógeno, fósforo y potasio (N, P y K) y tiempos de liberación, mejora la eficiencia del proceso de nutrición. Estos productos presentan ventajas con respecto a los fertilizantes hidrosolubles por la forma de suministrar nutrientes a una tasa que coincida con la demanda de la planta, de tal forma que el N asimilable por las plantas se libera lentamente, en períodos de tiempo prolongados y minimiza las pérdidas por lixiviación.

Debido a la importancia del sustrato y la fertilización en la calidad de planta, la hipótesis de este estudio fue que al menos una mezcla de sustratos en combinación con esquemas de fertilización, favorece el crecimiento morfológico de las plantas. El objetivo fue evaluar el efecto de cuatro mezclas de sustrato, a base de aserrín crudo de pino, corteza compostada de pino y turba de musgo, y de tres esquemas de fertilización, con un nivel mínimo, un medio y un máximo, en el crecimiento de *P. cembroides* Zucc. en vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se realizó en el vivero forestal "General Francisco Villa", en el ejido 15 de Septiembre, municipio de Durango,

and *P. cooperi* Blanco (González *et al.*, 2018); in particular, sawdust is projected as a viable alternative because of its abundance and growing production in the long term (Isogis Corp, 2010).

After irrigation, fertilization is the most important cultural practice in forest nurseries (Bustos *et al.*, 2008), because it influences the growth of the plant, both of its aerial and root parts (Navarro *et al.*, 2013). Each species responds differently to the addition of nutrients (Escamilla *et al.*, 2015), and its efficiency depends on the type of fertilizer and dosage applied. According to Rose *et al.* (2004) and Bustos *et al.* (2008), the use of controlled-release fertilizers in the form of granules incorporated during the preparation of the substrate with different formulations of nitrogen, phosphorus and potassium (N, P and K) and release times, improves the efficiency of the nutrition process. These products have advantages over water-soluble fertilizers because they supply nutrients at a rate that coincides with plant demand, so that the nitrogen that can be assimilated by the plants is released slowly, over long periods of time, and leaching losses are minimized.

Due to the importance of substrate and fertilization in plant quality, the hypothesis of this study was that at least a mixture of substrates in combination with fertilization schemes, favors the morphological growth of the seedlings. The objective was to evaluate the effect of four substrate mixtures, based on raw pine sawdust, composted pine bark and peat moss, and three fertilization schemes, with a minimum, a medium and a maximum level, on the growth of *P. cembroides* Zucc. in nursery.

MATERIALS AND METHODS

Area of study

The study was conducted at the "General Francisco Villa" forest nursery, at the 15 de Septiembre ejido, municipality of Durango, Durango, Mexico (23° 58' 20.38" N, 104° 35' 55.83" W and 1875 masl). The plant was produced in a greenhouse covered with 720 caliber polyethylene plastic, treated against ultraviolet rays and with shade cloth at 70%; inside, average minimum temperatures of 3 °C and maximum temperatures of 40 °C were recorded, while the average relative humidity was 70%. The average light intensity was 370 klx.

Durango, México (23° 58' 20.38" N, 104° 35' 55.83" O y 1 875 msnm). La planta se produjo en un invernadero cubierto con plástico de polietileno calibre 720, tratado contra rayos ultravioleta y con malla sombra al 70%; al interior se registraron temperaturas promedio mínimas de 3 °C y máximas de 40 °C, mientras que la humedad relativa promedio fue 70%. La intensidad de luz promedio fue 370 klx.

Producción de planta

Siembra

Ante la carencia de rodales semilleros establecidos, la semilla se recolectó en un rodal natural, en el municipio de Durango. Para uniformizar y acelerar el inicio de la germinación, las semillas se pusieron en remojo 24 h en agua a 25 °C y se desinfectaron 10 min en una solución con 90% de agua y 10% de cloro comercial. Después se colocaron en papel absorbente y una vez semisecas, la testa se impregnó con fungicida Tecto®60 (Tia-bendazol: 2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol) para evitar daños por *Damping off* (Prieto *et al.*, 2009). La siembra en almácigo se hizo en una mezcla de corteza compostada de pino y turba de musgo (50:50), sustrato común en esas proporciones en el norte de México, tanto para reproducir planta en almácigo como en envase (González *et al.*, 2018). Cuatro semanas después, 4620 plántulas se trasplantaron en charola de poliestireno de 77 cavidades con capacidad de 170 mL por cavidad.

Sustratos

Los materiales evaluados fueron corteza compostada de pino (*P. douglasiana*) (CC), aserrín crudo de pino (*P. engelmannii*, *P. cooperi* y *P. durangensis*) (AS) y turba de musgo (*Sphagnum* sp.) (TM); los dos primeros son materiales de uso amplio en los viveros forestales de México, al estar disponibles en abundancia y de costo bajo; además, mezclados poseen las características físicas de porosidad para utilizarse como sustratos (Aguilera *et al.*, 2016b). Con esos materiales se prepararon cuatro mezclas con cuatro proporciones de CC, AS y TM: M1) 60:0:40, M2) 35:30:35, M3) 25:50:25, y M4) 15:70:15; la mezcla M1 fue tratamiento testigo porque se usa en viveros. El porcentaje de los materiales evaluados se definió con base en experiencias previas en otras especies del género *Pinus*, y se cuidó que cumplieran con los criterios de porosidad total, porosidad de aireación y capacidad de retención de humedad recomendados por Landis (1990).

Fertilizante

El fertilizante fue de liberación controlada Multicote 8° (18-06-12, N-P-K), en dosis de 0, 4 y 8 kg m⁻³, usados en la producción

Seedling production

Seeding

Due to the lack of established seed areas, the seed was collected in a natural area, in the municipality of Durango. In order to standardize and accelerate the start of germination, the seeds were soaked 24 h in water at 25 °C and disinfected 10 min in a solution with 90% water and 10% commercial chlorine. They were then placed on absorbent paper and once semi-dry, the seed coat was impregnated with Tecto®60 fungicide (Thiabendazole: 2-(4-tiazolyl)-1H-benzimidazole) to avoid damage by *Damping off* (Prieto *et al.*, 2009). The sowing in seedbed was done in a mixture of composted pine bark and peat moss (50:50), a common substrate with those proportions in northern Mexico, both to reproduce the seedling in seedbed and container (González *et al.*, 2018). Four weeks later, 4620 seedlings were transplanted into a 77-cavity polystyrene tray with a capacity of 170 mL per cavity.

Substrates

The materials evaluated were composted pine bark (*P. douglasiana*) (CC), raw pine sawdust (*P. engelmannii*, *P. cooperi* and *P. durangensis*) (AS) and peat moss (*Sphagnum* sp.) (TM); the first two are materials widely used in forest nurseries in Mexico, as they are available in abundance and at low cost; besides, when mixed, they have the physical characteristics of porosity to be used as substrates (Aguilera *et al.*, 2016b). With these materials, four mixtures were prepared with four proportions of CC, AS and TM: M1) 60:0:40; M2) 35:30:35; M3) 25:50:25; and M4) 15:70:15; the M1 mixture was a control treatment because it is used in nurseries. The percentage of materials evaluated was defined based on previous experiences in other species of the *Pinus* genus, and care was taken to ensure that they met the criteria of total porosity, aeration porosity, and moisture retention capacity recommended by Landis (1990).

Fertilizer

The fertilizer was controlled-release Multicote 8° (18-06-12, N-P-K), in doses of 0, 4 and 8 kg m⁻³, used in forest nursery production (Prieto *et al.*, 2009). As they are granulated products, it is necessary to incorporate them during the preparation of the substrate mixtures (Rose *et al.*, 2004). Two months later, based on Landis (1989), the nutrition was complemented with the water-soluble fertilizer (FH) Ultrasol® (19-19-19 of N, P and K) in doses of 0.0, 0.5 and 1.0 g L⁻¹. The fertilization schemes were three combinations of Multicote® and Triple 19° (F1: 8 kg m⁻³ Multicote® + 0.0 g L⁻¹ Triple 19°, F2: 0.0 kg m⁻³ Multicote® + 1.0 g

de planta forestal (Prieto *et al.*, 2009). Al ser productos granulados, es necesario incorporarlos durante la preparación de las mezclas de los sustratos (Rose *et al.*, 2004). Dos meses después, con base en Landis (1989), la nutrición se complementó con el fertilizante hidrosoluble Ultrasol® (19-19-19 de N, P y K) en dosis de 0.0, 0.5 y 1.0 g L⁻¹. Los esquemas de fertilización fueron tres combinaciones de Multicote® y Triple 19® (F1: 8 kg m⁻³ Multicote® + 0.0 g L⁻¹ Triple 19®, F2: 0.0 kg m⁻³ Multicote® + 1.0 g L⁻¹ Triple 19® y F3: 4 kg m⁻³ Multicote® + 0.5 g L⁻¹ Triple 19®). Los FH se aplicaron disueltos en el agua de riego. La humedad se monitoreó mediante el pesaje de una muestra de charolas, y si descendía hasta 75% con respecto al peso de saturación, se regaba a capacidad de campo con una regadera manual de 8 L.

Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 4 x 3 (cuatro sustratos y tres esquemas de fertilización) y el modelo fue: $Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$, donde: A es el factor sustrato, B el factor esquema de fertilización y AB la interacción de ambos ($\alpha=0.05$). Los tratamientos fueron 12, derivados de la combinación de cuatro mezclas de sustratos y tres esquemas de fertilización: fertilizante de liberación controlada, fertilizante hidrosoluble y la combinación de ambos (Cuadro 1); cada tratamiento se replicó cinco veces. La unidad experimental fue una charola de 77 plantas y hubo cinco charolas de cada tratamiento y 60 charolas en total, pero debido al efecto de orilla sólo las 45 plantas centrales se consideraron susceptibles de

L⁻¹ Triple 19® and F3: 4 kg m⁻³ Multicote® + 0.5 g L⁻¹ Triple 19®). The FHs were applied dissolved in the irrigation water. Moisture was monitored by weighing a sample of tray, and if it dropped to 75% of the saturation weight, it was irrigated at field capacity with an 8 L hand shower.

Experimental design and treatments

The experimental design was completely randomized with a 4 x 3 factorial arrangement (four substrates and three fertilization schemes) and the model was $Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$, where: A is the substrate factor, B the fertilization scheme factor and AB the interaction of both ($\alpha=0.05$). There were 12 treatments derived from the combination of four substrate mixtures and three fertilization schemes: controlled-release fertilizer, water-soluble fertilizer and the combination of both (Table 1); each treatment was replicated five times. The experimental unit was a 77-plant tray and there were five trays of each treatment and 60 trays in total, but due to the sideways effect only 45 central plants were considered for evaluation. Seedlings were in production for 14 months (August 26, 2016 to October 27, 2017).

Variables evaluated

Seedling sampling and morphologic evaluation

After 14 months of growth, 12 seedlings were randomly extracted from the central part of each tray (60 individuals

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en la producción de planta de *P. cembroides* Zucc. en vivero.
Table 1. Treatments evaluated in the production of *P. cembroides* Zucc. plant in nursery.

T	S	Sustrato			EF	Esquema de fertilización		
		CC (%)	AS (%)	TM (%)		Multicote® (kg m ⁻³)	Triple 19® (g L ⁻¹)	
T1	M1	60	0	40	F1	8	+	0.0
T2	M1	60	0	40	F2	0	+	1.0
T3	M1	60	0	40	F3	4	+	0.5
T4	M2	35	30	35	F1	8	+	0.0
T5	M2	35	30	35	F2	0	+	1.0
T6	M2	35	30	35	F3	4	+	0.5
T7	M3	25	50	25	F1	8	+	0.0
T8	M3	25	50	25	F2	0	+	1.0
T9	M3	25	50	25	F3	4	+	0.5
T10	M4	15	70	15	F1	8	+	0.0
T11	M4	15	70	15	F2	0	+	1.0
T12	M4	15	70	15	F3	4	+	0.5

T: Tratamiento; S: Sustrato; CC: Corteza compostada de pino; AS: Aserrín crudo de pino; TM: Turba de musgo; EF: Esquema de fertilización ♦ x

x

evaluación. La planta se produjo durante 14 meses (26 agosto de 2016 a 27 de octubre de 2017).

Variables evaluadas

Muestreo y evaluación morfológica de las plantas

Después de 14 meses de crecimiento, se extrajeron en forma aleatoria 12 plantas de la parte central de cada charola (60 individuos por tratamiento). En cada planta se retiró el sustrato mediante un lavado con agua. En la evaluación se midió altura, desde la base del tallo hasta la yema apical (regla graduada modelo PILOT®), diámetro del cuello de la raíz (vernier digital Mitutoyo® modelo CD-6" [AXR]), biomasa aérea, radical y total. Para evaluar la biomasa, la raíz se separó del tallo, ambas partes se colocaron en bolsas de papel de estraza y se secaron en un horno (marca Felisa® modelo FE-291D) a 70 °C por 72 h, una vez que se obtuvo peso constante. Después, en una balanza analítica (Ohaus® modelo PA1502 con una precisión de 0.001 g) se registraron los pesos secos y se calculó el índice de calidad de Dickson (ICD) (Dickson *et al.*, 1960):

$$ICD = \frac{\text{Peso seco total (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}}$$

El volumen de la raíz se determinó con base en el principio de Arquímedes (Harrington *et al.*, 1994), con una balanza analítica (VELAB™ modelo VE-5000, con una precisión de 0.01 g) y un vaso de precipitado con agua arriba de la báscula. Las raíces se sumergieron en el agua, sin tocar las paredes del vaso, lo que permitió registrar el aumento de peso (g), que equivale al volumen de la raíz (mL).

Concentración nutricional foliar

Para cuantificar la concentración de N, P y K en follaje, de la sección media de cada planta se extrajeron acículas hasta completar 5 g por repetición (tres repeticiones por tratamiento), y se colocaron en bolsas de papel estraza. Los análisis se realizaron en el laboratorio del CENID-RASPA del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. La concentración de nitrógeno se determinó por el método Micro-Kjeldahl, la concentración de fósforo mediante fotocolorimetría por reducción con Vanadato-Molibdato y el potasio con la lectura directa del digestado en un espectrómetro de absorción atómica (SEMARNAT, 2002).

per treatment). In each seedling the substrate was removed by washing with water. In the evaluation, height was measured from the base of the stem to the apical bud (graduated ruler, model PILOT®), root collar diameter (digital vernier Mitutoyo® model CD-6" [AXR]), as well as aerial, root and total biomass. To evaluate the biomass, the root was separated from the stem, both parts were placed in brown paper bags and dried in an oven (Felisa® brand, model FE-291D) at 70 °C for 72 hours, once constant weight was obtained. Afterwards, the dry weights were recorded on an analytical balance (Ohaus® model PA1502 with an accuracy of 0.001 g) and the Dickson Quality Index (ICD) was calculated (Dickson *et al.*, 1960):

$$ICD = \frac{\text{Peso seco total (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}}$$

Root volume was determined based on the Archimedes' principle (Harrington *et al.*, 1994), with an analytical balance (VELAB™ model VE-5000, with an accuracy of 0.01 g) and a beaker with water above the scale. The roots were immersed in the water, without touching the walls of the beaker, which allowed recording the weight increase (g), which is equivalent to the root volume (mL).

Foliar nutrient concentration

To quantify the concentration of N, P and K in foliage, needles were extracted from the middle section of each seedling until completing 5 g per replicate (three replicates per treatment) and placed in brown paper bags. The analyses were carried out in the CENID-RASPA laboratory of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research. The concentration of nitrogen was determined by the Micro-Kjeldahl method, the concentration of phosphorus by means of reduction photochlorimetry with Vanadate-Molybdate and the potassium with the direct reading of the digestate in an atomic absorption spectrometer (SEMARNAT, 2002).

Statistical analysis

For morphological variables, analyses of variance were performed with the SAS ANOVA procedure, version 9.2 (SAS Institute, 2009); in cases with significant differences between treatments, the Tukey's test ($p \leq 0.05$) was used for comparison of means. The effect of fertilization treatments on the nutritional status of plants was evaluated using an ANOVA.

Análisis estadístico

Para las variables morfológicas se realizaron análisis de varianza con el procedimiento ANOVA de SAS versión 9.2 (SAS Institute, 2009); en los casos con diferencias significativas entre tratamientos se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias. El efecto de los tratamientos de fertilización sobre el estado nutrimental de las plantas se evaluó mediante un ANDEVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estándares morfológicos de calidad de planta

Las mezclas de sustratos y el esquema de fertilización utilizados influyeron ($p \leq 0.05$) en la morfología de las plantas. Además, la interacción de sustratos x esquema de fertilización tuvo efecto significativo ($p \leq 0.0001$) en las variables evaluadas (Cuadro 2).

Los valores mayores de todas las variables se encontraron en los sustratos con proporciones de 50% o menos de aserrín en la mezcla (M1:60:0:40, M2:35:30:35 y M3:25:50:25 de CC:AS:TM, respectivamente) (Cuadro 3). En estas tres mezclas, el Multicote® en dosis de $4 \text{ kg m}^{-3} + 0.5 \text{ g L}^{-1}$ de Triple 19® tuvo mayor efecto en el incremento de la altura y la acumulación de biomasa total de las plantas, mientras que el crecimiento en diámetro y volumen radical fue mayor (3.4 a 4.2 mm y 2.2 a 2.7 mL, respectivamente) cuando sólo se utilizó Multicote®. El tratamiento 9, que es la mezcla M3:25:50:25 con 4 kg m^{-3} de Multicote® + 0.5 g L^{-1} de Triple 19®, produjo una mayor altura (17.1 cm) y más biomasa

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological standards of seedling quality

The mixtures of substrates and the fertilization scheme used influenced ($p \leq 0.05$) the morphology of the plants. In addition, the interaction of substrates x fertilization scheme had a significant effect ($p \leq 0.0001$) on the variables evaluated (Table 2).

The highest values of all variables were found on substrates with proportions of 50% or less sawdust in the mixture (M1:60:0:40, M2:35:30:35 and M3:25:50:25 of CC:AS:TM, respectively) (Table 3). In these three mixtures, Multicote® at a dose of $4 \text{ kg m}^{-3} + 0.5 \text{ g L}^{-1}$ of Triple 19® had a greater effect on height increase and total plant biomass accumulation, while growth in diameter and root volume was greater (3.4 to 4.2 mm and 2.2 to 2.7 mL, respectively) when only Multicote® was used. Treatment 9, which is the mixture M3:25:50:25 with 4 kg m^{-3} of Multicote® + 0.5 g L^{-1} of Triple 19®, produced a greater height (17.1 cm) and more total biomass (3.1 g); whereas treatments 10 and 11, with the mixture M4:15:70:15 with 8 kg m^{-3} of Multicote® and 1.0 g L^{-1} of Triple 19®, obtained the lowest values (12.6 and 13.4 cm in height; 2.2 and 2.0 mL in biomass, respectively) (Table 3, Figure 1A, B, C and D). Treatments 10, 11 and 12 are characterized because the substrate contains the highest percentage of sawdust.

In the fertilization scheme factor the values of height and total biomass increased from 15.3 to 17.1 cm and 2.6 to 3.1 g (treatments 3, 6, 9 and 12) with the

Cuadro 2. Valores de p en los análisis de varianza para las variables evaluadas, en respuesta a cuatro sustratos y tres esquemas de fertilización en el crecimiento de *P. cembroides* Zucc. en vivero.

Table 2. P values in the analysis of variance for the variables evaluated, in response to four substrates and three fertilization schemes in the growth of *P. cembroides* Zucc. in nursery.

Variables	Sustrato	Análisis de varianza	
		Esquema de fertilización	Sustrato x Esquema de fertilización
Altura (cm)	0.0001	0.0001	0.0001
Diámetro (mm)	0.0001	0.0005	0.0001
Biomasa total (BT) (g)	0.0001	0.0001	0.0001
Índice de calidad de Dickson	0.0001	0.0025	0.0001
Volumen radical (mL)	0.0001	0.0001	0.0001

Cuadro 3. Valores promedio de variables morfológicas de calidad en *P. cembroides* Zucc. en vivero a los 14 meses.
Table 3. Average values of morphological quality variables in *P. cembroides* Zucc. in nursery at 14 months.

T†	Sustrato	Fertilizante	Altura (cm)	Diámetro (mm)	BT (g)	VR (mL)	ICD
T1	M1	F1	15.6±0.3 abcd	4.2±0.1 a	2.7±0.1 ab	2.5±0.1 abc	0.41±0 a
T2	M1	F2	16.5±0.4 abc	3.9±0.1 abc	2.9±0.1 ab	2.1±0.1 cd	0.39±0 a
T3	M1	F3	16.7±0.4 ab	3.9±0.1 abc	2.7±0.1 ab	2.1±0.1 cd	0.36±0 a
T4	M2	F1	15.0±0.3 de	4.1±0.1 ab	2.5±0.1 bc	2.6±0.1 ab	0.39±0 a
T5	M2	F2	15.0±0.3 de	3.7±0.1 cde	2.7±0.1 ab	2.0±0.1 de	0.35±0 ab
T6	M2	F3	17.0±0.3 a	3.9±0.1 abc	2.9±0.1 ab	2.2±0.1 bcd	0.38±0 a
T7	M3	F1	13.6±0.3 efg	4.0±0.1 ab	2.5±0.1 bc	2.7±0.1 a	0.41±0 a
T8	M3	F2	14.2±0.3 def	3.7±0.1 cde	2.8±0.1 ab	1.9±0.1 de	0.37±0 a
T9	M3	F3	17.1±0.4 a	4.0±0.1 ab	3.1±0.1 a	2.2±0.1 bcd	0.40±0 a
T10	M4	F1	12.6±0.3 g	3.4±0.1 e	2.2±0.1 cd	2.2±0.1 bcd	0.34±0 ab
T11	M4	F2	13.4±0.3 fg	3.4±0.1 e	2.0±0.1 d	1.6±0.1 e	0.27±0 b
T12	M4	F3	15.3±0.3 bcd	3.7±0.1 cde	2.6±0.1 bc	2.0±0.1 de	0.34±0 ab

†T: Tratamiento; M1 (60% corteza compostada de pino y 40% de turba de musgo), M2 (35% corteza compostada de pino, 30% aserrín crudo de pino, 35% turba de musgo), M3 (25 % corteza compostada de pino, 50% aserrín crudo de pino, 25% turba de musgo), M4 (15% corteza compostada de pino, 70% aserrín crudo de pino, 15% turba de musgo). F1) 8 kg m⁻³ Multicote® + 0.0 g L⁻¹ Triple 19®; F2) 0.0 kg m⁻³ Multicote® + 1.0 g L⁻¹ Triple 19®; F3) 4 kg m⁻³ Multicote® + 0.5 g L⁻¹ Triple 19®. BT: Biomasa total; ICD: Índice de Calidad de Dickson; VR: Volumen radical. Valores promedio ± error estándar. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas (Tukey, p≤0.05) ♦ †T: Treatment. M1: 60% composted pine bark, 40% peat moss; M2: 35% composted pine bark, 30% raw pine sawdust, 35% peat moss; M3: 25% composted pine bark, 50% raw pine sawdust, 25% peat moss; M4: 15% composted pine bark, 70% raw pine sawdust, 15% peat moss). F1: 8 kg m⁻³ Multicote® + 0.0 g L⁻¹ Triple 19®; F2: 0.0 kg m⁻³ Multicote® + 1.0 g L⁻¹ Triple 19®; F3: 4 kg m⁻³ Multicote® + 0.5 g L⁻¹ Triple 19®. BT: Total Biomass; VR: Root Volume; ICD: Dickson Quality Index. Average values ± standard error. Different letters in a column indicate significant differences (Tukey, p≤0.05).

total (3.1 g); en tanto, los tratamientos 10 y 11, con la mezcla M4:15:70:15 con 8 kg m⁻³ de Multicote® y 1.0 g L⁻¹ de Triple 19®, obtuvieron los valores menores (12.6 y 13.4 cm en altura; 2.2 y 2.0 mL en biomasa, respectivamente) (Cuadro 3, Figura 1A, B, C y D). Los tratamientos 10, 11 y 12 se caracterizan porque el sustrato contiene el mayor porcentaje de aserrín.

En el factor esquema de fertilización los valores de altura y biomasa total aumentaron de 15.3 a 17.1 cm y 2.6 a 3.1 g (tratamientos 3, 6, 9 y 12) con la combinación de 4 kg m⁻³ de Multicote® + 0.5 g L⁻¹ de Triple 19®, independientemente de la mezcla de sustratos utilizada. En cambio, en la variable diámetro sobresalieron los tratamientos 1, 4, 7 y 9 (4.2, 4.1, 4.0 y 4.0, respectivamente), asociados con la dosis de 8 kg m⁻³ de Multicote®, excepto el tratamiento 9 formado por la combinación de ambos fertilizantes (Figura 1A, B y C; Cuadro 3).

La combinación de fertilizante de liberación controlada (en dosis de 4 u 8 kg m⁻³) y fertilizante

combination of 4 kg m⁻³ of Multicote® + 0.5 g L⁻¹ of Triple 19®, and regardless of the mixture of substrates used. In contrast, in the diameter variable treatments 1, 4, 7 and 9 (4.2, 4.1, 4.0 and 4.0, respectively) stood out, associated with the 8 kg m⁻³ dose of Multicote®, except for treatment 9 formed by the combination of both fertilizers (Figure 1A, B and C, Table 3).

The combination of controlled-release fertilizer (at a dose of 4 or 8 kg m⁻³) and water-soluble fertilizer, compared to the application of only 1.0 g L⁻¹ of FH, resulted in higher values by providing a permanent supply of nutrients during most of the production stage (14 months), which translated into plants with similar morphological characteristics.

Haase *et al.* (2006) applied controlled-release fertilizer on *Pseudotsuga menziesii*, with better results in height, diameter and stem volume, with increases of 19, 21 and 73%, compared to the plant fed with conventional soluble fertilizer. In our study, with the addition of 8 kg m⁻³ of Multicote® fertilizer the root volume was 41% (T7) higher than the treatment

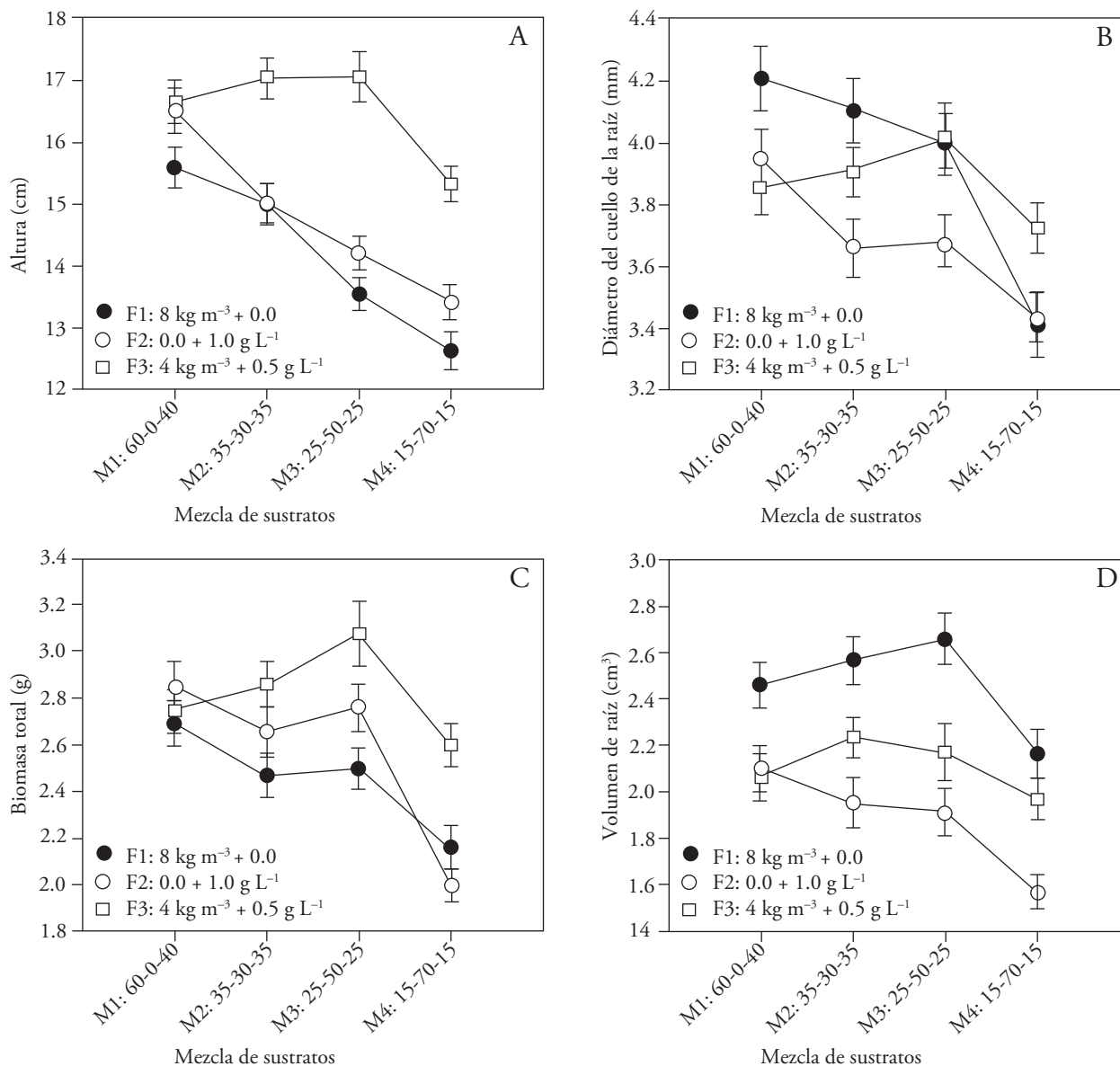


Figura 1. Interacción entre los sustratos y esquemas de fertilización para las variables altura (A), diámetro del cuello de la raíz (B), biomasa total (C) y volumen de raíz (D) en el crecimiento de *P. cembroides* en vivero. Mezcla de sustrato: corteza compostada de pino (CC)-Aserrín crudo de pino (AS)-Turba de musgo (TM).

Figure 1. Interaction between substrates and fertilization schemes for the variables height (A), root collar diameter (B), total biomass (C) and root volume (D) in the growth of *P. cembroides* in nursery. Mixture of substrate: composted pine bark (CC)-Raw pine sawdust (AS)-Peat moss (TM).

hidrosoluble, en comparación con la aplicación de sólo 1.0 g L⁻¹ de FH, originó valores más altos al proporcionar un suministro permanente de nutrientes durante la mayor parte de la etapa de producción (14 meses), lo cual se tradujo en plantas con características morfológicas similares.

11 in which only water-soluble fertilizer was applied (1.0 g L⁻¹ Triple 19®) (Figure 1D, Table 3). This finding is important because seedlings with abundant root systems have a greater capacity to grow quickly after planting in the field (Haase, 2011), which happens because the capacity to absorb

Haase *et al.* (2006) aplicaron fertilizante de liberación controlada en *Pseudotsuga menziesii* y hubo aumentos de 19% en altura, 21% en diámetro y 73% en volumen del tallo, con respecto a la planta nutrida con fertilizante soluble convencional. En nuestro estudio, con la adición de 8 kg m⁻³ de fertilizante Multicote® el volumen de raíz fue superior en 41% (T7) respecto al tratamiento 11 en el cual sólo se aplicó fertilizante hidrosoluble (1.0 g L⁻¹ Triple 19®) (Figura 1D, Cuadro 3). Este hallazgo es importante porque las plantas con sistema radical abundante tienen mayor capacidad para crecer rápido después de plantadas en campo (Haase, 2011), lo cual sucede porque aumenta la capacidad para absorber agua y nutrimentos y se reduce el estrés después del plantado (Fu *et al.*, 2017).

Oliet *et al.* (2009) aplicaron fertilizante de liberación controlada en *P. halepensis* Mill. en vivero, con formulaciones de 9-13-18 y 17-10-10 de N-P-K, en dosis de 3, 5 y 7 g L⁻¹ de sustrato; con la dosis superior del primer producto se lograron plantas más grandes y con mayor concentración de nutrimentos, y después de siete años las mismas plantas presentaron mayor supervivencia en campo (79%), respecto al testigo (42%). Asimismo, Bautista *et al.* (2018) evaluaron en *P. greggii* Engelm. el efecto de 6 kg m⁻³ de fertilizante de liberación controlada (Osmocote®), combinado con fertilizantes hidrosolubles (Triple 19®, Poly-feed® y Peters professional®) en dosis fija (200 ppm) y dosis exponencial (100, 200 y 300 ppm). Los mejores resultados en altura, diámetro, biomasa aérea y total, se obtuvieron con Triple 19® en dosis fija y exponencial; además, fue la opción más económica respecto a los otros fertilizantes hidrosolubles. El esquema de fertilización adecuado depende de factores como el tipo y frecuencia de riego, las características del sustrato, la tasa de liberación de nutrimentos y la eficiencia de uso por la planta, así como los costos (Landis, 1989).

En la producción de diversas especies en vivero se ha utilizado aserrín como parte del sustrato, con resultados exitosos en la calidad de planta de *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Reyes *et al.*, 2005), *P. montezumae* Lamb. (Hernández *et al.* 2014) y *P. cooperi* Blanco (González *et al.*, 2018). Asimismo, Aguilera *et al.* (2016a) en *P. montezumae* Lamb. obtuvieron las mejores características físicas con un sustrato de 70% de aserrín de pino compostado + 15% de corteza compostada de pino + 15% de vermiculita, y se

water and nutrients is increased and stress is reduced after planting (Fu *et al.*, 2017).

Oliet *et al.* (2009) applied controlled-release fertilizer on *P. halepensis* Mill. in nursery, with formulations of 9-13-18 and 17-10-10 of N-P-K, at doses of 3, 5 and 7 g L⁻¹ of substrate; with the higher dose of the first product, larger seedlings with higher nutrient concentration were achieved, and after seven years the same plants showed higher field survival (79%), compared to the control (42%). Likewise, Bautista *et al.* (2018) evaluated in *P. greggii* Engelm. the effect of 6 kg m⁻³ of controlled-release fertilizer (Osmocote®), combined with water-soluble fertilizers (Triple 19®, Poly-feed® and Peters professional®) in fixed dose (200 ppm) and exponential dose (100, 200 and 300 ppm). The best results in height, diameter, aerial and total biomass were obtained with Triple 19® in fixed and exponential dose; moreover, it was the most economical option compared to the other water-soluble fertilizers. The appropriate fertilization scheme depends on factors such as type and irrigation frequency, substrate characteristics, nutrient release rate and plant use efficiency, as well as costs (Landis, 1989).

Sawdust was used as part of the substrate in the production of various species in nursery, with successful results in the seedling quality of *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Reyes *et al.*, 2005), *P. montezumae* Lamb. (Hernández *et al.*, 2014) and *P. cooperi* Blanco (González *et al.*, 2018). Likewise, Aguilera *et al.* (2016a) obtained the best physical characteristics in *P. montezumae* Lamb. with a substrate of 70% composted pine sawdust + 15% composted pine bark + 15% vermiculite, and the cost per plant was reduced up to 50%, compared to the substrate based on peat moss, perlite and vermiculite (60:20:20). Similarly, González *et al.* (2018) in *P. cooperi* Blanco, in a substrate of 30% peat + 20% bark + 50% sawdust with 8 g L⁻¹ of Multicote®, obtained adequate values in height, root biomass and Dickson's quality index; in addition, production costs attributable to the substrate were reduced by 40% in relation to the substrate with peat (46%) and bark (54%). This indicates that the use of substrates based on sawdust and bark mixed with peat is an alternative for producing forest seedlings.

Castro *et al.* (2018) produced *P. greggii* var. *australis* on substrates based on fresh pine sawdust, composted pine bark and peat moss, in ratios of 3:1:1, achieving

redujo el costo por planta hasta 50%, comparado con el sustrato a base de turba de musgo, perlita y vermiculita (60:20:20). De manera similar, González *et al.* (2018) en *P. cooperi* Blanco, en un sustrato de 30% turba + 20% corteza + 50% aserrín con 8 g L⁻¹ de Multicote®, obtuvieron valores adecuados en altura, biomasa de la raíz e índice de calidad de Dickson; además, los costos de producción atribuibles al sustrato se redujeron 40% con relación al sustrato con turba (46%) y corteza (54%). Lo anterior indica que el uso de sustratos a base de aserrín y corteza, mezclados con turba, es una alternativa para producir planta forestal.

Castro *et al.* (2018) produjeron *P. greggii* var. *australis* en sustratos a base aserrín de pino fresco, corteza compostada de pino y turba de musgo, en proporciones de 3:1:1, y lograron las características morfológicas recomendadas en la Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales NMX-AA-170-SCFI-2016 (SE, 2016). En este caso, las plantas que crecieron en sustratos con aserrín al 70% tuvieron menor altura y diámetro (13.8 cm y 3.5 mm, respectivamente). Esos resultados también difieren con lo reportado por Reyes *et al.* (2005) en *P. pseudostrobus* var. *apulcensis*, con mayor altura y diámetro en las plantas desarrolladas en la mezcla de sustrato con 80% aserrín + 20% turba, a la cual se añadieron 5 kg m⁻³ de fertilizante de liberación controlada Multicote® (18-6-12 de N, P y K).

La combinación de los sustratos y esquemas de fertilización fue favorable en nuestro estudio, porque en ocho de los 12 tratamientos se produjo planta con altura media de 15.0 a 17.1 cm, que está en los intervalos establecidos por la NMX-AA-170-SCFI-2016 (SE, 2016) para *P. cembroides* de una altura mínima de 15 cm. Las plantas con altura mayor tienen ventaja en sitios con competencia vegetal, sobre todo donde varía la composición de nutrimentos y contenido de humedad (Haase *et al.*, 2006). Ivetić y Devetaković (2016) también señalan una correlación positiva entre la altura inicial de las plantas y el crecimiento después de la plantación.

Grossnickle (2012) menciona que plantas con mayor diámetro inicial tendrán mejor crecimiento a largo plazo una vez establecidas en campo. En nuestra investigación el diámetro tuvo un rango de 3.4 a 4.2 mm y, de acuerdo con Rueda *et al.*

the morphological characteristics recommended in the Mexican Standard for the Certification of Forest Nursery Operations NMX-AA-170-SCFI-2016 (SE, 2016). In this case, the plants that grew in substrates with 70% sawdust had minor height and diameter (13.8 cm and 3.5 mm, respectively). These results also differ from those reported by Reyes *et al.* (2005) in *P. pseudostrobus* var. *apulcensis*, with greater height and diameter in the plants developed in the substrate mixture with 80% sawdust + 20% peat, to which 5 kg m⁻³ of Multicote® controlled-release fertilizer (18-6-12 of N, P and K) was added.

The combination of substrates and fertilization schemes was favorable in our study, since in eight of the 12 treatments seedlings with an average height of 15.0 to 17.1 cm were produced, which is in the intervals established by the NMX-AA-170-SCFI-2016 (SE, 2016), for *P. cembroides* with a minimum height of 15 cm. Plants with greater height have an advantage in sites with plant competition, especially where nutrient composition and moisture content vary (Haase *et al.*, 2006). Ivetić and Devetaković (2016) also point to a positive correlation between initial seedling height and growth after planting.

Grossnickle (2012) mentions that plants with a larger initial diameter will have better long-term growth once established in the field. In our research the diameter had a range of 3.4 to 4.2 mm and, according to Rueda *et al.* (2013), diameters of 2.5 to 3.9 mm are considered medium quality, while ≥4.0 mm are high quality.

Substrate mixtures and fertilization schemes evaluated influenced the ICD ($p \leq 0.05$). Results ranged from 0.27 to 0.41, with the lowest values found for M4 (composted pine bark, raw pine sawdust, peat moss, 15:70:15), regardless of the fertilization rate applied (Table 3). These results are similar to those obtained by Castro *et al.* (2018), with ICDs of 0.47 and 0.49 in *P. greggii* var. *australis* with controlled-release fertilizer at 8 and 4 g L⁻¹ doses. In this case, the values are considered to be of medium quality (Rueda *et al.*, 2013). Additional nutrition through fertilization is necessary to produce quality seedlings in the nursery to help overcome nutrient deficiencies when planting in degraded sites (Jacobs, 2014; Andivia *et al.*, 2018). For this reason, the ICD is considered an adequate predictor of survival because the higher this index is, the greater the possibilities of adaptation in the field (Zumkeller *et al.*, 2009),

(2013), diámetros de 2.5 a 3.9 mm se consideran de calidad mediana, mientras que ≥ 4.0 mm son de calidad alta.

Las mezclas de sustratos y los esquemas de fertilización evaluados influyeron ($p \leq 0.05$) en el ICD. Los resultados oscilaron entre 0.27 y 0.41, y los valores más bajos se encontraron en M4 (corteza compostada de pino, aserrín crudo de pino, turba de musgo, 15:70:15), e independiente de la dosis de fertilización aplicada (Cuadro 3). Estos resultados son similares a los obtenidos por Castro *et al.* (2018), con ICD de 0.47 y 0.49 en *P. greggii* var. *australis* con fertilizante de liberación controlada en dosis de 8 y 4 g L⁻¹. En este caso, los valores se consideran de calidad media (Rueda *et al.*, 2013). La nutrición adicional a través de la fertilización es necesaria para producir plantas de calidad en vivero, para ayudar a superar las deficiencias de nutrimentos al momento de plantarlas en sitios degradados (Jacobs, 2014; Andivia *et al.*, 2018). Por ello, el ICD se considera un predictor adecuado de la supervivencia porque entre mayor sea dicho índice las posibilidades de adaptación en campo aumentan (Zumkeller *et al.*, 2009), pues se evita seleccionar plantas con un crecimiento aéreo en exceso, con relación al sistema radical (Sáenz *et al.*, 2014; Bernaola *et al.*, 2016).

Concentración y contenido de N, P y K en el follaje

Las concentraciones de N, P y K en el follaje de las plantas mostraron diferencias significativas sólo respecto a P y K ($p \leq 0.05$). Independiente del sustrato, la concentración de N fue mayor en F2 y menor en F1, excepto en M1, donde F2 fue menor. Asimismo, los niveles mayores de P se encontraron en T3, T6, T7 y T12; para la concentración de potasio los valores más altos ocurrieron en F2 y F3, combinados con M2, M3 o M4 (Cuadro 4). En todos los tratamientos las plantas presentaron valores dentro de los rangos óptimos de concentración de macronutrimentos en el follaje (Prieto y Sáenz, 2011), y se consideran plantas de alta calidad en la concentración de N, P y K (Sáenz *et al.*, 2014).

El contenido mayor de N puede proporcionar ventajas competitivas a las plantas al establecerse en sitios de baja fertilidad, o puede apoyar como reserva para un crecimiento mayor en campo (Navarro

since it avoids selecting plants with excessive aerial growth in relation to the root system (Sáenz *et al.*, 2014; Bernaola *et al.*, 2016).

Concentration and content of N, P and K in the foliage

N, P and K concentrations in the seedlings' foliage showed significant differences only for P and K ($p \leq 0.05$). Regardless of the substrate, N concentration was higher in F2 and lower in F1, except in M1, where F2 was lower. Likewise, the highest levels of P were found in T3, T6, T7 and T12; for potassium concentration, the highest values occurred in F2 and F3, combined with M2, M3 or M4 (Table 4). In all treatments the seedlings presented values within the optimal ranges of macronutrient concentration in the foliage (Prieto and Sáenz, 2011), and are considered high-quality plants in the concentration of N, P and K (Sáenz *et al.*, 2014).

The higher N content may provide competitive advantages to plants by establishing in low fertility sites, or it may support as a reservoir for higher field growth (Navarro *et al.*, 2013). Thus, F2 and F3 provided a higher concentration of N, reflected in higher growth in height and larger total biomass. In this regard, high levels of N promote rapid cell division and elongation (Landis, 1989), therefore, Aldana and Aguilera (2002) recommend applying a daily dose of 75 ppm of N, while Prieto *et al.* (2009) determined levels of 40 to 70 ppm in the establishment stage, 100 to 200 ppm in the rapid growth stage and 40 to 70 ppm in the hardening stage.

In nutrition programs, N, P and K are essential elements for plant growth. Phosphorus contributes to the development of the root system (Dominguez *et al.*, 2000). In our research the lowest phosphorus content was found in treatment 11 with F2 (7.20 mg plant⁻¹), in which the seedlings generated lower amounts of roots and the lowest root volume (Table 3). According to Haase (2011), plants with higher capacity to generate new roots increase their chances of field survival.

The highest concentrations of potassium occurred at F2 and F3, except when M1 was used as substrate, and F1 generated the lowest concentrations. Castro *et al.* (2018) obtained in *P. greggii* var. *australis*

Cuadro 4. Concentración y contenido de N, P y K en el follaje de *P. cembroides* Zucc. producido en vivero.
Table 4. Concentration and content of N, P and K in the foliage of *P. cembroides* Zucc. produced in nursery.

Tratamiento	Sustrato	Fertilizante	Concentración (%)			Contenido (mg planta ⁻¹)		
			N	P	K	N	P	K
1	M1	F1	1.96	0.49	1.14	39.20	9.80	22.80
2	M1	F2	1.78	0.56	1.25	37.38	11.76	26.25
3	M1	F3	1.98	0.61	1.39	41.58	12.81	29.19
4	M2	F1	1.89	0.52	1.20	34.02	9.36	21.60
5	M2	F2	2.40	0.57	1.42	48.00	11.40	28.40
6	M2	F3	2.17	0.62	1.59	47.74	13.64	34.98
7	M3	F1	1.89	0.66	1.26	34.02	11.88	22.68
8	M3	F2	2.19	0.53	1.59	45.99	11.13	33.39
9	M3	F3	1.94	0.59	1.49	46.56	14.16	35.76
10	M4	F1	1.84	0.59	1.44	29.44	9.44	23.04
11	M4	F2	2.37	0.48	1.59	35.55	7.20	23.85
12	M4	F3	2.33	0.64	1.76	46.60	12.80	35.20
Valor <i>p</i>			0.2445	0.0018	0.0001			
*Valores óptimos			1.3-3.50	0.20-0.60	0.70-2.50			

M1 (60% corteza compostada de pino y 40% de turba de musgo), M2 (35% corteza compostada de pino, 30% aserrín crudo de pino, 35% turba de musgo), M3 (25% corteza compostada de pino, 50% aserrín crudo de pino, 25% turba de musgo), M4 (15% corteza compostada de pino, 70% aserrín crudo de pino, 15% turba de musgo). F1) 8 kg m⁻³ Multicote® + 0.0 g L⁻¹ Triple 19®; F2) 0.0 kg m⁻³ Multicote® + 1.0 g L⁻¹ Triple 19®; F3) 4 kg m⁻³ Multicote® + 0.5 g L⁻¹ Triple 19®. N: nitrógeno, P: fósforo, K: potasio. * Niveles óptimos de macronutrientes de acuerdo con Sáenz *et al.* (2014) ♦ M1: 60% composted pine bark, 40% peat moss; M2: 35% composted pine bark, 30% raw pine sawdust, 35% moss peat; M3: 25% composted pine bark, 50% raw pine sawdust, 25% peat moss; M4: 15% composted pine bark, 70% raw pine sawdust, 15% peat moss. F1: 8 kg m⁻³ Multicote® + 0.0 g L⁻¹ Triple 19®; F2: 0.0 kg m⁻³ Multicote® + 1.0 g L⁻¹ Triple 19®; F3: 4 kg m⁻³ Multicote® + 0.5 g L⁻¹ Triple 19®. N: nitrogen; P: phosphorus; K: potassium. * Optimal levels of macronutrients according to Sáenz *et al.* (2014).

al., 2013). Así, F2 y F3 aportaron una concentración superior de N, reflejado en un crecimiento mayor en altura y biomasa total más grande. Al respecto, niveles elevados de N promueven una rápida división y elongación celular (Landis, 1989), por lo que Aldana y Aguilera (2002) recomiendan aplicar una dosis diaria de 75 ppm de N, mientras que Prieto *et al.* (2009) determinaron niveles de 40 a 70 ppm en la etapa de establecimiento, 100 a 200 ppm en la etapa de crecimiento rápido y 40 a 70 ppm en la etapa de endurecimiento.

En los programas de nutrición, el N, P y K son elementos esenciales para el crecimiento de la planta. El fósforo contribuye al desarrollo del sistema radical (Domínguez *et al.*, 2000). En nuestra investigación el menor contenido de fósforo fue en el tratamiento 11 con F2 (7.20 mg planta⁻¹), en el cual las plantas generaron una cantidad más baja de raíces y el menor volumen radical (Cuadro 3). De acuerdo con Haase (2011), las plantas con mayor capacidad para generar raíces nuevas incrementan sus probabilidades de supervivencia en campo.

lower values in nutrient concentration, with values from 0.85 to 1.14 % in N, from 0.17 to 0.21% in P and from 0.27 to 0.42 % in K, with doses of 8 and 4 g L⁻¹ of Osmocote Plus®. According to Villar *et al.* (2013), an ideal fertilization scheme must satisfy the demands of growth, and originate sufficient nutritional reserves so that plants can grow and develop once established in the field, even if the availability of nutrients is scarce. In addition, Basave *et al.* (2014) and Schott *et al.* (2016) mentioned that seedlings with sufficient nutrient reserves during their production in the nursery have greater growth and survival in the field by compensating for the initial nutrition needs, especially in degraded sites.

CONCLUSIONS

The highest total height and biomass occurred when the F3 fertilization scheme was used in the M2, M3 and M1 substrate mixtures. Diameters, Dickson's quality indexes and higher root volumes, which are related to better seedling quality, were obtained with

Las concentraciones mayores de potasio ocurrieron en F2 y F3, excepto cuando se usó M1 como sustrato, y F1 generó las concentraciones menores. Castro *et al.* (2018) obtuvieron en *P. greggii* var. *australis* valores inferiores en la concentración nutrimental, de 0.85 a 1.14 % en N, de 0.17 a 0.21 % en P y de 0.27 a 0.42 % en K, con dosis de 8 y 4 g L⁻¹ de Osmocote Plus®. Según Villar *et al.* (2013), un esquema ideal de fertilización debe satisfacer las demandas del crecimiento, y originar reservas nutrimentales suficientes para que las plantas puedan crecer y desarrollarse una vez establecidas en campo, aunque la disponibilidad de nutrimentos sea escasa. Además, Basave *et al.* (2014) y Schott *et al.* (2016) mencionaron que las plantas con reservas nutrimentales suficientes durante su producción en vivero, tienen mayor crecimiento y supervivencia en campo, al compensar las necesidades iniciales de nutrición, sobre todo en sitios degradados.

CONCLUSIONES

La mayor altura y biomasa total se produjo cuando se utilizó el esquema de fertilización F3, en las mezclas de sustrato M2, M3 y M1. Los diámetros, índices de calidad de Dickson y volúmenes radicales superiores, que se relacionan con mejor calidad de planta, en la mayoría de los casos se obtuvieron con el esquema de fertilización F1, el cual puede presentar ventajas en el establecimiento en campo.

Los valores inferiores en la mayoría de las variables se encontraron en las plantas producidas en la mezcla con mayor porcentaje de aserrín (M4) y con fertilizante hidrosoluble (F2). Los niveles de asimilación de N, P y K en las acículas de las plantas, estuvieron en los rangos recomendados en la literatura.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico en los estudios de doctorado del primer autor. Al Ing. Roberto Trujillo y al LAE. Roberto Trujillo Ayala, por las facilidades otorgadas para la realización del experimento en el vivero forestal "General Francisco Villa".

LITERATURA CITADA

Aguilera R., M., A. Aldrete, T. Martínez T., y V. M. Ordáz C. 2016a. Producción de *Pinus montezumae* Lamb. con diferentes sustratos y fertilizantes de liberación controlada. *Agrociencia* 50: 107-118.

the F1 fertilization scheme in most cases, which can present advantages in the field establishment.

The lower values in most variables were found in the seedlings produced in the mixture with the highest percentage of sawdust (M4) and with water-soluble fertilizer (F2). The levels of nutrient assimilation (N, P and K) in the plant needles were in the ranges recommended by the literature.

—End of the English version—

-----*-----

- Aguilera R., M., A. Aldrete, T. Martínez T., y V. M. Ordáz C. 2016b. Producción de *Pinus pseudostrobus* Lindl. con sustratos de aserrín y fertilizantes de liberación controlada. *Rev. Mex. Cien. For.* 7: 7-19.
- Aldana B., R., y M. Aguilera R. 2002. Procedimientos y cálculos básicos útiles en la operación de viveros que producen en contenedor. PRONARE. CONAFOR. Guadalajara, Jal., México. 44 p.
- Andivia E., P. Villar S., J. A. Oliet, J. R. Puértolas, and K. D. Dumroese. 2018. How can my research paper be useful for future meta-analyses on forest restoration plantations? *New Forests* 49: 1-12.
- Basave V. E., V. M. Cetina A., M. A. López L., A. Aldrete, and D. H. Del Valle P. 2014. Nursery practices increase seedling performance on nutrient-poor soils in *Swietenia humilis*. *iForest* 8: 552-557.
- Bautista Z. N., V. M. Cetina A., J. A. G. Vera C., y C. T. Cervantes M. 2005. Evaluación de la calidad de brinzales de *Pinus montezumae* Lamb. producidos en el vivero San Luis Tlaxialtemalco, Distrito Federal. *Ra Ximhai* 1: 167-176.
- Bautista O., G. I., J. A. Prieto R., J. C. Hernández D., E. Basave V., J. R. Goche T., y E. Montiel A. 2018. Crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. bajo diferentes rutinas de fertilización en vivero. *Rev. Mex. Cien. For.* 9: 213-233.
- Bernaola P., R. M., J. F. Zamora N., J. de J. Vargas R., V. M. Cetina A., R. Rodríguez M., y E. Salcedo P. 2016. Calidad de planta en etapa de vivero de dos especies de pino en sistema Doble-Trasplante. *Rev. Mex. Cien. For.* 7: 74-93.
- Buendía V., M. V., M. A. López L., V. M. Cetina A., and L. Diakite. 2016. Substrates and nutrient addition rates affect morphology and physiology of *Pinus leiophylla* seedlings in the nursery stage. *iForest* 10: 115-120.
- Bustos F., M. E. González, P. Donoso, V. Gerding, C. Donoso, y B. Escobar. 2008. Efectos de distintas dosis de fertilizante de liberación controlada (Osmocote®) en el desarrollo de plantas de coigüe, raulí y ulmo. *Bosque* 29: 155-161.
- Carpeneo A., S., M. Machado A., E. Benítez L., G. Gómez de O., y F. Da Silva C. 2016. Volumen de contenedores y dosis de fertilizante de liberación controlada en el crecimiento de plantas de *Cabralea canjerana* producidas en vivero. *Bosque* 37: 401-407.

- Castro G., S. L., A. Aldrete, J. López U., y V. M. Ordáz C. 2018. Efecto del envase, sustrato y fertilización en el crecimiento de *Pinus greggii* var. *australis* en vivero. *Agrociencia* 52: 115-127.
- Davis, A. S., and D. F. Jacobs. 2005. Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. *New Forests* 30: 295-311.
- De los Ríos C. E., R. De Hoogh, y J. J. Nívar C. 2008. Ensayos de especies con pinos piñoneros en el Nordeste de México. *Rev. Chapingo Ser. Cien. For. Amb.* 14: 97-104.
- Dickson, A., A. Leaf, and J. Hosner. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *Forest Chronicle* 36: 10-13.
- Domínguez L. S., J. Oliet P., P. Ruíz., I. Carrasco M., J. L. Peñuelas R., y R. Serrada H. 2000. Influencia de la relación N-P-K en el desarrollo en vivero y en campo de planta de *Pinus pinea*. *Actas del congreso I Simposio del pino piñonero*. Vol. 195-202. Valladolid, España. pp: 1-10.
- Escamilla H. N., J. J. Obrador O., E. Carrillo A., y D. J. Palma L. 2015. Uso de fertilizantes de liberación controlada en plantas de teca (*Tectona grandis*), en la etapa de vivero. *Rev. Fitotec. Mex.* 38: 329-333.
- Farjon A. J., A. Pérez de la R., y B. T. Styles. 1997. Guía de Campo de los Pinos de México y América Central. The Royal Botanic Gardens, Universidad de Oxford. Bélgica. 151 p.
- Fu Y., J. A. Oliet, G. Li, and J. Wang. 2017. Effect of controlled release fertilizer type and rate on mineral nutrients, non-structural carbohydrates, and field performance of Chinese pine container-grown seedlings. *Silva Fennica* 51: 1-13.
- González O., M., J. A. Prieto R., A. Aldrete, J. C. Hernández D., J. A. Chávez S., y R. Rodríguez L. 2018. Sustratos a base de aserrín crudo con fertilización y la calidad de planta de *Pinus cooperi* Blanco en vivero. *Rev. Mex. Cien. For.* 9: 203-225.
- Granados V., R. L., D. Granados S., y A. Sánchez G. 2015. Caracterización y ordenación de los bosques de pino piñonero (*Pinus cembroides* subsp. *orizabensis*) de la Cuenca Oriental (Puebla, Tlaxcala y Veracruz). *Madera y Bosques* 21: 23-42.
- Grossnickle, S. C. 2012. Why seedlings survive: influence of plant attributes. *New Forests* 43: 711-738.
- Gutiérrez G. J. V., D. A. Rodríguez T., A. Villanueva M., S. García D., y J. L. Romo L. 2015. Calidad del agua en la producción de *Pinus cembroides* Zucc. en vivero. *Agrociencia* 49: 205-219.
- Haase, D. L. 2011. Seedling root targets. *In: National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations*. Riley, L. E., D. L. Haase, and J. R. Pinto (eds). RMRS-P-65. USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fort Collins, CO. pp: 80-82.
- Haase, D. L., R. Rose, and J. Trobaugh. 2006. Field performance of three stock sizes of Douglas-fir container seedlings grown with slow-release fertilizer in the nursery growing medium. *New Forests* 31: 1-24.
- Harrington, J. T., J. G. Mexal, and J. Fisher. 1994. Volume displacement provides a quick and accurate way to quantify new root production. *Tree Planters Notes* 45: 121-124.
- Hernández Z. L., A. Aldrete, V. M. Ordaz C., J. López U., y M. A. López L. 2014. Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. en vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. *Agrociencia* 48: 627-637.
- Isogis Corp, The Pembina Institute, Instituto Tecnológico de El Salto, The Carbon Basis Company Ltd. 2010. Evaluación de la Madera, la Biomasa y el Carbono de Bosques y las Tecnologías Potenciales de Producción de Energía a Partir de Biomasa en Durango, México. 113 p.
- Ivetić, V., and J. Devetaković. 2016. Reforestation challenges in Southeast Europe facing climate change. *Reforesta* 1: 178-220.
- Jacobs, D. F. 2014. Advances in Fertilization for Forest Regeneration. *USDA Forest Service Proceedings, RMRS-P-72*. 3-5.
- Landis, T. D. 1989. Mineral nutrients and fertilization. *In: Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. McDonald, and J. P. Barnett (eds). The Container Tree Nursery Manual*. Vol. 4. Agriculture Handbook 674. Forest Service. Washington, D.C. pp: 1-67.
- Landis, T. D. 1990. Growing media. *In: Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. Mc Donald, and J. P. Barnett (eds). The Container Tree Nursery Manual*. Vol. 2. Agric. Handbook 674. USDA Forest Service. Washington, DC, USA. pp: 41-85.
- Luna C., M., A. Romero M., y E. García M. 2008. Afinidades en la flora genérica de piñonares del norte y centro de México: un análisis fenético. *Rev. Mex. Biodiversidad* 79: 449-458.
- Maldonado B., K. R., A. Aldrete, J. López U., H. Vaquera H., y V. M. Cetina A. 2011. Producción de *Pinus greggii* Engelm. en mezclas de sustrato con hidrogel y riego, en vivero. *Agrociencia* 45: 389-398.
- Mañas, P., E. Castro, and J. De las Heras. 2009. Quality of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings using waste materials as nursery growing media. *New Forests* 37: 295-311.
- Martínez P., R., y A. R. Soriano F. 2014. Propiedades físicas y químicas de los sustratos. Desplegable para productores No. 11. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Campo Experimental Tecmán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Colima, Col. 2 p.
- Martínez M. 1948. Los Pinos Mexicanos. 2ª. Edición. Ediciones Botas. México, D. F. 368 p.
- Navarro S., J. L., L. De M. Ruíz P., J. J. Vargas H., y A. Gómez G. 2013. Morfología, biomasa y contenido nutrimental en *Abies religiosa* con regímenes diferentes de fertilización en vivero. *Agrociencia* 47: 707-721.
- Oliet, J. A., R. Planelles, F. Artero, R. Valverde, D. F. Jacobs, and M. L. Segura. 2009. Field performance of *Pinus halepensis* planted in Mediterranean arid conditions: relative influence of seedling morphology and mineral nutrition. *New Forests* 37: 313-331.
- Perry, J. P. Jr. 1991. The pines of Mexico and Central America. Portland, OR: Timber Press. 231 p.
- Pompa G. M., y J. I. Yerena Y. 2014. Concentración de carbono en *Pinus cembroides* Zucc: fuente potencial de mitigación del calentamiento global *Rev. Chapingo Ser. Cien. For. Amb.* 20: 169-175.

- Prieto R. J. A., J. L. García R., J. M. Mejía B., S. Huchín A., y J. L. Aguilar V. 2009. Producción de planta del género *Pinus* en vivero en clima templado frío. Publicación Especial. Campo Experimental Valle del Guadiana. INIFAP. Durango, Dgo. México. 47 p.
- Prieto R., J. A., y J. T. Sáenz R. 2011. Indicadores de Calidad de Planta en Viveros Forestales de la Sierra Madre Occidental. Libro Técnico Núm. 3. Campo Experimental Valle del Guadiana. Centro de Investigación Regional Norte Centro. INIFAP. Durango, Dgo. 210 p.
- Reyes C. S. A., J. Méndez G., J. A. Nájera L., y J. Cerano P. 2013. Producción de hojarasca en un rodal de *Pinus cembroides* Zucc. en Arteaga, Coahuila, México y su relación con las variables climáticas. Rev. Chapingo Ser. Cien. For. Amb. 19: 147-155.
- Reyes R. J., A. Aldrete, V. M. Cetina A., y J. López U. 2005. Producción de plántulas de *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* en sustratos a base de aserrín. Rev. Chapingo Ser. Cien. For. Amb. 11: 105-110.
- Robles V. F., D. A. Rodríguez T., y A. Villanueva M. 2017. Calidad de planta y supervivencia en reforestación de *Pinus montezumae* Lamb. Rev. Mex. Cien. For. 8: 55-76.
- Rosas C. M., D. Granados S., R. L. Granados V., y S. Esparza G. 2015. Clasificación y ordenación de bosques de pino piñonero del estado de Querétaro. Rev. Mex. Cien. For. 7: 52-73.
- Rose, R., D. L. Haase, y E. Arellano. 2004. Fertilizantes de entrega controlada: potencial para mejorar la productividad de la reforestación. Bosque 25: 89-100.
- Rueda S. A., J. de D. Benavides S., J. T. Sáenz R., H. J. Muñoz F., J. A. Prieto R., y G. Orozco G. 2013. Calidad de planta producida en los viveros forestales de Nayarit. Rev. Mex. Cien. For. 5: 59-73.
- Sáenz R. J. T., H. J. Muñoz F., C. M. A. Pérez D., A. Rueda S., y J. Hernández R. 2014. Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero "Morelia", estado de Michoacán. Rev. Mex. Cien. For. 5: 98-111.
- Sánchez C. T., A. Aldrete, V. M. Cetina A., y J. López U. 2008. Caracterización de medios de crecimiento compuestos por corteza de pino y aserrín. Madera y Bosques 14: 41-49.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute Inc., 2009. SAS Ver. 9.0. SAS Inc., Cary, NC, USA.
- Schott, K. M., A. E. K. Snively, S. M. Landhäusser, and B. D. Pinno. 2016. Nutrient loaded seedlings reduce the need for field fertilization and vegetation management on boreal forest reclamation sites. New Forests 47:393-410.
- Secretaría de Economía (SE). 2016. Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016. Certificación de la operación de viveros forestales. Diario Oficial de la Federación. 22 de septiembre de 2016. México, D.F., México. pp: 11-18.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelo. Estudios, muestreo y análisis. México: Diario Oficial de la Federación. México, D.F., México. 67 p.
- Treviño G. E. J. 2001. Estratificación de la información en el procesamiento digital de imágenes de satélite aplicado a la cartografía de los bosques de *Pinus cembroides*. Investigaciones Geográficas. Boletín del Instituto de Geografía. UNAM. 44: 54-63.
- Villar-Salvador P., J. L. Peñuelas, J. L. N. Peragón, L. F. Benito, and S. Domínguez L. 2013. Is nitrogen fertilization in the nursery a suitable tool for enhancing the performance of Mediterranean oak plantations? New Forests 44: 733-751.
- Zumkeller, S. D., J. A. Galbiatti, R. C. De Paula, y J. L. Soto G. 2009. Producción de plantas de *Tabebuia heptaphylla* en diferentes sustratos y niveles de irrigación, en condiciones de invernadero. Bosque 30: 27-35.

DENSIDAD INICIAL EN EL RENDIMIENTO MADERABLE Y BIOMASA DE *Pinus patula* CON ESPECIES LATIFOLIADAS

INITIAL DENSITY IN THE TIMBER YIELD AND BIOMASS OF *Pinus patula* WITH HARDWOOD SPECIES

Agustín **Ramírez-Martínez**¹, Héctor M. **De los Santos-Posadas**^{1*}, Gregorio **Ángeles-Pérez**¹,
Manuel J. **González-Guillén**¹, Wenceslao **Santiago-García**²

¹Ciencias Forestales. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, México. ²Instituto de Estudios Ambientales-División de Estudios de Postgrado. Universidad de la Sierra Juárez, Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

RESUMEN

En México los bosques de clima templado manejados presentan en su mayoría una repoblación de origen natural y niveles de densidad diferentes entre rodales. Los modelos de mortalidad asumen tasa de disminución constante para todas las edades, índices de sitio y densidades. El objetivo de este estudio fue determinar las tasas de mortalidad en tres densidades iniciales y construir un sistema de crecimiento y rendimiento (SCR) de *Pinus patula* en presencia de latifoliadas, en la región de Zacualtipán, Hidalgo, México. Los datos provinieron de tres inventarios realizados en 2013, 2014 y 2016 de 160 sitios de 400 m². La productividad se describió por medio del patrón de crecimiento en altura dominante de tipo anamórfico con el modelo Hossfeld IV. El ajuste de los modelos de mortalidad generó tasas de decremento anuales de 2.47, 1.17 y 0.81% con densidades mayor que 2000, entre 1000 y 2000 y menor que 1000 árboles ha⁻¹, respectivamente. El SCR mostró que los rendimientos mayores correspondieron a la densidad inicial de 2000 árboles ha⁻¹ y los turnos técnicos estimados en volumen entre los 24 y 27 años. Con presencia del 5% de latifoliadas, a partir de los 5 años los turnos se encontraron entre los 20 y 23 años. En un índice de sitio (IS) 36 el volumen de pino fue mayor que el volumen total (la suma de pinos y latifoliadas), mientras que en los IS 18, 24 y 30 las diferencias no fueron tan significativas. La biomasa fue mayor en todos los sitios con pinos más latifoliadas, dado que estas especies concentran una mayor cantidad de biomasa en su estructura. En los sitios más productivos (IS 30 y 36) las latifoliadas tienden a afectar los rendimientos finales en volumen del pino. Por lo tanto, la aplicación de tratamientos silvícolas es necesaria para disminuir la proporción de estas especies.

ABSTRACT

In Mexico, most repopulation of managed temperate forests is natural and stands have different densities. Models of mortality assume a constant rate of decrease for all ages, site indexes and densities. The objective of this study was to determine mortality rates in three initial densities and construct a growth and yield system (GYS) for *Pinus patula* in the presence of hardwood species in the region of Zacualtipán, Hidalgo, México. The data used was from three inventories conducted in 2013, 2014 and 2016 at 160 sites, 400 m² each. A Hossfeld IV model based on the dominant height as anamorphic-type growth pattern described productivity. Mortality model fit generated annual decrease rates of 2.47, 1.17 and 0.81% with densities above 2000, between 1000 and 2000, and less than 1000 trees ha⁻¹, respectively. The GYS showed that the highest yields correspond to the initial density of 2000 trees ha⁻¹ and the estimated volume rotation ranging from 24 to 27 years. With hardwoods (5%) present in the site, starting at the first 5 years, estimated volume rotations were found between 20 and 23 years. In a site index (SI) 36, the volume of pine was greater than the total volume (the sum of pines and hardwoods), while at SI 18, 24 and 30, the differences were not as significant. Biomass was greater in all the sites with pines and hardwoods since these latter species concentrate a larger amount of biomass in their structure. In more productive sites (SI 30 and 36), hardwoods tend to affect final volume yield of pine. Therefore, the application of silvicultural treatments is necessary to decrease the proportion of hardwood species.

Key words: forest management, silvicultural treatment, site index, rotation, timber volume.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2018. Aprobado: enero, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 555-573. 2020.

Palabras clave: manejo forestal, tratamientos silvícolas, índice de sitio, turno técnico, volumen maderable.

INTRODUCCIÓN

La repoblación de origen natural presenta una distribución aleatoria de árboles con densidades diferentes entre rodales. La densidad es el número de individuos por unidad de área y se considera indicadora de la ocupación del arbolado de un lugar específico en un tiempo dado (Zeide, 2004).

El efecto negativo que un árbol ejerce sobre el otro es mayor en densidades mayores (Burkhart y Tomé, 2012), lo que indudablemente reducirá la supervivencia, el crecimiento o la reproducción del individuo afectado (Pretzsch, 2009). La mortalidad es un proceso fundamental en el desarrollo forestal que ocurre a diferentes tasas, mismas que pueden variar en dependencia de las condiciones del bosque (Lugo y Scatena, 1996). Lo anterior hace que este proceso sea una de las variables más difíciles de modelar y predecir (Santiago-García *et al.*, 2013).

Dentro de un sistema de crecimiento y rendimiento (SCR), la densidad inicial es un factor determinante del rendimiento (producción en volumen) (Daniel *et al.*, 1982). Este tipo de herramientas poseen la capacidad de proyectar y simular los cambios en las variables de interés (volumen, biomasa) en el estado de la masa forestal a través del tiempo (Santiago-García *et al.*, 2013). En México el desarrollo de los SCR ha crecido en años recientes, para plantaciones forestales con fines maderables (Fierros-Mateo *et al.* 2017; Parra-Piedra *et al.*, 2017) y bosques naturales coetáneos (Santiago-García *et al.*, 2014; Santiago-García *et al.*, 2017). Dentro de estos sistemas se han incorporado modelos de mortalidad, con la edad y número de árboles como variables de predicción. Este tipo de modelos se usan en plantaciones forestales donde se conocen el espaciamiento y la densidad inicial, y la tasa de mortalidad se puede mantener constante entre edades e índices de sitio.

En los bosques de la región de Zacualtipán de Ángeles, Hidalgo, México, hay masas de *Pinus patula* Schiede ex Schlechtendal & Chamisso, especie de interés por su crecimiento rápido y valor económico alto. *Pinus patula* crece asociada con especies de latifoliadas de abundancia menor (*Quercus excelsa* Liebm., *Q. laurina* Hump et Bonpl., *Q. rugosa* Neé, *Arbutus jalapensis* Kunth., *Prunus serótina* Ehrh., entre

INTRODUCTION

Natural repopulation presents a random distribution of trees within different densities among stands. Density is the number of individuals per unit of area; it is also an indicator of stand occupation of a specific place at a given time (Zeide, 2004).

The negative effect a tree exerts on another is greater when densities values are higher (Burkhart and Tomé, 2012); undoubtedly reducing survival, growth, or reproduction of the affected individual (Pretzsch, 2009). Mortality is a fundamental process in forest development and it occurs at different rates, which can vary depending on the conditions of the forest (Lugo and Scatena, 1996), making the process one of the most difficult variables to model and predict (Santiago-García *et al.*, 2013).

Within a growth and yield system (GYS), initial density is a determining factor of yield (timber volume production) (Daniel *et al.*, 1982). This type of tool has the capacity to project and simulate changes in the variables of interest (volume, biomass) assessing the state of the stand over time (Santiago-García *et al.*, 2013). Recently in Mexico, GYS development has grown for forest timber plantations Fierros-Mateo *et al.* 2017; Parra-Piedra *et al.*, 2017) and natural even-aged forests (Santiago-García *et al.*, 2014; Santiago-García *et al.*, 2017). There are mortality models incorporated into these systems based on age and the number of trees as predictive variables. This type of model is used in forest plantations in which spacing and initial densities are known; and mortality rate can be maintained constant among ages and site indexes.

In forests of the region of Zacualtipán de Ángeles, Hidalgo, México, there are stands of *Pinus patula* Schiede ex Schlechtendal & Chamisso, a species of interest because of its rapid growth and high economic value. *Pinus patula* grows in association with less abundant hardwood species (*Quercus excelsa* Liebm., *Q. laurina* Hump et Bonpl., *Q. rugosa* Neé, *Arbutus jalapensis* Kunth., *Prunus serótina* Ehrh., among others) (Figueroa-Navarro *et al.*, 2010). Most of the conducted studies omit hardwoods association condition. The objective of our study was to determine mortality rates for three levels of initial density and generate a GYS integrated by models including the proportion of hardwood species as a

otras) (Figuroa-Navarro *et al.*, 2010), condición omitida en la mayoría de las investigaciones realizadas. El objetivo del presente estudio fue determinar las tasas de mortalidad para tres niveles de densidad inicial y generar un SCR integrado por modelos que incluyan la proporción de latifoliadas como un factor de competencia para determinar su efecto sobre el crecimiento y rendimiento de *Pinus patula* en bosques manejados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y datos dasométricos

El estudio se realizó en el sitio de monitoreo intensivo de carbono (SMIC) en Atopixco, Hidalgo, en una superficie de 900 ha, localizado en las coordenadas 20° 37' 49.78" y 20° 35' 18.74" N y 98° 37' 51.01" y 98° 34' 2.71" O (Soriano-Luna *et al.*, 2015). La topografía es accidentada con altitud media de 2100 m (Cruz-Leyva *et al.*, 2010). El suelo predominante es Feozem con buen drenaje, textura media y contenido alto de materia orgánica (Chávez-Aguilar *et al.*, 2016). El clima es templado húmedo (C(m)) y templado subhúmedo (C (w2)), temperatura media anual de 13.5 °C y precipitación media anual de 2050 mm (Santiago-García *et al.*, 2015).

Los datos utilizados provienen de tres inventarios (2013, 2014 y 2016), realizados en 160 sitios permanentes de 400 m². Los datos recolectados fueron: altura total (H, m), diámetro normal (DN, cm), altura dominante (HD, m), número de árboles vivos (NA) y la edad (años), obtenidos a nivel de rodal en campo y de los programas de manejo forestal. El volumen total con corteza por árbol se estimó con la ecuación 1 desarrollada por Schumacher-Hall, reportada en el Sistema Biométrico Nacional, correspondiente a la Unidad de Manejo Forestal 1302 Zacualtipán-Molango (Vargas-Larreta *et al.*, 2017) y la biomasa aérea total se estimó con la ecuación 2, ajustada por Soriano-Luna *et al.* (2015).

$$V = 0.000253 \cdot DN^{1.6939421} \cdot H^{1.4175090} + 0.0000680 \cdot DN^2 \quad (1)$$

$$B = \exp(-4.554805) \cdot (DN^2 \cdot H)^{1.047218} \quad (2)$$

Con los datos anteriores se estimaron las variables de estado del rodal siguientes: altura promedio de los árboles dominantes (HD, m), área basal (AB, m² ha⁻¹), volumen total (V, m³ ha⁻¹), biomasa aérea total (B, Mg ha⁻¹) y número de árboles vivos (NA, árboles ha⁻¹).

factor of competition to determine their effect on growth and yield of *Pinus patula* in managed forests.

MATERIALS AND METHODS

Study area and dasometric data

The study was conducted at the intensive carbon monitoring site (ICMS) in Atopixco, Hidalgo, on an area of 900 ha, located between the coordinates 20° 37' 49.78" and 20° 35' 18.74" N and 98° 37' 51.01" and 98° 34' 2.71" W (Soriano-Luna *et al.*, 2015). Topography is hilly with mean altitude of 2100 m (Cruz-Leyva *et al.*, 2010). The predominant soil is well-drained Feozem with medium texture and high organic matter content (Chávez-Aguilar *et al.*, 2016). Climate is temperate humid (C(m)) and temperate subhumid (C (w2)), mean annual temperature is 13.5 °C, and mean annual precipitation is 2050 mm (Santiago-García *et al.*, 2015).

Data proceeded from three inventories (conducted in 2013, 2014 and 2016) at 160 (400-m²) permanent sites. The collected data were total height (H, m), diameter at breast height (DN, cm) dominant height (HD, m), number of live trees (NA) and age (years) obtained at the stand level in the field and from forest management programs. The total tree volume, with bark, was estimated with equation 1 developed by Schumacher-Hall, reported in the Sistema Biométrico Nacional, corresponding to the Forest Management Unit 1302 Zacualtipán-Molango (Vargas-Larreta *et al.*, 2017). Total aerial biomass was estimated with equation 2, adjusted by Soriano-Luna *et al.* (2015).

$$V = 0.000253 \cdot DN^{1.6939421} \cdot H^{1.4175090} + 0.0000680 \cdot DN^2 \quad (1)$$

$$B = \exp(-4.554805) \cdot (DN^2 \cdot H)^{1.047218} \quad (2)$$

With the above data, the following variables of the state of the stand were estimated: average height of dominant trees (HD, m), basal area (BA, m² ha⁻¹), total volume (V, m³ ha⁻¹), total aerial biomass (B, Mg ha⁻¹) and number of live trees (NT, trees ha⁻¹).

System of explicit growth

Mortality

To estimate mortality, we used the model proposed by Torres and Magaña (2001). Based on a covariance analysis, three levels of initial repopulation (first measurement of the sites) (3) were

Sistema de crecimiento explícito

Mortalidad

Para estimar la mortalidad se empleó el modelo propuesto por Torres y Magaña (2001), y con base en un análisis de covarianza se analizaron tres niveles de repoblación inicial (primera medición de los sitios) (3), donde las densidades observadas se definieron como alta (A), mayor de 2000 árboles ha⁻¹; media (M), de 1000 a 2000 árboles ha⁻¹; y baja (B), menor de 1000 árboles ha⁻¹ (Figura 1).

La ecuación 4 corresponde a un modelo exponencial negativo donde la tasa de mortalidad media por condición está dada de manera aditiva. La estructura matemática para las ecuaciones 3 y 4 es la siguiente:

$$f(\theta_{1f} \cdot I_f) = \theta_{1A} + \theta_{1M} \cdot I_M + \theta_{1B} \cdot I_B \tag{3}$$

$$NA_2 = NA_1 \cdot \exp(f(\theta_{1f} \cdot I_f) \cdot (E_2 - E_1)) \tag{4}$$

donde NA_1 : número de árboles (árboles ha⁻¹) a la edad inicial E_1 (años), NA_2 : número de árboles (árboles ha⁻¹) a la edad de proyección E_2 (años), θ_{1A} : tasa de mortalidad para densidad inicial alta, θ_{1M} : valor de adición debido a la densidad inicial media, θ_{1B} : valor de adición debido a la densidad inicial baja, I_f : variable indicadora por densidad media y baja.

analyzed. The observed densities were defined as high (A), more than 2000 trees ha⁻¹; medium (M), 1000 to 2000 trees ha⁻¹; and low (B), fewer than 1000 trees ha⁻¹ (Figure 1).

Equation 4 is a negative exponential model, which additively renders the mean mortality rate by condition. The mathematical structure for equations 3 and 4 is the following:

$$f(\theta_{1f} \cdot I_f) = \theta_{1A} + \theta_{1M} \cdot I_M + \theta_{1B} \cdot I_B \tag{3}$$

$$NA_2 = NA_1 \cdot \exp(f(\theta_{1f} \cdot I_f) \cdot (E_2 - E_1)) \tag{4}$$

where, NA_1 : number of trees (trees ha⁻¹) at the initial age E_1 (years), NA_2 : number of trees (trees ha⁻¹) to the projection age E_2 (years), θ_{1A} : mortality rate for high initial density, θ_{1M} : value of addition due to medium initial density, θ_{1B} : value of addition due to low initial density, I_f : indicator variable due to medium and low density.

Dominant height

Site quality was determined using the site index (SI), defined as the dominant height of the stand at a reference age (Santiago-García *et al.*, 2013). Growth in HD was evaluated with the Hossfeld IV prediction model (equation 5), and a future condition was derived (equations 6 and 7) with the algebraic difference approach (ADA) (Quiñonez-Barraza *et al.*, 2015).

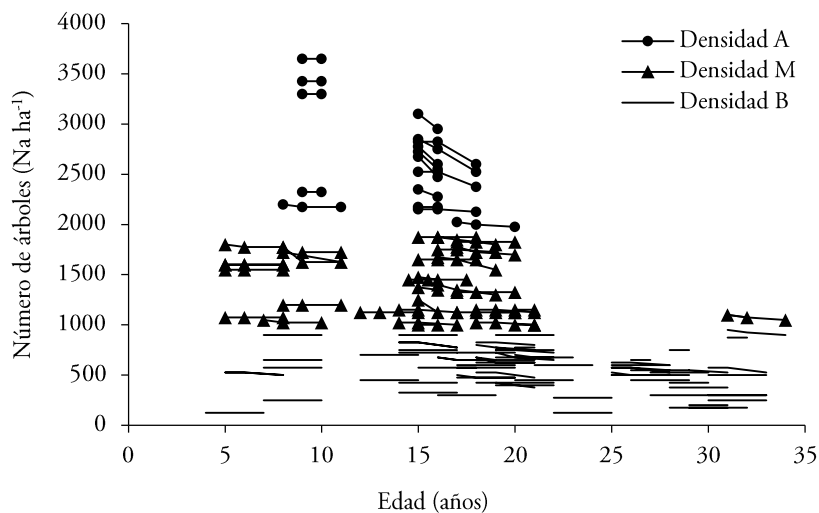


Figura 1. Densidad observada en los sitios de muestreo: A (mayor de 2000 árboles ha⁻¹); M (entre 1000 y 2000 árboles ha⁻¹) y B (menor de 1000 árboles ha⁻¹).

Figure 1. Observed density at sampling sites: A (more than 2000 trees ha⁻¹); M (between 1000 and 2000 trees ha⁻¹) and B (fewer than 1000 trees ha⁻¹).

Altura dominante

La calidad de estación del rodal se determinó a través del índice de sitio (IS), definido como la altura dominante del rodal en una edad de referencia (Santiago-García *et al.*, 2013). El crecimiento en HD se evaluó con el modelo de predicción Hossfeld IV (ecuación 5) y por medio del enfoque de diferencia algebraica (ADA) se derivó una condición futura (ecuaciones 6 y 7) (Quiñonez-Barraza *et al.*, 2015). La ecuación 6 refiere un modelo de proyección anamórfico cuya hipótesis de crecimiento indica que las tasas relativas de crecimiento en HD entre sitios son constantes pero la potencialidad máxima varía. Mientras que la ecuación 7 es un modelo polimórfico (β_2), para el cual la tasa relativa de crecimiento varía entre los sitios, pero la potencialidad máxima es única (Clutter *et al.*, 1983).

$$HD_1 = \frac{\beta_0}{[1 + \exp(\beta_1) \cdot \exp(-\beta_2 \cdot \ln(E_1))]} \tag{5}$$

$$HD_2 = HD_1 \frac{[1 + \exp(\beta_1) \cdot \exp(-\beta_2 \cdot \ln(E_1))]}{[1 + \exp(\beta_1) \cdot \exp(-\beta_2 \cdot \ln(E_2))]} \tag{6}$$

$$HD_2 = \frac{\beta_0}{1 + \exp(\beta_1) \cdot \exp\left[\left(\frac{\ln\left(\frac{\beta_0 - HD_1}{HD_1 \cdot \exp(\beta_1)}\right)}{\ln(E_1)}\right) \cdot \ln(E_2)\right]} \tag{7}$$

donde E_1 : edad inicial (años); E_2 : edad de proyección (años); HD_1 y HD_2 : altura dominante (m) a la edad E_1 y E_2 ; exp: función exponencial; β_i : parámetros a estimar.

Modelos compatibles

Para el área basal se evaluaron dos sistemas integrados por los modelos 8 y 9 y 10 y 11, estos últimos propuestos por Pienaar *et al.* (1990). Para el volumen se probaron los modelos 12 y 13 propuestos por Santiago-García *et al.* (2013), así como las ecuaciones 14 y 15 de Parra-Piedra *et al.* (2017). La cantidad de biomasa aérea de pino almacenada en el rodal se estimó con el modelo 16 de proporción directa sobre el volumen con corteza.

$$AB_1 = \exp(\alpha_0) \cdot HD_1^{\alpha_1} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + \alpha_3 \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right) \tag{8}$$

Equation 6 is an anamorphic projection model whose growth hypothesis indicates that the relative growth rates in HD among the sites are constant, but the maximum potential varies. While equation 7 is a polymorphic (β_2) model for which the relative growth rate varies among sites, but the maximum potential is unique (Clutter *et al.*, 1983).

$$HD_1 = \frac{\beta_0}{[1 + \exp(\beta_1) \cdot \exp(-\beta_2 \cdot \ln(E_1))]} \tag{5}$$

$$HD_2 = HD_1 \frac{[1 + \exp(\beta_1) \cdot \exp(-\beta_2 \cdot \ln(E_1))]}{[1 + \exp(\beta_1) \cdot \exp(-\beta_2 \cdot \ln(E_2))]} \tag{6}$$

$$HD_2 = \frac{\beta_0}{1 + \exp(\beta_1) \cdot \exp\left[\left(\frac{\ln\left(\frac{\beta_0 - HD_1}{HD_1 \cdot \exp(\beta_1)}\right)}{\ln(E_1)}\right) \cdot \ln(E_2)\right]} \tag{7}$$

where, E_1 : initial age (years); E_2 : projection age (years); HD_1 and HD_2 : dominant height (m) at age E_1 and E_2 ; exp: exponential function; β_i : parameters to be estimated.

Compatible models

For basal area, two systems were evaluated, integrated by models 8 and 9 and by 10 and 11, proposed by Pienaar *et al.* (1990). For volume, we tested models 12 and 13 proposed by Santiago-García *et al.* (2013), as well as equations 14 and 15 from Parra-Piedra *et al.* (2017). Also, we estimated the quantity of pine aerial biomass stored in the stand, with model 16 of direct proportion over the volume with bark.

$$AB_1 = \exp(\alpha_0) \cdot HD_1^{\alpha_1} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + \alpha_3 \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right) \tag{8}$$

$$AB_2 = AB_1 = \frac{HD_2^{\alpha_1} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + \alpha_3 \cdot NA_2 + \alpha_4 \cdot HD_2}{E_2}\right)}{HD_1^{\alpha_1} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + \alpha_3 \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right)} \tag{9}$$

$$AB_1 = \exp(\alpha_0 + \alpha_1 \cdot E_1^{-1} + \alpha^2 \cdot \ln(NA_1) + \alpha_2 \cdot \ln(HD_1)) \tag{10}$$

$$AB_2 = AB_1 = \frac{HD_2^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + \alpha_3 \cdot NA_2 + \alpha_4 \cdot HD_2}{E_2}\right)}{HD_1^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + \alpha_3 \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right)} \quad (9)$$

$$AB_1 = \exp(\alpha_0 + \alpha_1 \cdot E_1 + \alpha^2 \cdot \ln(NA_1) + \alpha_2 \cdot \ln(HD_1)) \quad (10)$$

$$AB_2 = \exp\left(\ln(AB_1) + \alpha_1 \cdot (E_2 - E_1) + \alpha_2 \cdot \ln\left(\frac{NA_2}{NA_1}\right) + \alpha_3 \cdot \ln\left(\frac{HD_2}{HD_1}\right)\right) \quad (11)$$

$$V_1 = \exp\left(\gamma_0 + \gamma_1 \cdot \frac{HD_1}{AB_1} \cdot E_1^{V_2} \cdot HD_1\right) \quad (12)$$

$$V_2 = V_1 \cdot \left(\frac{E_2}{E_1}\right)^{V_2} \cdot \left(\frac{HD_2}{HD_1}\right) \cdot \exp\left(\gamma_1 \left(\frac{HD_2}{AB_2} - \frac{HD_1}{AB_1}\right)\right) \quad (13)$$

$$V_1 = \gamma_0 \cdot AB_1^{\gamma_1} \cdot HD_1^{\gamma_2} \quad (14)$$

$$V_2 = V_1 \left(\frac{AB_2}{AB_1}\right)^{\gamma_1} \cdot \left(\frac{HD_2}{HD_1}\right)^{\gamma_2} \quad (15)$$

$$B_1 = \delta_0 \cdot V_1 \quad (16)$$

donde AB_1, HD_1, NA_1, V_1 : área basal (m^2), altura dominante (m), número de árboles (árboles ha^{-1}), volumen total (m^3) a la edad inicial E_1 (años), $AB_2, HD_2, NA_2, V_2, B_2$: área basal (m^2), altura dominante (m), número de árboles (árboles ha^{-1}) y volumen total en (m^3) a la edad de proyección E_2 (años), B_1 biomasa aérea total en ($Mg ha^{-1}$), α, λ, δ ; parámetros por estimar.

Proyección de rendimiento maderable y biomasa aérea en niveles diferentes de densidad inicial, sin y con presencia de latifoliadas

Para proyectar el rendimiento, la estructura matemática de los modelos seleccionados para área basal, volumen y mortalidad se modificó al incorporar un análisis de covarianza para los tres niveles de repoblación inicial (ecuaciones 17, 20 y 24), así como un factor de disminución por presencia de latifoliadas, este último se obtuvo al ajustar el modelo 23 de proyección de área basal de latifoliadas, propuesto por Martin y Brister (1999). Un análisis gráfico se realizó para verificar las tendencias de las estimaciones, para esto se estableció un valor inicial dentro del intervalo de definición de los tres niveles de densidad: A de 3000 árboles ha^{-1} , M de 2000 árboles ha^{-1} y B de 1000 árboles ha^{-1} , mientras que en la proyección de la proporción de latifoliadas se usó el 5%

$$AB_2 = \exp\left(\ln(AB_1) + \alpha_1 \cdot (E_2 - E_1) + \alpha_2 \cdot \ln\left(\frac{NA_2}{NA_1}\right) + \alpha_3 \cdot \ln\left(\frac{HD_2}{HD_1}\right)\right) \quad (11)$$

$$V_1 = \exp\left(\gamma_0 + \gamma_1 \cdot \frac{HD_1}{AB_1} \cdot E_1^{V_2} \cdot HD_1\right) \quad (12)$$

$$V_2 = V_1 \cdot \left(\frac{E_2}{E_1}\right)^{V_2} \cdot \left(\frac{HD_2}{HD_1}\right) \cdot \exp\left(\gamma_1 \left(\frac{HD_2}{AB_2} - \frac{HD_1}{AB_1}\right)\right) \quad (13)$$

$$V_1 = \gamma_0 \cdot AB_1^{\gamma_1} \cdot HD_1^{\gamma_2} \quad (14)$$

$$V_2 = V_1 \left(\frac{AB_2}{AB_1}\right)^{\gamma_1} \cdot \left(\frac{HD_2}{HD_1}\right)^{\gamma_2} \quad (15)$$

$$B_1 = \delta_0 \cdot V_1 \quad (16)$$

where, AB_1, HD_1, NA_1, V_1 : basal area (m^2), dominant height (m), number of trees (trees ha^{-1}), total volume (m^3) at initial age E_1 (years), $AB_2, HD_2, NA_2, V_2, B_2$: basal area (m^2), dominant height (m), number of trees (trees ha^{-1}) and total volume (m^3) at the projection age E_2 (years), B_1 total aerial biomass ($Mg ha^{-1}$), and α, λ, δ ; parameters to be estimated.

Projection of timber yield and aerial biomass at different levels of initial density, with and without presence of hardwood species

To project yield, the mathematical structure of the models selected for basal area, volume and mortality was modified by incorporating an analysis of covariance for the three levels of initial repopulation (equations 17, 20 and 24), as well as a decrease factor due to presence of hardwood species. We obtained the decrease factor by fitting the hardwood basal area projection model 23 proposed by Martin and Brister (1999). A graphic analysis was performed to verify the estimation trends. To this end, an initial value was established within the interval of definition of the three density levels: A (3000 trees ha^{-1}), M (2000 trees ha^{-1}) and B (1000 trees ha^{-1}). While, in the projection of the proportion of hardwoods, 5% was used at the age of 5 years because this is the average proportion in the first 10 years at the sampled sites.

$$\alpha_3 = g(\alpha_{3i}, I_i) = \alpha_{3A} + \alpha_{3M} \cdot I_M + \alpha_{3B} \cdot I_B \quad (17)$$

$$AB_1 = \exp(\alpha_0) \cdot HD_1^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right) \quad (18)$$

a la edad de 5 años, por ser esta la proporción promedio en los primeros 10 años de los sitios muestreados.

$$\alpha_3 = g(\alpha_{3i}, I_i) = \alpha_{3A} + \alpha_{3M} \cdot I_M + \alpha_{3B} \cdot I_B \quad (17)$$

$$AB_1 = \exp(\alpha_0) \cdot HD_1^{\alpha_1} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right) \quad (18)$$

$$AB_2 = AB_1 \frac{HD_2^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_2 + \alpha_4 \cdot HD_2}{E_2}\right)}{HD_1^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right)} \quad (19)$$

$$\gamma_1 = h(\gamma_{1i}, I_i) = \gamma_{1A} + \gamma_{1M} \cdot I_M + \gamma_{1B} \cdot I_B \quad (20)$$

$$V_1 = \gamma_0 \cdot AB_1^{h(\gamma_{1i}, I_i)} \cdot HD_1^{\gamma_2} \quad (21)$$

$$V_2 = V_1 \left(\frac{AB_2}{AB_1}\right)^{h(\gamma_{1i}, I_i)} \cdot \left(\frac{HD_2}{HD_1}\right)^{\gamma_2} \quad (22)$$

$$q_2 = q_1^{\left(\frac{\theta_2}{\tau_2}\right)^{\tau_0}} \quad (23)$$

$$\omega_1 = f(\omega_{1i}, I_i) = \omega_{1A} + \omega_{1M} \cdot I_M + \omega_{1B} \cdot I_B \quad (24)$$

$$NA_2 = NA_1 \cdot \exp(f(\omega_{1i}, I_i) \cdot (E_2 - E_1)) \cdot (1 - q_2)^{\left(1 - \frac{\theta_2}{\tau_2}\right)} \quad (25)$$

$$AB_1 = \exp(\alpha_0) \cdot HD_1^{\alpha_1} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right) \quad (26)$$

$$AB_2 = AB_1 \frac{HD_2^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_2 + \alpha_4 \cdot HD_2}{E_2}\right)}{HD_1^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right)} \cdot (1 - q_2)^{\left(1 - \frac{\theta_2}{\tau_2}\right)} \quad (27)$$

donde θ_1, θ_2 : proporción del área basal de latifoliadas a la edad E_1 y E_2 , τ_0 : parámetro por estimar.

$$AB_2 = AB_1 \frac{HD_2^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_2 + \alpha_4 \cdot HD_2}{E_2}\right)}{HD_1^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right)} \quad (19)$$

$$\gamma_1 = h(\gamma_{1i}, I_i) = \gamma_{1A} + \gamma_{1M} \cdot I_M + \gamma_{1B} \cdot I_B \quad (20)$$

$$V_1 = \gamma_0 \cdot AB_1^{h(\gamma_{1i}, I_i)} \cdot HD_1^{\gamma_2} \quad (21)$$

$$V_2 = V_1 \left(\frac{AB_2}{AB_1}\right)^{h(\gamma_{1i}, I_i)} \cdot \left(\frac{HD_2}{HD_1}\right)^{\gamma_2} \quad (22)$$

$$q_2 = q_1^{\left(\frac{\theta_2}{\tau_2}\right)^{\tau_0}} \quad (23)$$

$$\omega_1 = f(\omega_{1i}, I_i) = \omega_{1A} + \omega_{1M} \cdot I_M + \omega_{1B} \cdot I_B \quad (24)$$

$$NA_2 = NA_1 \cdot \exp(f(\omega_{1i}, I_i) \cdot (E_2 - E_1)) \cdot (1 - q_2)^{\left(1 - \frac{\theta_2}{\tau_2}\right)} \quad (25)$$

$$AB_1 = \exp(\alpha_0) \cdot HD_1^{\alpha_1} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right) \quad (26)$$

$$AB_2 = AB_1 \frac{HD_2^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_2 + \alpha_4 \cdot HD_2}{E_2}\right)}{HD_1^{\alpha_2} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_2 + g(\alpha_{3i}, I_i) \cdot NA_1 + \alpha_4 \cdot HD_1}{E_1}\right)} \cdot (1 - q_2)^{\left(1 - \frac{\theta_2}{\tau_2}\right)} \quad (27)$$

where, θ_1, θ_2 : proportion of basal area of hardwood species at ages E_1 and E_2 , τ_0 : parameter to be estimated.

To complement the GYS, the projection models fit by Palacios-Cruz *et al.* (2020) were reconsidered for the proportion of hardwoods (equation 28) and their basal area parting from the basal area of pines (equation 29), besides the factor of direct proportionality over hardwood volume for estimating aerial biomass, whose value was 0.817. We also used the ratio factor (0.433) obtained before estimating aerial biomass over outside-bark pine volume.

Para complementar el SCR se retomaron los modelos de proyección ajustados por Palacios-Cruz *et al.*, (2020) para la proporción de latifoliadas (ecuación 28) y área basal de las mismas a partir del área basal de pino (ecuación 29), además del factor de proporcionalidad directa sobre el volumen de latifoliadas para estimar la biomasa aérea, cuyo valor fue 0.817. También, se utilizó el factor obtenido antes para estimar la biomasa aérea sobre el volumen con corteza de pino que fue 0.433.

$$AB_{H2} = \frac{AB_2 \cdot q_2}{1 - q_2} \quad (28)$$

$$V_H = 6.477901 \cdot AB_{H2} \quad (29)$$

donde q_2 : proporción del área basal de latifoliadas a la edad E_1 y E_2 , AB_2 , AB_{H2} , V_H : área basal de pino, área basal de latifoliadas y volumen de latifoliadas a la edad de proyección E_2 .

Técnica y prueba de bondad de ajuste

Para el ajuste y la evaluación de los modelos de altura dominante se usaron 261 pares de datos sin traslape; para el área basal, volumen total, modelo de proporción de latifoliadas, así como para los modelos con un factor de reducción por presencia de latifoliadas se usaron 231 pares de datos sin traslape. El ajuste fue simultáneo, con regresión aparentemente no relacionada (SUR), por medio del procedimiento MODEL del paquete estadístico SAS/ETS (SAS Institute, 2008). El sistema de mortalidad y el modelo de proporcionalidad de biomasa aérea se ajustaron por medio de mínimos cuadrados ordinarios (MCO). Para calificar la bondad de ajuste, los criterios fueron: el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}), suma de cuadrados del error (SCE), raíz del cuadrado medio del error (RECM), sesgo promedio en la predicción (\bar{E}), criterio de información de Akaike (AIC) y el carácter significativo de los estimadores de los parámetros ($Pr>|t|$) con un valor crítico $\alpha=0.05$. Lo anterior se complementó con un análisis gráfico, en el cual se evaluó el comportamiento lógico de los modelos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferencias entre las tasas de mortalidad anual fueron significativas de acuerdo con la densidad inicial, con valores de 2.44, 1.17 y 0.81%, para la densidad alta, media y baja (Cuadro 1). En bosques manejados Santiago-García *et al.* (2013, 2015 y 2017) reportaron tasas de 3.3, 4.6 y 1.2% anual, respectivamente. Las tasas de mortalidad concordaron con

$$AB_{H2} = \frac{AB_2 \cdot q_2}{1 - q_2} \quad (28)$$

$$V_H = 6.477901 \cdot AB_{H2} \quad (29)$$

where, q_2 : the proportion of hardwood basal area at ages E_1 and E_2 , AB_2 , AB_{H2} , V_H : pine basal area, hardwood basal area, and hardwood volume at the projection age E_2 .

Goodness of fit technique and test

For the fit and evaluation of the dominant height models, we used 261 pairs of non-overlapping data; for basal area, total volume, hardwood proportion and the models with a reduction factor due to the presence of hardwoods, we used 231 non-overlapping pairs of data. The system fitted simultaneously with seemingly unrelated regression (SUR) with the MODEL procedure of SAS/ETS (SAS Institute, 2008). Ordinary least squares (OLS) fitted the system of mortality and the model of proportionality of aerial biomass. To rank goodness of fit, the criteria were the adjusted coefficient of determination (R^2_{adj}), sum of squared errors (SES), root mean square error (RMSE), average prediction bias (\bar{E}), Akaike information criterion (AIC), and the significant trait of the parameter estimators ($Pr>|t|$)m with a $\alpha=0.05$ critical value. A graphic analysis complemented all the above, in which the logical behavior of the models was evaluated.

RESULTS AND DISCUSSION

The differences among annual mortality rates were significant in accord with initial density, with values of 2.44, 1.17 and 0.81% for high, medium and low densities (Table 1). In managed forests, Santiago-García *et al.* (2013, 2015 and 2017) reported annual rates of 3.3, 4.6 and 1.2%, respectively. Mortality rates were in accord with density since mortality tends to decrease when the number of trees in the stand is lower, in response to the reduction of intraspecific competition.

Dominant height and site index

The fit of models 5 and 6 (anamorphic Hossfeld IV) had the best values in SSE, RMSE and AIC, while for polymorphic projection model 7, the values in SSE, RMSE and \bar{E} were higher than those obtained in the anamorphic system (Table 2). With

Cuadro 1. Estadísticos de bondad de ajuste y parámetros estimados para el modelo de proyección de la mortalidad.

Table 1. Goodness-of-fit statistics and estimated parameters for the mortality projection model.

Modelo	SCE	RECM	R ² adj	Parámetro	Valor	p > t
4	266492	34.188	0.997	θ_{1A}	0.0248	<0.0001
				θ_{1M}	-0.0130	<0.0001
				θ_{1B}	-0.017	<0.0001

R²adj: coeficiente de determinación ajustado; SCE: suma de cuadrados del error; RECM: raíz del cuadrado medio del error; p>|t|= valor de p. ♦ R²adj: adjusted coefficient of determination; SCE: sum of square errors; RECM: root mean square error; p > |t|= value of p.

la densidad, ya que la mortalidad tiende a decrecer cuando el número de árboles es menor en el rodal, en respuesta a la reducción de la competencia intra-específica.

Altura dominante e índice de sitio

El ajuste de los modelos 5 y 6 de Hossfeld IV anamórfico presentaron los mejores valores en SCE, RECM y AIC, mientras que para el modelo 7 de proyección polimórfico los valores en SCE, RECM y \bar{E} , fueron mayores que los obtenidos en el sistema anamórfico (Cuadro 2). Con este modelo se obtuvo el índice de sitio (IS) (30) para evaluar la productividad de la zona, al sustituir en el modelo de proyección el IS en HD_2 , HD en HD_1 , EB (40 años) en E_2 y edad en E_1 .

$$IS = HD \frac{(1 + \exp(4.02898) \cdot \exp(-1.56604) \cdot \ln(Edad))}{1.174129} \tag{26}$$

this model, the site index (SI) (30) was obtained to evaluate the zone productivity by substituting SI in the projection model in HD_2 , HD in HD_1 , EB (40 years) in E_2 and age in E_1 .

$$IS = HD \frac{(1 + \exp(4.02898) \cdot \exp(-1.56604) \cdot \ln(Edad))}{1.174129} \tag{26}$$

The polymorphic Hossfeld IV family of curves (Figure 2A) showed an estimated horizontal asymptote of 37.24 at a base age of 40 years. While the selected system generated a family of anamorphic curves (Figure 2B) with an asymptote of 37.5 m, a height similar to that reported by Santiago-García *et al.* (2013), 38.98 m, using the anamorphic Hossfeld IV model for the same study region. Gómez-Tejero *et al.* (2009) reported the efficiency of the model for another species, at plantations of *Eucalyptus grandis*, in the state of Oaxaca.

Cuadro 2. Estadísticos de bondad de ajuste y parámetros estimados de los modelos de crecimiento en HD.

Table 2. Goodness of fit and parameters estimated of the models of growth in HD.

Modelo	SCE	RECM	R ² adj	(\bar{E})	AIC	Parámetro	Valor	P > t
5	933	1.898	0.898	-0.007	339.172	β_0	37.520	<0.0001
						β_1	4.063	<0.0001
						β_2	1.477	<0.0001
6	133	0.717	0.983	-0.071	-169.017	β_0	37.239	<0.0001
						β_1	4.098	<0.0001
						β_2	1.496	<0.0001
5	929	1.894	0.898	-0.005	337.488			
7	144	0.745	0.982	0.095	-148.642			

La familia de curvas de Hossfeld IV polimórfica (Figura 2A) presentó una asíntota horizontal estimada de 37.24 en una edad base de 40 años, en tanto que el sistema seleccionado generó una familia de curvas anamórficas (Figura 2B) con una asíntota de 37.5 m, altura similar a la reportada por Santiago-García *et al.* (2013) de 38.98 m, por medio del modelo anamórfico de Hossfeld IV para la misma región de estudio. La eficiencia del modelo para otras especies la reportó Gómez-Tejero *et al.* (2009) quienes lo usaron en plantaciones de *Eucalyptus grandis*, en el estado de Oaxaca.

Los modelos de crecimiento en área basal evaluados explicaron de 71% (predicción) a 97% (proyección) de la variabilidad total observada (Cuadro 3). El modelo 8 de predicción obtuvo el sesgo promedio (\bar{E}) más bajo; a su vez, el modelo 9 evidenció los mejores estadísticos de ajuste (SCE, RECM, R^2_{adj} y AIC), en comparación con los modelos 10 y 11. Lo anterior complementado con el análisis gráfico donde se muestra que estos modelos 10 y 11 predicen un decrecimiento del área basal después de los 30 años (Figura 3A), se optó por los modelos 8 y 9 para describir el crecimiento en área basal al presentar un comportamiento lógico (Figura 3B) y valores adecuados en los estadísticos de ajuste.

Los modelos de volumen 14 y 15 presentaron los valores mejores en todos los estadísticos de ajuste, al sobrepasar por el sesgo promedio bajo (\bar{E}) de -0.536 y 1.333 m³, con todos los parámetros significativos

The evaluated models of growth in basal area explained 71% (prediction) to 97% (projection) of the total observed variability (Table 3). Prediction model 8 obtained the lowest average bias (\bar{E}), while model 9 exhibited better-fitted statistics (SSE, RMSE, R^2_{adj} and AIC) than models 10 and 11. All this complemented with the graphic analysis, which shows that models 10 and 11 predict a decrease in basal area after 30 years (Figure 3A). For this reason, we chose models 8 and 9 to describe growth in basal area, due to their logical behavior (Figure 3B) and their adequate fit values.

Volume models 14 and 15 had the best values in all the fit statistics and were outstanding for their low average bias (\bar{E}) of -0.536 and 1.333 m³, all parameters significant ($p < 0.001$) (Table 4). Moreover, they had a parsimonious structure. These models made coherent estimations in modeling total volume for *P. patula* plantations in the state of Veracruz (Parra-Piedra *et al.*, 2017).

The factor of biomass proportionality (δ_0) was estimated in 0.433 (equation 16) in pine-dominated stands; in each m³ of wood there is 0.433 Mg of biomass. The study zone has been managed for more than 30 years; over this time species composition and *Pinus patula* bole conformation have been modified by silvicultural treatments (Hernández-Pérez *et al.*, 2013).

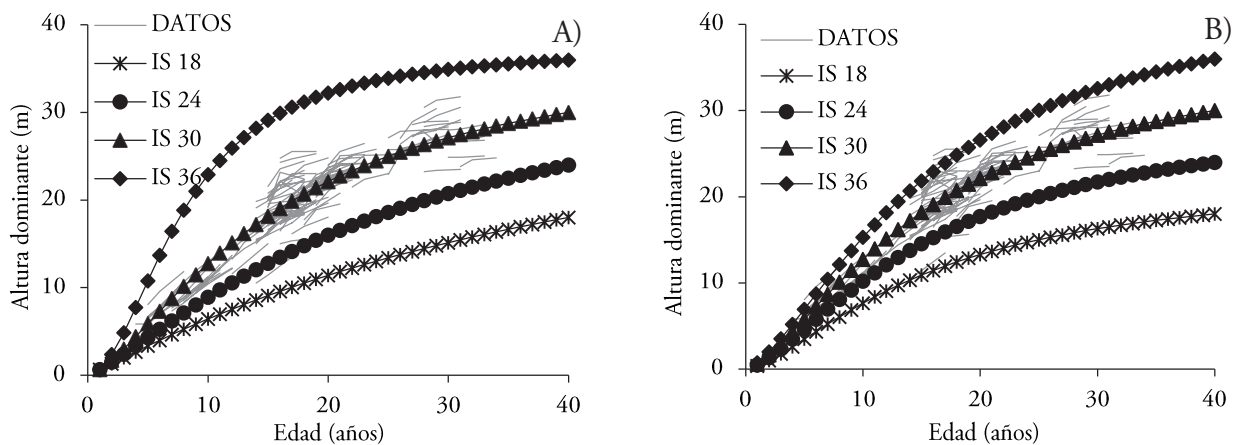


Figura 2. Curvas de índice de sitio para *Pinus patula* a la edad base de 40 años: A) Hossfeld IV polimórfico y B) Hossfeld IV anamórfico.

Figure 2. Site index curves for *Pinus patula* at the base age of 40 years: A) Hossfeld IV polymorphic and B) Hossfeld IV anamorphic.

Cuadro 3. Estadísticos de bondad de ajuste y parámetros estimados de los modelos de crecimiento en área basal.
Table 3. Goodness-of-fit statistics and estimated parameters of the models of growth in basal area.

Modelo	SCE	RECM	R ² adj	(\bar{E})	AIC	Parámetro	Valor	P > t
8	5209	4.780	0.713	-0.020	727.77	α_0	2.581	<0.0001
						α_1	0.308	0.0003
9	156	0.827	0.990	0.162	-81.592	α_2	-19.328	<0.0001
						α_3	0.004	<0.0001
						α_4	0.414	<0.0001
						α_0	-0.032	<0.9021
10	4299	4.337	0.766	0.349	683.423	α_1	-15.450	<0.0001
11	373	1.276	0.978	0.784	119.218	α_2	0.408	<0.0001
						α_3	0.419	<0.0001

($p < 0.001$) (Cuadro 4); además presentan una estructura parsimoniosa. Estos modelos presentaron estimaciones coherentes al modelar el volumen total en plantaciones de *P. patula*, en el estado de Veracruz (Parra-Piedra *et al.*, 2017).

El factor de proporcionalidad de biomasa (δ_0) se estimó en 0.433 (ecuación 16) en rodales dominados por pino, para indicar que en cada m³ de madera existe 0.433 Mg de biomasa. La zona de estudio ha estado bajo manejo por más de 30 años, tiempo en el cual se ha modificado la composición de especies y conformación de los fustes de *Pinus patula*, a través de los tratamientos silvícolas (Hernández-Pérez *et al.*, 2013).

Projection of timber yield and aerial biomass at different levels of initial density, with and without presence of hardwood species

When we evaluated the effect of initial density with the analysis of covariance, in the basal area and volume models (Table 5), we found that this effect does exist in these variables since all the parameters were significant ($p < 0.01$). We expected this behavior because both variables are highly related to density, and any change in density will affect them.

During the first years of the stand, hardwood species are relatively abundant. However, they begin to decrease between 10 and 15 years (Figure 4). This

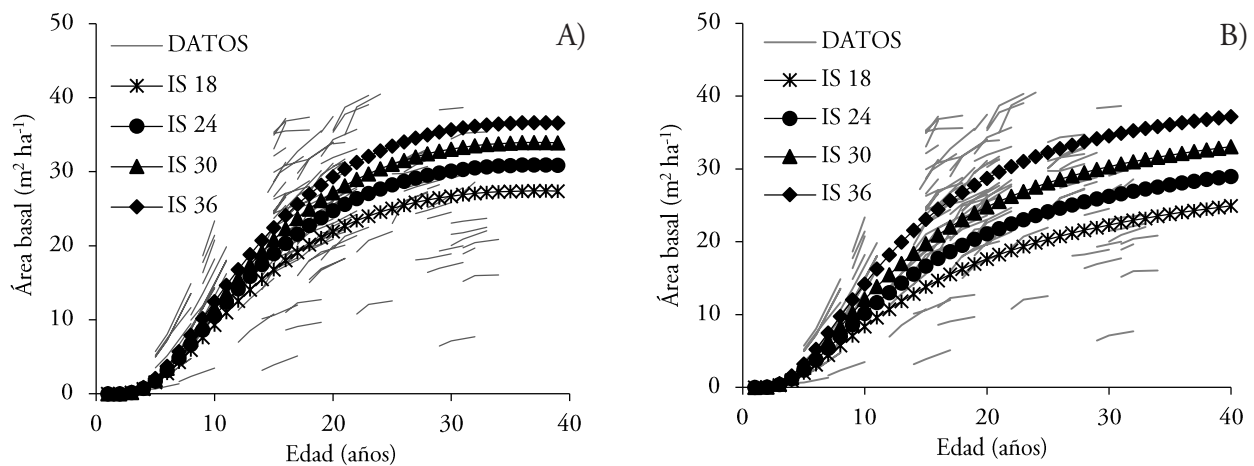


Figura 3. Curvas de área basal por índice de sitio generadas a partir de: A) los modelos 8 y 9 y B) Pienaar *et al.* (1990) para *Pinus patula*.

Figure 3. Basal area curves per site index curves generated from A) models 8 and 9, and B) Pienaar *et al.* (1990) for *Pinus patula*.

Cuadro 4. Estadísticos de bondad de ajuste y parámetros estimados de los modelos de volumen total y proporcionalidad de biomasa.

Table 4. Goodness of fit statistics and estimated parameters of the models of total volume and biomass proportionality.

Modelo	SCE	RECM	R ² adj	(\bar{E})	AIC	Parámetro	Valor	P > t
12	885591	62.186	0.666	2.275	1912.118	γ_0	1.710	<0.0001
13	159017	26.294	0.944	21.586	1515.436	γ_1	-0.776	<0.0001
						γ_2	0.439	<0.0001
14	13328	7.629	0.995	-0.536	942.757	γ_0	0.347	<0.0001
15	6198	5.191	0.997	1.333	765.925	γ_1	1.041	<0.0001
						γ_2	1.023	<0.0001
16	16604	6.791	0.980	-	-	δ_0	0.433	<0.0001

Proyección de rendimiento maderable y biomasa aérea en niveles diferentes de densidad inicial, sin y con presencia de latifoliadas

Al evaluar el efecto de la densidad inicial por medio de un análisis de covarianza, dentro de los modelos de área basal y volumen (Cuadro 5), se encontró que sí existe tal efecto en estas variables al ser todos los parámetros significativos ($p < 0.01$). Dicho comportamiento se esperaba porque estas variables tienen relación alta con la densidad y cualquier cambio en esta, las afectará.

En los primeros años del rodal la presencia de latifoliadas es relativamente abundante, sin embargo, entre los 10 y 15 años comienza a disminuir (Figura 4). Esta tendencia puede atribuirse a que

trend can be attributed to the use of the “Método de Desarrollo Silvícola” (MDS, Mexico’s standardized even-aged approach) and the seed-tree repopulation method used to produce timber in the region (Torres-Rojo *et al.*, 2016), which promotes even-aged mono-specific stands. The applied prescriptions have enabled a reduction of the proportion of hardwood species before the 40-year rotation.

Projection model 23, fitted for the proportion of hardwoods (Table 6), explained 97% of the variability, where τ_0 had a significant estimated value of 0.538. In re-fitting mortality model 25, as well as models 26 and 27 for basal area, with a reduction factor due to hardwood presence, significant differences were found among the values of the estimated parameters. This means that the actual proportion of hardwood species has an effect on the initial density at site.

Cuadro 5. Parámetros estimados y estadísticos de ajuste de los modelos con variables indicadoras para los diferentes niveles de densidad.

Table 5. Estimated parameters and fit statistics of the models with indicator variables for the different density levels.

Modelo	SCE	REMC	R ² adj	Parámetro	Valor	P > t
				α_0	2.220	<0.0001
				α_1	0.432	<0.0001
18	4245	4.324	0.765	α_2	-23.242	<0.0001
19	166	0.854	0.990	α_{3A}	0.005	<0.0001
				α_{3M}	0.005	<0.0001
				α_{3B}	0.002	<0.0001
				α_4	0.372	<0.0001
				γ_0	0.306	<0.0001
21	10229	6.698	0.996	γ_{1A}	1.025	<0.0001
22	6445	5.305	0.997	γ_{1M}	-0.016	<0.0001
				γ_{1B}	-0.007	<0.0001
				γ_2	1.094	0.0051

el aprovechamiento maderable en la región se realiza por medio del método de desarrollo silvícola (MDS) y el método de repoblación de árboles padres (Torres-Rojo *et al.*, 2016), el cual propicia rodales coetáneos uniespecíficos. Con las prescripciones que el método sugiere se ha logrado reducir las proporciones de especies latifoliadas antes del turno de 40 años.

El modelo 23 de proyección, ajustado para la proporción de latifoliadas (Cuadro 6), explicó el 97% de la variabilidad donde τ_0 , tuvo un valor estimado significativo de 0.538. En el reajuste del modelo 25 de mortalidad, así como los modelos 26 y 27 para el área basal, con un factor de reducción por presencia de latifoliadas se encontraron diferencias significativas entre los valores de los parámetros estimados, y esto indica que la densidad inicial también tiene un efecto en la proporción de latifoliadas presentes.

De acuerdo con las predicciones del rendimiento en volumen de pino para los índices de sitio y densidades iniciales, estas sugieren que en los IS 24, 30 y 36 los rendimientos al final del turno con una densidad inicial media son mayores en comparación con otras densidades evaluadas. Mientras que, en el IS 18 los rendimientos son similares para las tres densidades iniciales a lo largo del periodo de proyección (Figura 5).

Estas tendencias pueden deberse a que al presentar una densidad inicial mayor de 2000 árboles ha^{-1} , la competencia por los recursos del medio (espacio físico, agua, nutrientes y luz) se intensifica, y mientras no existan recursos adicionales disponibles el crecimiento no será el óptimo. Además, en una densidad

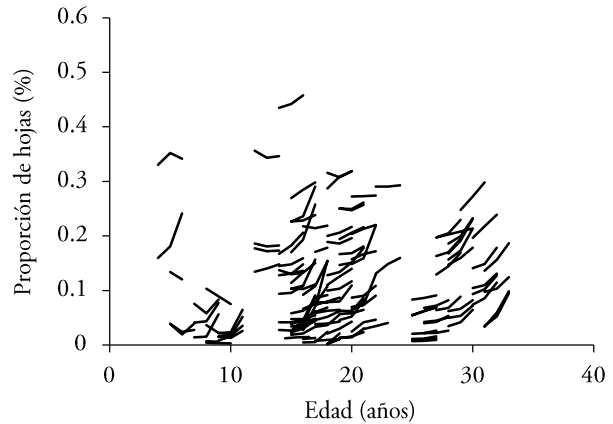


Figura 4. Proporción relativa del área basal de latifoliadas por sitio.

Figure 4. Relative proportion of hardwood basal area per site.

Yield predictions of Pine volume for site indexes and initial densities suggest that the yields at the end of the rotation, in SI 24, 30 and 36 with medium initial density are higher than other evaluated densities. In contrast, in SI 18 the yields are similar for the three initial densities over the projection period (Figure 5).

These trends may be due to the more intense competition for environmental resources (physical space, water, nutrients and light) when the initial density is more than 2000 trees ha^{-1} . Also, unless additional resources are available, pine growth will not be optimum. Moreover, at an initial density between 1000 and 2000 trees ha^{-1} , all the resources

Cuadro 6. Estadísticos de bondad de ajuste y parámetros estimados del modelo de proyección de proporción de latifoliadas y de los modelos de mortalidad y área basal seleccionados.

Table 6. Goodness-of-fit statistics and estimated parameters for the projection model proportion of hardwood species and of the selected mortality and basal area models.

Modelo	SCE	RECM	R ² adj	Parámetro	Estimación	P > t
23	0.066	0.016	0.967	τ_0	0.538	<0.0001
				θ_{1A}	0.024	<0.0001
25	262970	33.9614	0.997	θ_{1M}	-0.017	<0.0001
				θ_{1B}	-0.013	<0.0001
				α_0	2.094	<0.0001
				α_1	0.469	<0.0001
26	4189	4.295	0.769	α_2	-23.110	<0.0001
				α_{3A}	0.005	<0.0001
				α_{3M}	0.006	<0.0001
27	179	0.887	0.989	α_{3B}	0.002	<0.0001
				α_4	0.374	<0.0001

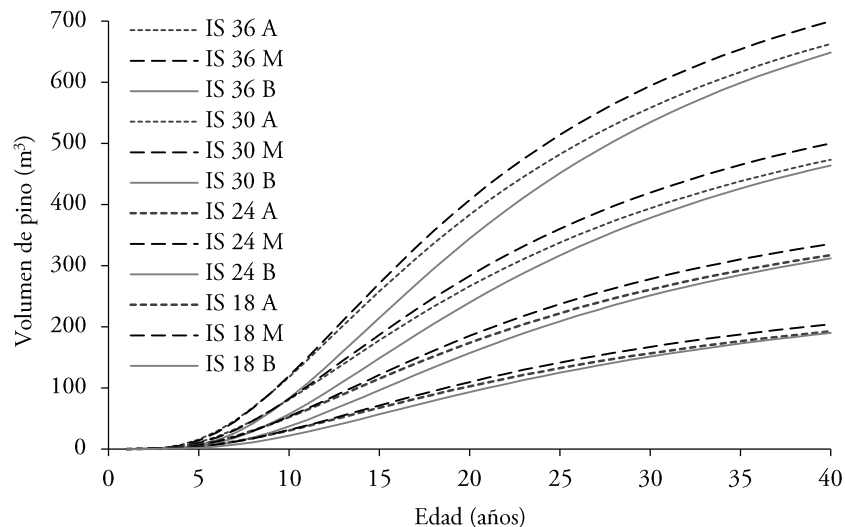


Figura 5. Volumen pino proyectado en las densidades, A (3000 árboles ha⁻¹), M (2000 árboles ha⁻¹) y B (950 árboles ha⁻¹) para los diferentes índices.

Figure 5. Pine volume projected in densities A (3000 trees ha⁻¹), M (2000 trees ha⁻¹) and B (950 trees ha⁻¹) for different indexes.

inicial entre 1000 y 2000 árboles ha⁻¹, todos los recursos del sitio se utilizan de tal forma que cada uno de los árboles asimila todo lo que su condición genética y edad le permiten. Una densidad inicial menor de 1000 árboles ha⁻¹, desaprovecha la capacidad productiva del sitio (Corral-Rivas *et al.*, 2015).

Lo observado en el IS 18 confirma la hipótesis de Langsaeter (1941) la cual establece que la producción de volumen total de un rodal, a una edad y composición determinadas, es constante y óptima en una gama amplia de densidades; en cambio los IS 24, 30 y 36 parecen no cumplir dicha hipótesis. Curtis *et al.* (1997) también reportaron este comportamiento en rodales de Douglas Fir, en los cuales observaron que el incremento del volumen total aumenta con la densidad.

Con los rendimientos dados en volumen de pino y pino más latifoliadas (proporción inicial de latifoliadas del 5% a los 5 años) en un IS 36, se destaca que en este sitio los rendimientos del volumen de pino son mayores por 57, 78 y 70 m³ que el volumen total en las densidades A, M y B, respectivamente (Figura 6). Esto indica que existe una reducción considerable del área disponible para *P. patula* en los sitios con productividad mayor y esto hace necesaria la aplicación de tratamientos silvícolas para el control de latifoliadas. Respecto a los índices de sitio de 18, 24 y 30, las diferencias en los rendimientos no fueron tan

of the site are used in such a way that each of the trees assimilates all that its genetic condition and age permit. An initial density below 1000 trees ha⁻¹ does not use all the productive capacity of the site (Corral-Rivas *et al.*, 2015).

All what was observed in SI 18 confirms the hypothesis of Langsaeter (1941), which establishes that total volume production of an even-aged stand with a given composition is constant and optimum in a broad spectrum of densities. In contrast, SI 24, 30 and 36 do not seem to comply with the hypothesis. Curtis *et al.* (1997) also reported this behavior in Douglas fir stands, where they observed that the total volume increases with density.

With the given yields in volume of pine and volume of pine plus hardwoods (5% as the initial proportion of hardwoods at an age of 5 years) in SI 36, it is outstanding that in this site pine volume yields are higher by 57, 78 and 78 m³ than the total volume, for the densities A, M and B, respectively (Figure 6). This indicates that there is a considerable reduction in area available for *P. patula* in the sites of higher productivity, making it necessary to apply silvicultural treatments to control hardwood species. Regarding site indexes 18, 24 and 30, the differences among yields were not evident; thus suggesting that in these sites, controlling growth of hardwood species or not, is irrelevant.

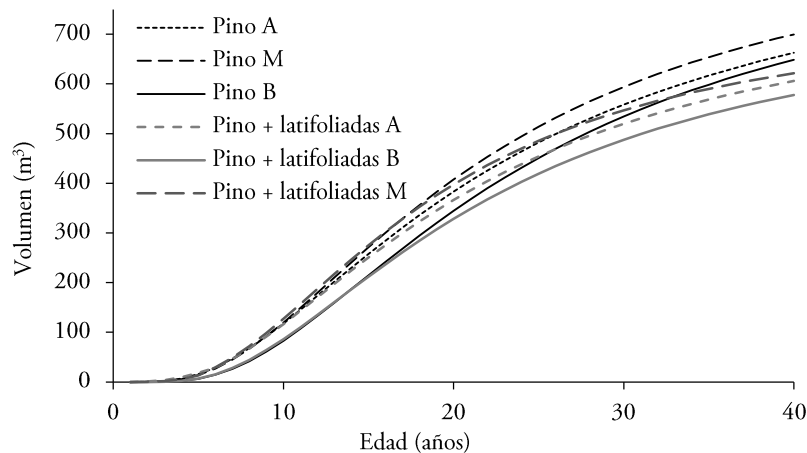


Figura 6. Volumen proyectado para las densidades, A (3000 árboles ha⁻¹), M (2000 árboles ha⁻¹) y B (950 árboles ha⁻¹) en un índice de sitio (IS) 36.

Figure 6. Projected volumes for densities A (3000 trees ha⁻¹), M (2000 trees ha⁻¹) and B (950 trees ha⁻¹) in a site index (SI) 36.

evidentes como en el caso presentado, lo cual sugiere que en esos sitios es indistinto controlar o no el crecimiento de las especies de latifoliadas.

Los valores mejores del ICA e IMA para la calidad de sitio promedio (IS 30) (Figura 7A) se obtuvieron en una densidad inicial de 2000 árboles ha⁻¹ en ambos escenarios (sin y con presencia de latifoliadas), aunque los incrementos fueron menores con la presencia de latifoliadas. Los de esta condición fueron los máximos en ese escenario, lo cual sugiere que la densidad inicial de los rodales debe estar entre 1000 y 2000 árboles ha⁻¹. Esto permitirá obtener los mejores rendimientos en volumen a la edad del turno.

La edad óptima de cosecha o turno técnico (ICA=IMA) para un IS 30 se estimó a los 24, 25 y 27 años, en la densidad de 3000, 2000 y 950 árboles ha⁻¹, respectivamente. Los turnos en volumen de pino al considerar la presencia de latifoliadas (5%) se obtuvieron a los 21, 20 y 23 años (Figura 7B). La competencia interespecífica redujo los turnos, lo cual en términos ecológicos tiene sentido porque la ocupación del espacio por las especies latifoliadas va limitando el crecimiento de *P. patula*, el cual alcanza su crecimiento máximo en edades más tempranas.

En todos los escenarios, los turnos técnicos se alcanzaron antes de los 30 años. Sánchez *et al.* (2003) mencionaron que los turnos tienden a ser más largos, cuando la calidad del sitio es cada vez más pobre y los turnos se acortan si la densidad del rodal es menor o se intensifican los aclareos.

The best values of ICA and IMA (in Spanish, current and mean annual increases) for the average site quality (SI 30) (Figure 7A) were obtained at an initial density of 2000 trees ha⁻¹ in both scenarios (with and without presence of hardwoods), although the increases were smaller with the presence of hardwood species. Sites of this condition were the highest in this scenario, suggesting that initial stand density should be between 1000 and 2000 trees ha⁻¹. This would allow the highest volume yields at the rotation age.

The optimum harvest age, or technical rotation, (CAI=MAI) for a SI 30 was estimated at 24, 25 and 27 years, at the densities of 3000, 2000 and 950 trees ha⁻¹, respectively. The pine volume rotation considering the presence of hardwoods (5%) were obtained at 21, 20 and 23 years (Figure 7B). Interspecific competition reduced rotations. This, in ecological terms, makes sense because occupation of the space by hardwood species limits growth of *P. patula*, which reaches maximum growth at earlier ages.

In all the scenarios, technical rotations were reached before 30 years. Sánchez *et al.* (2003) indicated that rotation tends to be longer when site quality is increasingly poor; but, rotations shorten if stand density is lower or thinning is intensified.

Incorporation of aerial biomass estimations in the GYS responds to the need to quantify and monitor accumulated biomass in the vegetation of forest

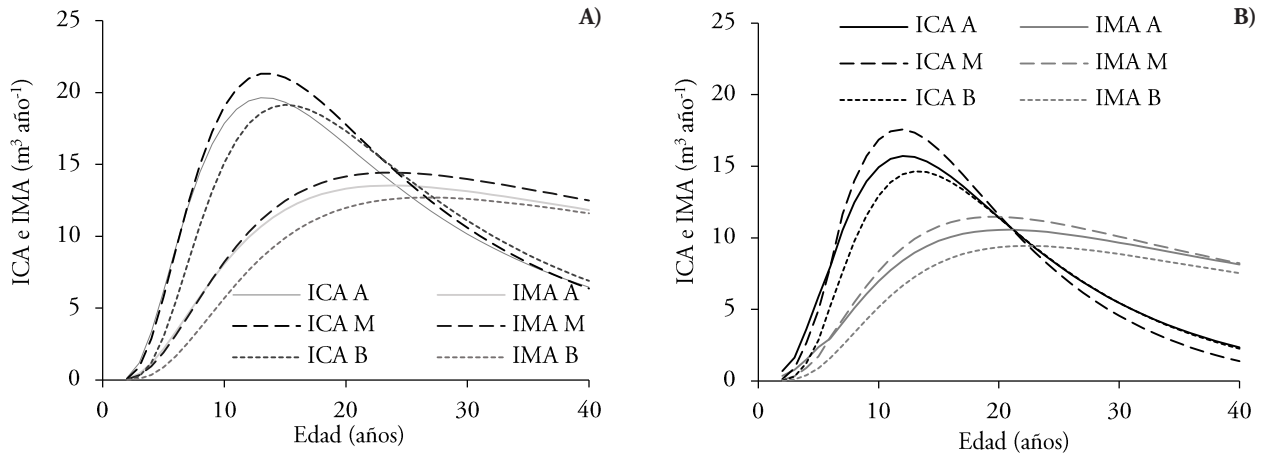


Figura 7. Curvas de incremento corriente anual en volumen total (ICA) e incremento medio anual (IMA) para las densidades, A (3000 árboles ha^{-1}), M (2000 árboles ha^{-1}) y B (950 árboles ha^{-1}) en un IS 30, donde: A) ICA e IMA sin presencia de latifoliadas; B) ICA e IMA con proporción inicial de latifoliadas del 5%.

Figure 7. Curves of current annual increment in total volume (ICA) and mean annual increment (IMA) for densities A (3000 trees ha^{-1}), M (2000 trees ha^{-1}) and B (950 trees ha^{-1}) in an SI 30, where A) ICA and IMA with no presence of hardwoods; B) ICA and IMA with an initial proportion of hardwoods of 5%.

La incorporación de estimaciones de biomasa aérea en el SCR atiende las necesidades de cuantificación y monitoreo de la biomasa acumulada en la vegetación de los ecosistemas forestales, las cuales son parte fundamental en la estimación del carbono almacenado. Tal estimación ha cobrado gran relevancia en la mitigación del cambio climático (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017).

La estimación de la biomasa aérea de pino acumulada al turno (Figura 8A) fue menor que la acumulación de biomasa total (pino más latifoliadas) en todas las calidades de estación. Esto es más evidente en los sitios menos productivos (IS 18 e IS 24), en los cuales la biomasa acumulada en promedio es mayor en 52 y 49 Mg ha^{-1} , respectivamente, al final del turno (40 años) para los tres niveles de densidad. El efecto tiene sentido porque la concentración de biomasa respecto al volumen de pino fue 0.43 mientras que en latifoliadas fue 0.81 Mg m^{-3} .

Las estimaciones de biomasa obtenidas en esta investigación permiten estimar los almacenes de carbono de los bosques de la región de Zacualtipán, Hidalgo, para poder ofertar bonos por captura de carbono (Ordóñez-Díaz *et al.*, 2015) y así obtener recursos para seguir con las labores de mantenimiento en las áreas destinadas a la conservación.

ecosystems, a fundamental part of estimating carbon stores, which has become highly relevant in climate change mitigation (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017).

Estimation of accumulated pine above-ground biomass at volume rotation age (Figure 8A) was less than total accumulated biomass (pines plus hardwoods) in all the site qualities. This is more evident in less productive sites (SI 18 and SI 24) on which average accumulated biomass is above 52 and 49 Mg ha^{-1} , respectively, at the end of the rotation (40 years) for the three density levels. The effect makes sense because the concentration of biomass, relative to pine volume, was 0.43, while in hardwoods it was 0.81 Mg m^{-3} .

The biomass estimations obtained in our study permit estimations of carbon stores of forests at the Zacualtipán region of Hidalgo, facilitating to offer carbon sequester bonds (Ordóñez-Díaz *et al.*, 2015) and to obtain resources for maintenance work in the areas destined to conservation.

CONCLUSIONS

Management of initial density is fundamental in maximizing timber yields. Mortality tends to decrease with the number of trees and is lower at initial densities

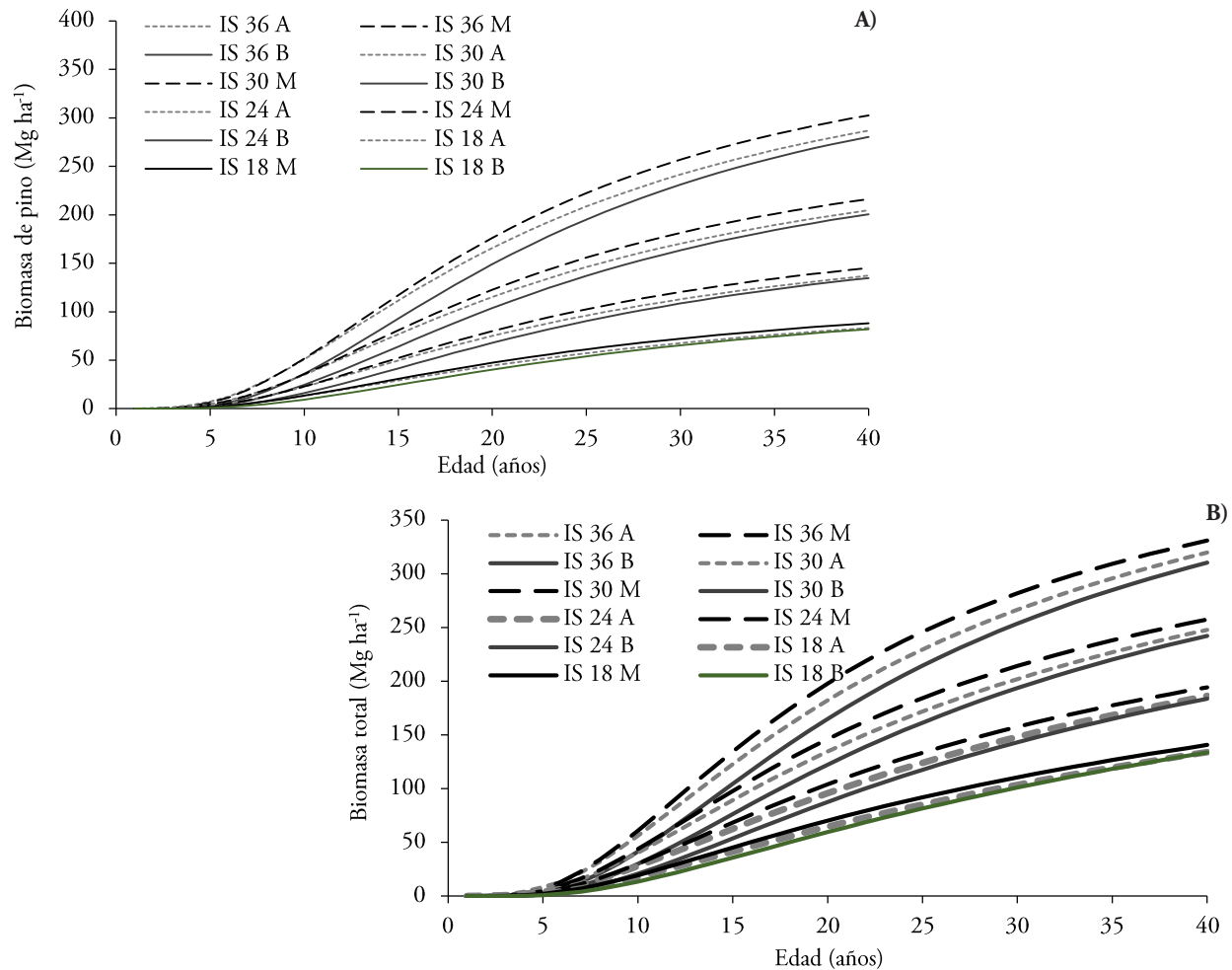


Figura 8. Biomasa aérea por índice de sitio para las densidades, A (3000 árboles ha⁻¹), M (2000 árboles ha⁻¹) y B (950 árboles ha⁻¹), donde: A) biomasa de pino sin presencia de latifoliadas, y B) biomasa total (pino más latifoliadas) con una proporción inicial del 5% de latifoliadas.

Figure 8. Above-ground biomass by site index for the densities A (3000 trees ha⁻¹), M (2000 trees ha⁻¹) and B (950 trees ha⁻¹), where A) pine biomass with no presence of hardwoods, and B) total biomass (pines plus hardwoods) with a 5% initial proportion of hardwoods.

CONCLUSIONES

El manejo de la densidad inicial es fundamental para maximizar el rendimiento maderable. La mortalidad tiende a decrecer de acuerdo con el número de árboles, y es menor en densidades iniciales menores a 1000 árboles ha⁻¹. Además, de esta densidad inicial depende la aplicación en el tiempo, y la forma de los tratamientos silvícolas prescritos en el programa de manejo. La redistribución del espaciamiento de los árboles y de la ocupación del sitio permitirá mejorar la producción total en volumen y aprovechar la productividad potencial de *Pinus patula*.

below 1000 trees ha⁻¹. In addition, the oportune and adequate application of prescribed silvicultural treatments within the management program depends on that initial density. Redistribution of tree spacing and site occupation will permit improving total volume production, thus taking advantage of the potential productivity of *Pinus patula*.

The estimated technical rotations under the different scenarios posed are shorter than the 40-year rotation used in the region. Shortening the absolute rotation and intensifying silvicultural treatments will increase stand profitability by promoting greater flows of timber in less time. Management of a mixed

Los turnos técnicos estimados bajo los diferentes escenarios planteados son menores que el turno de 40 años utilizado en la zona. El recorte del turno absoluto y la intensificación de los tratamientos silvícolas incrementarían la rentabilidad de los rodales al permitir mayores flujos de madera en menos tiempo. El manejo de un bosque mezclado producirá mayor biomasa aérea con un rendimiento en volumen de pino menor al final del turno, en tanto que si se prioriza la producción de madera es necesario disminuir la presencia de especies latifoliadas por medio de tratamientos silvícolas.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Paisajes Sustentables de la Agencia para el Desarrollo Internacional de Estados Unidos de América por el financiamiento de la investigación, a través de la Oficina de Programas Internacionales del Servicio Forestal del Departamento de Agricultura. A Northern Research Station, por el financiamiento a través del proyecto “Reducción de emisiones de gases de efecto invernadero y mejoramiento del manejo forestal en México”.

LITERATURA CITADA

Burkhart, H. E., and M. Tomé. 2012. *Modeling Forest Trees and Stands*. Springer, New York. 457 p.

Chávez-Aguilar, G., G. Ángeles-Pérez, M. Pérez-Suárez, M. A. López-López, E. García-Moya, y C. Wayson. 2016. Distribución de biomasa aérea en un bosque de *Pinus patula* bajo gestión forestal en Zacualtipán, Hidalgo, México. *Mad. y Bosq.* 22: 23-36.

Clutter, J. L., J. C. Forston, L. V. Pienaar, G. H. Brister, and R. L. Bailey. 1983. *Timber Management: A Quantitative Approach*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 333 p.

Cruz-Leyva, I. A., J. R. Valdez-Lazalde, G. Ángeles-Pérez, y H. M. de los Santos-Posadas. 2010. Modelación espacial de área basal y volumen de madera en bosques manejados de *Pinus patula* y *P. teocote* en el ejido Atopixco, Hidalgo. *Mad. y Bosq.* 16:75-97.

Corral-Rivas, S., J. G. Álvarez-González, J. J. Corral-Rivas, C. Wehenkel, y C. A. López-Sánchez. 2015. Diagramas para el manejo de la densidad en bosques mixtos e irregulares de Durango, México. *Bosque* 36: 409-421.

Curtis, R. O., D. D. Marshall, and J. F. Bell. 1997. LOGS: A pioneering example of silvicultural research in coast Douglas-Fir. *J. For.* 95: 19-25.

Daniel, T. W., J. A. Helms, y F. S. Baker. 1982. *Principios de Silvicultura*. McGraw-Hill. México. 442 p.

Fierros-Mateo, R., H. M. de los Santos-Posadas, M. A. Fierros-González, y F. Cruz-Cobos. 2017. Crecimiento y rendimiento maderable en plantaciones de *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen. *Agrociencia* 51: 201-214.

Figuroa-Navarro, C. M. G. Ángeles-Pérez, A. Velázquez-Martínez y H. M. de los Santos-Posadas. Estimación de la biomasa

forest will produce more above-ground biomass with a lower pine volume yield at the end of the rotation, while if timber production is prioritized, it is necessary to diminish the presence of hardwood species through silvicultural treatments.

—End of the English version—

-----*-----

en un bosque bajo manejo de *Pinus patula* Schltld. et Cham. en Zacualtipán, Hidalgo. 2010. *Rev. Mex. Cienc. For.* 106: 105-112.

Gómez-Tejero, J., H. M. de los Santos-Posadas, A. M. Fierros-González, y J. R. Valdez-Lazalde. 2009. Modelos de crecimiento en altura dominante para *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden y *E. urophylla* S. T. Blake en Oaxaca, Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 161 – 169.

Hernández-Pérez, D., H. M. de los Santos-Posadas, G. Ángeles-Pérez, J. R. Valdez-Lazalde, y V. H. Volke-Haller. 2013. Funciones de ahusamiento y volumen comercial para *Pinus patula* Schltld. et Cham. en Zacualtipán, Hidalgo. *Rev. Mex. Cienc. For.* 4: 34-45.

Langsaeter, A. 1941. Omtytning I enaldret gran-og furuskog. *Meddelelser. Fra Det norske Skogforsøksvesen* 8: 131-216.

Lugo, A. E. and F. N. Scatena. 1996. Background and catastrophic tree mortality in tropical moist, wet, and rain forests. *Biotropica* 28: 585-599.

Martin, S. W., and G. H. Brister. 1999. A growth and yield model incorporating hardwood competition for natural *loblolly pine* stands in the Georgia Piedmont. *Southern J. Appl. For.* 23: 179-185.

Ordóñez-Díaz J. A. B., R. Rivera-Vázquez, M. E. Tapia-Medina, y L. R. Ahedo-Hernández. 2015. Contenido y captura potencial de carbono en la biomasa forestal de San Pedro Jacuaro, Michoacán. *Rev. Mex. Cienc. For.* 6: 7-16.

Palacios-Cruz, D. J., H. M. De los Santos-Posadas, G. Ángeles-Pérez, A. M. Fierros-González, y W. Santiago-García. 2020. Sistema de crecimiento y rendimiento para evaluar sumideros de carbono en bosques de *Pinus patula* Schiede ex Schltld. et Cham. bajo aprovechamiento forestal. *Agrociencia* 54: 241-257.

Parra-Piedra, J. P., H. M. de los Santos-Posadas, A. M. Fierros-González, J. R. Valdez-Lazalde y J. L. Romo-Lozano. 2017. Proyección explícita e implícita del rendimiento maderable de plantaciones forestales comerciales de *Pinus patula* Schiede ex Schltld. et Cham. *Agrociencia* 51: 455-470.

Pienaar, L.V., H. Page, and J. W. Rheney. 1990. Yield prediction for mechanically site-prepared *Slash pine* plantations. *Southern J. Appl. For.* 14: 104–109.

Pretzsch, H. 2009. *Forest Dynamics, Growth and Yield: From Measurement to Model*. Springer-Verlag. Berlín, Heidelberg. Alemania. 664 p.

Quiñonez-Barraza, G., H. M. De los Santos-Posadas, F. Cruz-Cobos, A. Velázquez-Martínez, G. Ángeles-Pérez, y G. Ramírez-Valverde. 2015. Índice de sitio con polimorfismo

- complejo para masas forestales de Durango, México. *Agrociencia* 49: 439-454.
- Ramírez-Ramírez, G., J. M. Dupuy-Rada, L. Ramírez-Avilés, y F. J. Solorio. 2017. Evaluación de ecuaciones alométricas de biomasa epigea en una selva mediana subcaducifolia de Yucatán. *Mad. y Bosq.* 23: 163-179.
- Sánchez, F., R. Rodríguez, A. Rojo, J. G. Álvarez, C. López, J. Gorgoso, y F. Castedo. 2003. Crecimiento y tablas de producción de *Pinus radiata* D. Don en Galicia. *Inv. Agraria: Sist. y Rec. For.* 12: 65-83.
- Santiago-García, W., H. M. de los Santos-Posadas, G. Ángeles-Pérez, J. R. Valdez-Lazalde, y G. Ramírez-Valverde. 2013. Sistema compatible de crecimiento y rendimiento para rodales coetáneos de *Pinus patula*. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 163-172.
- Santiago-García, W., H. M. De los Santos-Posadas, G. Ángeles-Pérez, J. J. Corral-Rivas, J. R. Valdez-Lazalde, y D. H. Del Valle-Paniagua. 2014. Predicción del rendimiento maderable de *Pinus patula* Schl. et Cham. a través de modelos de distribución diamétrica. *Agrociencia* 48: 87-101.
- Santiago-García, W., H. M. de los Santos-Posadas, G. Ángeles-Pérez, J. R. Valdez-Lazalde, J. J. Corral-Rivas, G. Rodríguez-Ortiz, y E. Santiago-García. 2015. Modelos de crecimiento y rendimiento de totalidad del rodal para *Pinus patula*. *Mad. y Bosq.* 21: 95-110.
- Santiago-García, W., E. Pérez-López, G. Quiñonez-Barraza, G. Rodríguez-Ortiz, E. Santiago-García, F. Ruiz-Aquino, and J. C. Tamarit-Urias. 2017. A dynamic system of growth and yield equations for *Pinus patula*. *Forests* 8: 465-478.
- SAS Institute. 2008. Statistical Analysis System SAS/STAT 9.0 User's Guide. SAS Institute, Inc. Raleigh, NC. USA. 248 p.
- Soriano-Luna, M. A., G. Ángeles-Pérez, T. Martínez-Trinidad, F. O. Plascencia-Escalante, y R. Razo-Zárate. 2015. Estimación de biomasa aérea por componente estructural en Zacualtipán, Hidalgo, México. *Agrociencia* 49: 423-438.
- Vargas-Larreta, B., J. J. Corral-Rivas, O. A. Aguirre-Calderón, J. O. López-Martínez, H. M. de los Santos-Posadas, F. J. Zamudio-Sánchez, E. J. Treviño-Garza, M. Martínez-Salvador, y C. G. Aguirre-Calderón. 2017. SiBiFor: Sistema Biométrico Forestal para el manejo de los bosques de México. *Rev. Chapingo Serie Cienc. For. y del Amb.* 23: 437-455.
- Torres-Rojo, J. M., R. Moreno-Sánchez, and M. A. Mendoza-Briseño. 2016. Sustainable forest management in Mexico. *Current Forestry Reports* 2: 93-105.
- Torres, J. M. y O. S. Magaña. 2001. Evaluación de Plantaciones Forestales. Limusa, México. 472 p.
- Zeide, B. 2004. Optimal stand density: a solution. *Can. J. Forest Res.* 34: 846-854.

FACTIBILIDAD DE COBERTURA DEL PRECIO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) EN MÉXICO CON EL MERCADO DE FUTUROS FORÁNEO DE EE. UU.

MEXICAN CORN (*Zea mays* L.) PRICE HEDGE FEASIBILITY WITH THE US FOREIGN FUTURES MARKET

M. Ángel **Martínez-Damián**^{*}, J. de Jesús **Brambila-Paz**, J. Saturnino **Mora-Flores**

Economía. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (angel01@colpos.mx).

RESUMEN

La administración de riesgo de precio para la producción de maíz tiene un componente de precios de garantía. Sin embargo, no hay cobertura universal y las propias reglas de operación señalan que no son elegibles productores mayores a 20 ha. Esto deja descubierto parte de la producción nacional de maíz que aún tiene que administrar riesgo de precio. Una herramienta de administración de riesgo de precio es el mercado de derivados; institución ausente en México. Una alternativa es administrar este riesgo en un mercado de futuros foráneo, lo que requiere fijar un precio en una moneda extranjera bajo las condiciones de dicho mercado foráneo. Para que una cobertura de este tipo sea potencialmente eficiente es necesario que exista una relación estable entre precios domésticos, precios futuros foráneos y tasa de cambio. Con un enfoque de series de tiempo vectoriales la hipótesis evaluada incluye un vector cointegrante entre las variables precio doméstico, precio futuro y tasa de cambio, y por lo tanto proyecta una administración de riesgo efectiva del precio doméstico del maíz (*Zea mays* L.) a partir del precio futuro de maíz cotizado en Chicago. Los resultados muestran que no se puede rechazar la existencia de una relación de largo plazo entre los precios doméstico y futuro de maíz con la mediación de la tasa de cambio. Esto significa la existencia de un potencial de cobertura, a pesar de un precio futuro foráneo y la propia tasa de cambio peso dólar.

Palabras clave: mercados futuros foráneos, cobertura de precios, modelo de corrección de error, raíz unitaria, cointegración.

INTRODUCCIÓN

La variabilidad del precio es una fuente de riesgo para los productores sin cobertura del programa de precios de garantía, ya sean productores

^{*} Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 575-587. 2020.

ABSTRACT

Price risk management for corn production has a support price component; however, this is not universal and the operating rules themselves indicate that producers having over 20 ha are not eligible. This reveals part of the national corn production that has yet to manage price risk. A price risk management tool is a derivative market, which is non-existent in Mexico. An alternative is to manage this risk in a foreign futures market, which requires setting a price in a foreign currency under the conditions of that foreign market. For such hedge to be potentially efficient, the necessity of a stable relationship between domestic prices, future foreign prices and the exchange rate is essential; using a vector time series approach, the assessed hypothesis includes a cointegrating vector between the domestic price, future price and exchange rate variables, and therefore shows an effective risk management of the domestic price of corn (*Zea mays* L.) from the future corn price quoted in Chicago. Results show that the existence of a long-term relationship between the domestic and future prices of corn with the exchange rate mediation cannot be rejected. This implies the existence of a hedging potential, despite a foreign future price and the peso-dollar exchange rate itself.

Key words: foreign futures markets, price hedge, error correction model, unit root, cointegration.

INTRODUCTION

Price variability is a source of risk for producers not included in the support price program, whether they are eligible producers or not, which is why a risk management tool is required. The Mexican government, as of 2019, proposed once again a support price program¹; however, the operating rules no longer provide support for those producers with more than 20 ha. The lack of census or

elegibles o no, por lo cual se requiere una herramienta de administración del mismo. El gobierno federal a partir de 2019 ha propuesto nuevamente un programa de precios de garantía¹, sin embargo, en las reglas de operación ya no se contemplan apoyos para aquellos productores con más de 20 ha. La falta de empadronamiento o el exceder 20 ha aún puede dejar expuestos a variabilidad de precio a un importante porcentaje de los productores nacionales de maíz².

En México se carece de mercado de futuros para productos agrícolas y esto elimina posibilidades de administración de riesgo de precio. Una alternativa para el tomador de decisiones en México es administrar este riesgo a través de mercados de futuros extranjeros y el más cercano es el de EE.UU. En este caso, el productor en México puede vender a futuro a precio fijo (sobre todo si anticipa que el precio pudiera ser menor al cotizado), por lo tanto contrata cobertura y se cubre contra la caída de precio en el futuro, es decir, del precio al cosechar. Al llegar el vencimiento, deberá cancelar el contrato con una operación contraria, es decir la compra de contratos de futuro.

Si el precio efectivamente cae, entonces al momento de comprar se puede obtener una ganancia (pérdida en el evento contrario). Sin embargo, desde el punto de vista del tomador de decisiones doméstico, la tasa de cambio puede afectar la operación de cobertura. Es decir, para operar una cobertura de precio en moneda extranjera, fijar el precio en dólar aún puede afectar al comprador de cobertura debido a que, al momento de cancelar la cobertura, la tasa de cambio puede subir, en cuyo caso se tomaría una

the fact of exceeding 20 ha may expose national corn producers to a significantly wide price variability².

There is no futures market for agricultural products in Mexico; this eliminates management possibilities of price risk. An alternative for decision makers in Mexico is to manage this risk through a foreign futures market and the US is the closest. In this case, producers in Mexico can sell in the future at a fixed price (especially if they anticipate that the price could be lower than the quoted price); therefore, they contract hedging against a price fall in the future, that is, the price at harvest. Upon expiration, they must cancel the contract with a purchase of future contracts.

If the price actually falls, then at the time of purchase it is possible to make a profit (a loss in the opposite case). However, from the point of view of domestic decision makers, the exchange rate can affect the hedging operation. In other words, to operate a hedge in foreign currency, setting the price in dollars can still affect the hedge buyer because at the time of paying the exchange rate may rise, in which case there would be a loss not for the price hedge in corn, but a loss as a result of the exchange rate (Govindaray and Turvey, 2000).

In the present study we explored the effect of contracting price hedge for corn (*Zea mays* L.) from the point of view of Mexican decision makers in the US futures market. This issue was analyzed in Canada with an optimal hedge ratio approach (Govindaray and Turvey, 2000); in Mexico as well, but the effect of the exchange rate was ignored (Martínez and García, 2010; Echánove, 2015; Guizar *et al.*, 2012).

¹<https://www.gob.mx/sader/acciones-y-programas/programas-sader-2019-194732>

²Con la información disponible no es fácil construir este número; sin ser objeto de este estudio, se puede tener una idea del problema a partir de algunos datos: del total de la producción nacional (la cual se caracteriza por el minifundio); Robles (2013) muestra que el 86.4 y 85.2% de las unidades de producción dedicadas a maíz blanco y amarillo, respectivamente, tienen menos de 10 ha. También, unidades de producción menores a 5 ha participan con el 39% de la producción agrícola (IICA), lo que directamente implica una concentración de la producción en agricultores con más de 5 ha, cuyo número es menor; además, la cobertura de programas gubernamentales entre el total de productores era aproximadamente 57% (Robles, 2013). Si se considera el rendimiento en temporal de 2.2 Mg ha⁻¹ y el rendimiento en riego de 8 Mg ha⁻¹ junto con los datos de tamaño de predio y la cobertura de programas gubernamentales, se infiere que gran parte de la producción de maíz queda expuesta a riesgo de precio ♦ With the available information, it is not easy to reach this number; putting aside for a moment the objective of this study, you can get an idea of the problem from some data: of the total national production (which is characterized by the smallholding); Robles (2013) shows that 86.4 and 85.2% of the production units dedicated to white and yellow corn, respectively, have less than 10 ha. Also, production units of less than 5 ha participate with 39% of agricultural production (IICA), which directly implies a concentration of production in farmers with more than 5 ha, whose number is less; besides, the coverage of government programs among total producers was approximately 57% (Robles, 2013). If we consider the yield under rainfed of 2.2 Mg ha⁻¹ and the yield under irrigation of 8 Mg ha⁻¹ together with the data of property size and the coverage of government programs, we infer that a large part of corn production is exposed to price risk.

pérdida no por la cobertura de precio en maíz, sino por una pérdida en el tipo de cambio (Govindaray y Turvey, 2000).

Aquí se investiga el efecto de contratar cobertura del precio de maíz (*Zea mays* L.) desde el punto de vista del tomador de decisiones mexicano en el mercado de futuros de EE.UU. El tema se estudió en Canadá con un enfoque de razón de cobertura óptima (Govindaray y Turvey, 2000); en México se investigó, pero se ignoró el efecto de la tasa de cambio (Martínez y García, 2010; Echánove, 2015; Guizar *et al.*, 2012).

Una operación de cobertura envuelve operaciones de compra y venta de contratos de futuros denominados en divisa, y la ganancia o pérdida en dicha operación depende de una combinación lineal entre ellas. Si existe una combinación lineal estable entre precio doméstico, precio futuro y tasa de cambio, se anula la posibilidad de ganancia (pérdida) sistemática de una cobertura (Vukina y Holthausen, 1996), lo cual da como resultado una administración de riesgo eficiente. Entonces, la hipótesis propuesta es que existe una relación de largo plazo entre el precio futuro y la tasa de cambio y que, por lo tanto, al administrar riesgo de precio doméstico se debe considerar el efecto de ambas variables por igual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un tomador de decisiones doméstico que desea administrar riesgo de precio puede hacer la siguiente comparación: el precio esperado de contado al momento t que se pagará en $t+j$ contra el precio futuro cotizado al tiempo t pagadero al momento $t+j$ (Govindaray y Turvey, 2000):

$$E_t(PC_{t+j}^{mx}) \text{ vs } E_t(TC_{t+j}) * PF_{t+j}^{us}$$

donde: E_t es el operador esperanza valuado al momento t ; PC_{t+j}^{mx} es el precio de contado en México al momento $t+j$; TC_{t+j} es la tasa de cambio peso/dólar; PF_{t+j}^{us} es el precio en el mercado de futuros en EE.UU.

Si se espera que el precio de contado en $t+j$ sea menor a lo que en el momento t cotiza el precio futuro con vencimiento en $t+j$, se presenta la oportunidad de asegurar por anticipado el precio (para un comprador a futuro la oportunidad aparece contraria al no convenirle una subida de precio). Esta condición de comparación debe necesariamente tomar en cuenta la tasa de cambio, debido a que esto puede afectar la cobertura planeada.

A hedging transaction involves purchase and sale operations of foreign currency-denominated futures contracts, and the gain or loss on these transactions depends on a linear combination between them. If there is a stable linear combination between domestic price, future price and exchange rate, the possibility of systematic gain (loss) of a hedge is null (Vukina and Holthausen, 1996), which results in efficient risk management. Therefore, the hypothesis proposed is that there is a long-term relationship between the future price, the domestic price and the exchange rate, and therefore, when managing domestic price risk, the effect of both variables should be considered equally.

MATERIALS AND METHODS

A domestic decision maker who wishes to manage price risk can make the following comparison: the expected spot price at time t to be paid at $t+j$ versus the future price quoted at time t payable at time $t+j$ (Govindaray and Turvey, 2000):

$$E_t(PC_{t+j}^{mx}) \text{ vs } E_t(TC_{t+j}) * PF_{t+j}^{us}$$

where: E_t is the hope operator valued at time t ; PC_{t+j}^{mx} is the spot price in Mexico at time $t+j$; TC_{t+j} is the peso/dollar exchange rate; PF_{t+j}^{us} is the price in the US futures market.

If the spot price in $t+j$ is expected to be less than the quoted future price at t with maturity at $t+j$, the opportunity arises of locking the price in advance (for a future buyer the opportunity turns out the opposite as a price increase is not convenient). This comparison condition must necessarily take into account the exchange rate since it can affect the planned hedge. In the formation of price expectations, it will be assumed that the future price is an unbiased estimator of the spot price, in which case the difference or the base is a random variable (but the evidence for this is not clear according to Alarcón *et al.*, 2008 and Bopp and Lady, 1991); similarly, it is assumed that the formation of the exchange rate expectation will also occur without bias.

In this comparison, if the expected spot price in t due at time $t+j$ is less than what can be obtained in a futures market, then a hedging transaction is worthwhile; this implies the sale of futures contracts at the price quoted in t (sale in advance). At time $t+j$, if the price expectation is confirmed i.e. the spot price falls; while the future price falls in $t+j$; then when canceling the sale, which is to buy future contracts, there will be a profit for such purchase/sale operation. This income compensates the loss in spot price, which is the objective of a hedge (Vukina and Holthausen, 1996).

En la formación de expectativas de precio se supondrá que el precio futuro es un estimador insesgado del precio de contado, en cuyo caso la diferencia o la base es una variable aleatoria (pero la evidencia de esto no es clara según Alarcón *et al.*, 2008 y Bopp y Lady, 1991); de manera análoga se supondrá que la formación de expectativa de tasa de cambio ocurre también sin sesgo.

En esta comparación, si el precio de contado esperado en t al tiempo $t+j$ es menor a lo que se puede obtener en un mercado de futuros, entonces conviene una operación de cobertura; esto implica la venta de contratos de futuro al precio cotizado en t (venta anticipada). Al momento $t+j$, si la expectativa de precios es confirmada i.e. cae el precio de contado; al tiempo que cae el precio futuro en $t+j$; entonces al cancelar la venta, que es comprar contratos de futuro, se tendrá un ingreso por dicha operación de compra/venta. Este ingreso compensa la pérdida en precio de contado, que es el objetivo de una cobertura (Vukina y Holthausen, 1996).

Debe notarse que, para el operador doméstico, la tasa de cambio afecta esta posibilidad, lo cual dificulta la administración de riesgo de precio. Para que una cobertura en un mercado de futuros foráneo resulte eficiente, es necesario que la señal de precios que se recibe (ya considerada la tasa de cambio) siga un comportamiento semejante al precio de contado doméstico, y la condición de indiferencia es entonces (Govindaray y Turvey, 2000):

$$E_t(PC_{t+j}^{mx}) = TC_{t+j}^e * PF_{t+j}^w \tag{1}$$

donde: E_t denota el valor esperado con la información disponible en el momento t ; PC_{t+j}^{mx} denota al precio de contado en México; TC_{t+j}^e es la tasa de cambio peso-dólar esperada en t para $t+j$; PF_{t+j}^w es la cotización actual del precio futuro con vencimiento a $t+j$.

Si se toma logaritmos a (1) se obtiene:

$$E_t(LnPC_{t+j}^{mx}) = LnTC_{t+j}^e + LnPF_{t+j}^w$$

Si se considera dicho valor esperado como una función lineal sujeta a un error estocástico, entonces el valor observado del precio de contado se puede escribir como:

$$LnPC_{t+j}^{mx} = E_t(LnPC_{t+j}^{mx}) + \varepsilon_{t+j}$$

con:

$$E_t(LnPC_{t+j}^{mx}) = \theta_0 + \theta_1 LnTC_{t+j}^e + \theta_2 LnPF_{t+j}^w$$

se obtiene el siguiente modelo econométrico:

It should be noted that for the domestic operator the exchange rate affects this possibility, which makes it difficult to manage price risk. For a hedge in a foreign futures market to be efficient, it is necessary that the price signal received (already considering the exchange rate) follows a behavior similar to the domestic spot price, and the condition of indifference is then (Govindaray and Turvey, 2000):

$$E_t(PC_{t+j}^{mx}) = TC_{t+j}^e * PF_{t+j}^w \tag{1}$$

where: E_t denotes the expected value with the information available at time t ; PC_{t+j}^{mx} denotes the spot price in Mexico; TC_{t+j}^e is the expected peso-dollar exchange rate in t due at $t+j$; PF_{t+j}^w is the current quotation of the future price due at $t+j$.

If we take logarithms to (1) we obtain:

$$E_t(LnPC_{t+j}^{mx}) = LnTC_{t+j}^e + LnPF_{t+j}^w$$

If this expected value is considered as a linear function subject to a stochastic error, then the observed spot price value can be written as:

$$LnPC_{t+j}^{mx} = E_t(LnPC_{t+j}^{mx}) + \varepsilon_{t+j}$$

with:

$$E_t(LnPC_{t+j}^{mx}) = \theta_0 + \theta_1 LnTC_{t+j}^e + \theta_2 LnPF_{t+j}^w$$

the following econometric model is obtained:

$$LnPC_{t+j}^{mx} = \theta_0 + \theta_1 LnTC_{t+j}^e + \theta_2 LnPF_{t+j}^w + \varepsilon_{t+j} \tag{2}$$

where, under perfect arbitrage, it would be expected θ_0 to be zero, or to capture transaction costs.

When deciding whether to buy hedge or not, the model expressed in (2) can be used to construct a price expectation (Prototopadakis and Stoll, 1983). However, this model may not be useful for making hedge recommendations due to the possible presence of unit roots (Arias and Segura, 2000), and consequently the spurious regression problem (Granger and Newbold, 1974).

It should be noted, however, that if there is a stable linear combination between these variables, then (2) can be thought of as a useful condition when deciding on hedge acquisition. This involves testing the hypothesis that such a linear combination exists, the cointegration hypothesis (Johansen, 1991). If this

$$\ln PC_{t+j}^{mx} = \theta_0 + \theta_1 \ln TC_{t+j} + \theta_2 \ln PF_{t+j}^{us} + \varepsilon_{t+j} \quad (2)$$

donde, bajo arbitraje perfecto se esperaría que θ_0 fuera cero, o bien, que captara costos de transacción.

Cuando se decide comprar o no cobertura se puede emplear el modelo expresado en (2) para la construcción de una expectativa de precio (Protopapadakis y Stoll, 1983). Sin embargo, este modelo puede no ser útil para hacer recomendaciones de cobertura debido a la posible presencia de raíces unitarias (Arias y Segura, 2000) y en consecuencia, al problema de regresión espuria (Granger y Newbold, 1974).

Debe notarse, sin embargo, que si existe una combinación lineal estable entre estas variables entonces se puede pensar en (2) como una condición útil cuando se decide por adquisición de cobertura. Esto implica contrastar la hipótesis de que exista dicha combinación lineal, hipótesis de cointegración (Johansen, 1991). Si no se rechaza esa hipótesis de cointegración, entonces se concluye que existe una relación de largo plazo entre las mencionadas variables, misma que puede hacer atractiva la decisión de cobertura.

Aquí se emplean datos de cuatro centrales de abasto³, datos de tasa de cambio⁴ y datos del precio futuro del maíz cotizado en el CBOT⁵. Las cuatro alternativas analizadas fueron las centrales de abasto de Sinaloa, Jalisco, Ecatepec e Iztapalapa en el periodo de estudio de enero de 1988 a diciembre 2017.

Con el modelo en (2) se presenta una versión de un modelo vectorial autorregresivo:

$$Y_t = \Phi_0 + \sum_{i=1}^p \Phi_i Y_{t-i} + \varepsilon_t \quad (3)$$

donde: Y_t es un vector 3×1 compuesto por precio local, precio futuro y tasa de cambio peso - dólar al momento t ; Φ_0 es un vector 3×1 de ordenadas al origen; Φ_i es una matriz 3×3 de coeficientes autorregresivos; p es el orden del vector autorregresivo y ε_t es un vector 3×1 de error de observación con $E(\varepsilon_t) = 0$ y $E(\varepsilon_t \varepsilon_t') = \sigma^2 I$.

Si en esta representación no se rechaza la hipótesis de cointegración entonces se puede optar por una representación vectorial de corrección de error donde la combinación lineal implícita en (2) se plantea como relación de largo plazo en el modelo:

$$\Delta Y_t = \Pi Y_{t-1} + \sum_{i=1}^{p-1} \Phi_i \Delta Y_{t-i} + \varepsilon_t \quad (4)$$

cointegración hypothesis is not rejected, then we may conclude that there is a long-term relationship between the aforementioned variables, which can make the hedge decision attractive.

We used here data from four supply centers³ (grocery markets), exchange rate data⁴ and data on the future price of corn quoted in the CBOT⁵. The four alternatives analyzed were the Sinaloa, Jalisco, Ecatepec and Iztapalapa grocery markets in the study period from January 1988 to December 2017.

With the model in (2) a version of a vector autoregressive model is shown:

$$Y_t = \Phi_0 + \sum_{i=1}^p \Phi_i Y_{t-i} + \varepsilon_t \quad (3)$$

where: Y_t is a 3×1 vector composed of local price, future price and peso-dollar exchange rate at time t ; Φ_0 is a 3×1 vector of intercepts; Φ_i is a 3×3 matrix of autoregressive coefficients; p is the order of the autoregressive vector and ε_t is a 3×1 error vector of observation with $E(\varepsilon_t) = 0$ and $E(\varepsilon_t \varepsilon_t') = \sigma^2 I$.

If in this representation the cointegration hypothesis is not rejected, then it is possible to choose a vector error correction representation where the implicit linear combination in (2) is presented as a long-term relationship in the model:

$$\Delta Y_t = \Pi Y_{t-1} + \sum_{i=1}^{p-1} \Phi_i \Delta Y_{t-i} + \varepsilon_t \quad (4)$$

with: Y_t is a 3×1 vector composed of local price, future price and peso-dollar exchange rate, $\Pi = \alpha\beta$ where α is a 3×1 vector or adjustment vector and β is a 1×3 vector of long-term coefficients known as cointegrating vector.

Interest is on the effect that a future price or exchange rate disturbance has on the domestic price. The hypothesis is that an exchange rate disturbance is as much as a future price disturbance, which makes foreign hedge of limited viability when managing price risk. In this regard, the impulse/response function was estimated (Arias and Segura, 2000) for the four price alternatives and corresponding future price and exchange rate disturbances.

RESULTS AND DISCUSSION

The first aspect to examine was the presence of unit roots, which was analyzed by using the Dickey-Fuller

³Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM): <http://www.economia-sniim.gob.mx/nuevo/>

⁴Banco de México: <http://www.banxico.org.mx/tipcamb/tipCamMIAction.do?idioma=sp>

⁵<https://mx.investing.com/commodities/us-corn-historical-data>

con: Y_t un vector 3×1 compuesto por precio local, precio futuro y tasa de cambio peso- dólar, $\Pi = \alpha\beta$ donde α es un vector 3×1 o vector de ajuste y β es un vector 1×3 de coeficientes de largo plazo conocido como vector cointegrante.

El interés es sobre el efecto que tiene en el precio doméstico un disturbio del precio futuro o la tasa de cambio. La hipótesis es que un disturbio en tasa de cambio es tanto como un disturbio en el precio futuro, lo que hace a la cobertura foránea de limitada viabilidad cuando se administra riesgo de precio. Al respecto se estimó la función impulso respuesta (Arias y Segura, 2000) para las cuatro alternativas de precio y correspondientes disturbios del precio futuro y de la tasa de cambio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer aspecto a examinar fue la presencia de raíces unitarias y esto se examinó por medio de la prueba Dickey-Fuller (1981) para los cuatro vectores autorregresivos examinados. Estos vectores estuvieron formados respectivamente por el precio de las centrales de abasto consideradas (Ecatepec, Iztapalapa, Jalisco y Sinaloa) junto con el precio de maíz cotizado en Chicago y la tasa de cambio peso-dólar. Dado que nunca se está cierto del proceso generador de datos, en el Cuadro 1 se presentan los resultados para el contraste tipo tau con tres versiones de modelo⁶. En el caso de los precios estudiados junto con la tasa de cambio y derivado de la prueba de raíz unitaria, no se puede rechazar que exista un comportamiento no estacionario de dichas series, por lo que la utilización de dichas variables en un modelo de regresión es impropio.

González y Martínez (2015) obtuvieron el resultado de raíz unitaria en un contexto de transmisión de precio, mientras que Yunez y Taylor (2006) también lo encontraron al investigar libre comercio. Pero si existe una combinación lineal de estas variables que resultase estacionaria entonces es posible emplear dicha combinación al momento de una cobertura. Aquí se evaluaron las cuatro alternativas de precio junto con la tasa de cambio en la búsqueda de

test (1981) in the four autoregressive vectors used. These vectors were formed respectively by the price of the four grocery markets included in the present study (Ecatepec, Iztapalapa, Jalisco and Sinaloa), together with the corn price quoted in Chicago and the peso-dollar exchange rate. Given that the data generating process is never certain, Table 1 presents the results for the tau-type test with three model versions⁶. In the case of the studied surveyed prices together with the exchange rate and derived from the unit root test, we cannot reject that there is a non-stationary behavior of such series, so the use of these variables in a regression model is improper.

González and Martínez (2015) obtained the unit root result in a context of price transmission,

Cuadro 1. Contraste por raíz unitaria Dickey-Fuller.
Table 1. Dickey-Fuller unit root contrast.

Variable	Tipo	Tau	Pr < Tau
LPIZT	Media cero	1.42	0.9613
	Media sencilla	-1.07	0.729
	Tendencia	-2.29	0.4354
LPF	Media cero	-0.56	0.475
	Media sencilla	-1.57	0.4955
	Tendencia	-2.01	0.5925
LTC	Media cero	1.54	0.9697
	Media sencilla	-0.74	0.8326
	Tendencia	-2.69	0.2401
LPS	Media cero	-0.11	0.6458
	Media sencilla	-2.34	0.1594
	Tendencia	-3.97	0.011
LPECA	Media cero	0.88	0.899
	Media sencilla	-1.42	0.5705
	Tendencia	-2.57	0.2936
LPJ	Media cero	1.45	0.9635
	Media sencilla	-0.87	0.7964
	Tendencia	-1.92	0.6428

LPIZT=precio en Iztapalapa; LPF=precio futuro en bolsa de Chicago; LTC=tasa de cambio peso dólar; LPS=precio en Sinaloa; LPECA=precio en Ecatepec; LPJ=precio en Jalisco ♦ LPIZT=price in Iztapalapa; LPF=future price on the Chicago stock exchange; LTC=dollar-peso exchange rate; LPS= price in Sinaloa; LPECA=price in Ecatepec; LPJ=price in Jalisco.

⁶Existen muchas versiones de prueba de raíz unitaria y aquí se presenta la versión tipo tau que es análoga a la prueba de t bajo las versiones 1) media cero $Y_t = \theta_1 Y_{t-1} + \varepsilon_t$, 2) media sencilla $Y_t = \theta_0 + \theta_1 Y_{t-1} + \varepsilon_t$, 3) Tendencia $Y_t = \theta_0 + \theta_1 Y_{t-1} + \theta_2 T + \varepsilon_t$. En los tres casos la hipótesis nula para raíz unitaria específica $H_0: \theta_1 = 1$. (Dickey y Fuller, 1981). Todos los resultados se obtuvieron con el software SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc. 2014) ♦ There are many versions of the unit root test and here we present the tau type version that is analogous to the t test under the versions 1) zero mean $Y_t = \theta_1 Y_{t-1} + \varepsilon_t$, 2) simple mean $Y_t = \theta_0 + \theta_1 Y_{t-1} + \varepsilon_t$, 3) Trend $Y_t = \theta_0 + \theta_1 Y_{t-1} + \theta_2 T + \varepsilon_t$. In all three cases the null hypothesis for unit root specifies $H_0: \theta_1 = 1$. (Dickey and Fuller, 1981). All results were obtained with SAS software version 9.4 (SAS Institute Inc. 2014).

Cuadro 2. Prueba de cointegración de Johansen para precio México, tasa de cambio peso-dólar y precio futuro.**Table 2. Johansen cointegration test for Mexico price, peso-dollar exchange rate and future price.**

Jalisco				
Prueba de cointegración del máximo eigen-valor				
H0: Rango=r	H1: Rango=r+1	Eigenvalor	Máximo	Valor Critico al 5%
0	1	0.1488	38.6736	20.97
1	2	0.0300	7.2987	14.07
2	3	0.0021	0.5064	3.76
Iztapalapa				
Prueba de cointegración del máximo eigen-valor				
H0: Rango=r	H1: Rango=r+1	Eigenvalor	Máximo	Valor Critico al 5%
0	1	0.1562	40.769	20.97
1	2	0.0178	4.3132	14.07
2	3	0.0019	0.4657	3.76
Sinaloa				
Prueba de cointegración del máximo eigen-valor				
H0: Rango=r	H1: Rango=r+1	Eigenvalor	Máximo	Valor Critico al 5%
0	1	0.1139	28.8891	20.97
1	2	0.0165	3.9661	14.07
2	3	0.0022	0.5229	3.76
Ecatepec				
Prueba de cointegración del máximo eigen-valor				
H0: Rango=r	H1: Rango=r+1	Eigenvalor	Máximo	Valor Critico al 5%
0	1	0.1257	32.2445	20.97
1	2	0.0177	4.2742	14.07
2	3	0.0020	0.4817	3.76

evidencia de cointegración, y para tal propósito se empleó la prueba de Johansen (1991).

La presencia de al menos un vector cointegrante (rango 1) no se puede rechazar (Cuadro 2) para las variables: precio local de maíz en México, precio futuro y tasa de cambio, en los cuatro casos examinados. Esto se concluye al comparar la estadística de prueba del máximo contra el valor crítico al 5% de confiabilidad; donde, en los cuatro casos el mencionado estadístico de prueba es menor que el valor crítico, por lo cual falla por al menos un vector cointegrante con respecto a la hipótesis nula. La implicación económica de este resultado es que la cobertura potencial del productor doméstico que opera en el mercado de futuros foráneo de Chicago es factible

while Yunez and Taylor (2006) also found it when investigating free trade. But if there is a linear combination of these variables that turns out to be stationary, then it is possible to use that combination at the time of hedging. Here we tested the four price alternatives, together with the exchange rate in the search for evidence of cointegration, and for this purpose the Johansen test (1991) was used.

The presence of at least one cointegrating vector (range 1) cannot be rejected (Table 2) for the variables: local corn price in Mexico, future price and exchange rate, in the four cases examined. We concluded this by comparing the test statistic of the maximum against the critical value at 5% confidence level; where, in all four cases, the aforementioned test

sin pérdida o ganancia sistemática debido a que existe una combinación lineal estacionaria en cada caso.

Este resultado de precios foráneos y tasa de cambio cointegrada con precios domésticos, lo obtuvieron Martínez y Matus (2017) al estudiar la ley del precio único en maíz, así como Arias y Segura (2000) en el contexto de coberturas foráneas para Argentina y Chile.

Como se encontró evidencia de cointegración bajo una representación vector autorregresiva, al emplear el teorema de la representación (Engle y Granger, 1987) se optó por un ajuste de un modelo vectorial de corrección de error ecuación (4). La razón de emplear un modelo de corrección de error es representar adecuadamente la dinámica de precios; en particular el vector β resume el comportamiento económico de largo plazo, mientras que α es un vector de coeficientes que informa del ajuste hacia el equilibrio de largo plazo ante un disturbio aleatorio.

Al respecto de la relación de largo plazo estimada de la representación vectorial de corrección de error (Cuadro 3), el vector de largo plazo estimado se normalizó para que el coeficiente de la tasa de cambio sea uno; en cada caso se puede corroborar que la relación es congruente con (2) lo cual representa la ley del precio único. Sin embargo, mientras que el coeficiente del precio doméstico es cercano a uno, el coeficiente del precio futuro resulta inferior a dicho número; ello implica que no se cumple la ley del precio único.

statistic is less than the critical value, so it fails to reject at least one cointegrating vector with respect to the null hypothesis. The economic implication of this result is that the potential hedging of the domestic producer operating in the Chicago foreign futures market is feasible without systematic loss or gain because there is a linear, stationary combination in each case.

This result of foreign prices and exchange rate cointegrated with domestic prices was obtained by Martínez and Matus (2017) when studying the law of one price corn, as well as Arias and Segura (2000) in the context of foreign hedging for Argentina and Chile.

As we found evidence of cointegration under a vector autoregression representation by using the representation theorem (Engle and Granger, 1987), we chose the adjustment of a vector error correction model equation (4). The reason for using an error correction model is to adequately represent price dynamics; in particular the vector b summarizes the long-term economic behavior, while a is a vector of coefficients that reports the adjustment towards the long-term equilibrium in the face of a random disturbance.

Regarding the estimated long-term relationship of the vector error correction representation (Table 3), the estimated long-term vector was normalized so that the coefficient of the exchange rate was one;

Cuadro 3. Estimadores del vector β de largo plazo.
Table 3. Estimators of the long-term β vector.

Estimadores Beta de Largo Plazo Cuando el Rango es =1 Variable		Estimadores Beta de Largo Plazo Cuando el Rango es =1 Variable	
LPJ	-0.93537	LPS	-1.23143
LPF	0.70559	LPF	0.49780
LTC	1	LTC	1
Estimadores Beta de Largo Plazo Cuando el Rango es =1 Variable		Estimadores Beta de Largo Plazo Cuando el Rango es =1 Variable	
LPIZT	-0.97453	LPECA	-1.01501
LPF	0.62692	LPF	0.60219
LTC	1	LTC	1

LPIZT=precio en Iztapalapa; LPF=precio futuro en bolsa de Chicago; LTC=tasa de cambio peso dólar; LPS=precio en Sinaloa; LPECA=precio en Ecatepec; LPJ= precio en Jalisco ♦ LPIZT=price in Iztapalapa; LPF=future price on the Chicago stock exchange; LTC=dollar-peso exchange rate; LPS= price in Sinaloa; LPECA=price in Ecatepec; LPJ=price in Jalisco.

Cuadro 4. Estimadores del vector de ajuste alfa.**Table 4. Estimators of the alpha adjustment vector.**

Estimadores de los coeficientes de ajuste alfa cuando el rango=1		Estimadores de los coeficientes de ajuste alfa cuando el rango=1	
Variable		Variable	
LPJ	0.13917	LPS	0.10742
LPF	-0.08414	LPF	-0.01236
LTC	-0.05518	LTC	-0.01657
Estimadores de los coeficientes de ajuste alfa cuando el rango=1		Estimadores de los coeficientes de ajuste alfa cuando el rango=1	
Variable		Variable	
LPIZT	0.11442	LPECA	0.16617
LPF	-0.06096	LPF	-0.02493
LTC	-0.04188	LTC	-0.01504

LPIZT=precio en Iztapalapa; LPF=precio futuro en bolsa de Chicago; LTC=tasa de cambio peso dólar; LPS=precio en Sinaloa; LPECA=precio en Ecatepec; LPJ= precio en Jalisco ♦ LPIZT=price in Iztapalapa; LPF=future price on the Chicago stock exchange; LTC=dollar-peso exchange rate; LPS=price in Sinaloa; LPECA=price in Ecatepec; LPJ=price in Jalisco.

Martínez y Matus (2017) obtuvieron un resultado similar y Jaramillo y Benítez (2016) documentaron un resultado análogo al aquí obtenido.

En un modelo de corrección de error una vez considerada la relación de largo plazo, el ajuste a dicho vector ante un disturbio es representado por los coeficientes de ajuste denominados α en (3), (Engle y Granger, 1987).

En lo que corresponde a los estimadores de ajuste para los cuatro casos expuestos (Cuadro 4); si se piensa en la relación de largo plazo como $\beta'Y=c$, con un error estocástico de equilibrio $\beta'Y-c$, el vector alfa representa la reacción hacia el equilibrio de esta última diferencia. Así ante un error rezagado, definido por la relación de largo plazo, la proporción de dicho error corregida o ajustada, está dada por los coeficientes del vector alfa.

Es de interés notar que el ajuste a un desequilibrio de largo plazo es similar en magnitud y del mismo signo para el precio futuro y la tasa de cambio. Esto es importante porque bajo una decisión de cobertura y al considerar que existe una relación de largo plazo (estable) entre el precio doméstico, el precio futuro y la tasa de cambio, entonces el efecto del precio futuro y la tasa de cambio pueden considerarse análogos.

En la decisión de cobertura es por tanto necesario fijar la atención en la tasa de cambio, debido a que los cambios en la tasa de cambio afectan una posición de

in each case, it is possible to show that the relation is congruent with (2), which represents the law of one price. However, while the domestic price coefficient is close to one, the future price coefficient is less than this number; this implies that the law of one price is not complied with. Martínez and Matus (2017) obtained a similar result and Jaramillo and Benítez (2016) reported an analogous result to the one obtained here.

In an error correction model, once the long-term relationship is considered, the adjustment to such vector before a disturbance is represented by the adjustment coefficients named α in (3), (Engle and Granger, 1987).

Concerning the adjustment estimators for the four aforementioned cases (Table 4), if the long-term relationship is $\beta'Y=c$, with a stochastic equilibrium error $\beta'Y-c$, the alpha vector represents the reaction towards equilibrium of this last difference. Thus, when faced with a lagged error, defined by the long-term relationship, the proportion of such error corrected or adjusted is given by the coefficients of the alpha vector.

It is worth noting that the adjustment to a long-term imbalance is similar in magnitude, and of the same sign for the future price and the exchange rate. This is important because under a hedge decision and considering that there is a long-term (stable)

cobertura en un mercado foráneo casi tanto como el propio precio futuro. Hacemos notar que este efecto no está presente en el productor que toma una cobertura en su propio mercado doméstico (Govindaray y Turvey, 2000) porque el factor que afectará su cobertura se expresará de modo primordial en el precio futuro.

Entonces, los efectos del propio precio futuro y de la tasa de cambio afectarán la contratación de cobertura posible en un mercado foráneo. Este aspecto se ha ignorado en los estudios de Arias y Segura (2000), Jaramillo y Benítez (2016) y Ortiz y Montiel (2017).

Con el propósito de estudiar el efecto tanto de la tasa de cambio como del precio futuro sobre el precio doméstico de maíz, se estimaron las funciones impulso-respuesta, las cuales representan el efecto que un disturbio tiene sobre el precio doméstico, en razón de la tasa de cambio y el precio futuro (Arias y Segura, 2000). Es de apreciarse (Figura 1) que cualquier efecto de un disturbio en el precio futuro y la tasa de cambio se comporta de manera similar en el precio doméstico, con trayectorias ascendentes sostenidas y del mismo signo. Por ejemplo, se distingue el efecto de un disturbio en precio futuro y tasa de cambio, sobre el precio pagado en la central de Ecatepec (Figuras 1A y 1B); es claro que un disturbio en precio futuro (denominado impulso) tiene el efecto de incrementar el precio doméstico (respuesta) de forma análoga a como lo hace un disturbio en la tasa de cambio. Esta proyección confirma lo ya observado de que existe un efecto análogo de la tasa de cambio y del precio futuro sobre el precio doméstico.

El análisis impulso respuesta se acompaña con una prueba de causalidad, para comprobar si los coeficientes del precio futuro y la tasa de cambio son significativos para la determinación del precio doméstico. En los cuatro casos analizados se rechazó la hipótesis nula de que el precio doméstico está auto-determinado, en favor de la alternativa de que el precio futuro, junto con la tasa de cambio proporcionan información en la determinación del precio doméstico (Cuadro 5). Esto es consistente con lo encontrado por Martínez y Matus (2017) en un contexto ley del precio único, donde el elemento causal fue la tasa de cambio. También coincide con Arias y Segura (2000), salvo que ellos verificaron solo la causalidad del precio futuro y dejaron a la tasa de cambio implícita en el análisis.

relationship between the domestic price, the future price and the exchange rate, then the effect of the future price and the exchange rate can be considered analogous.

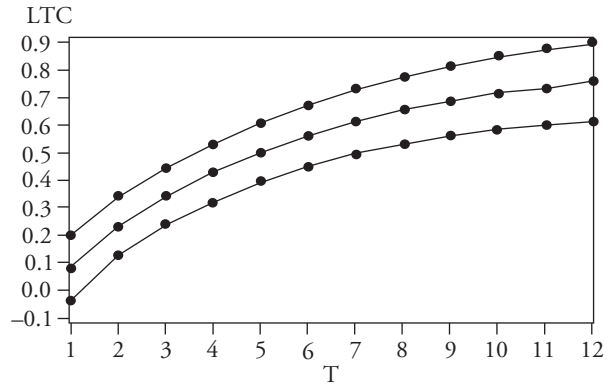
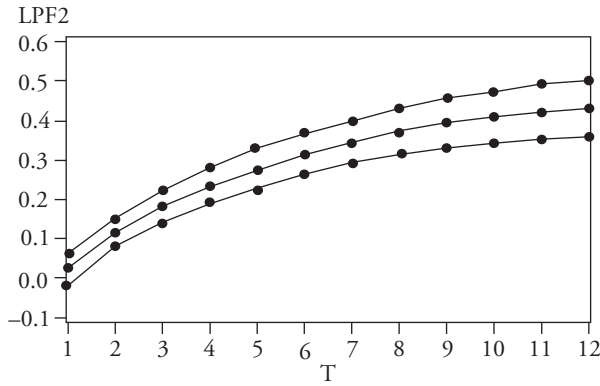
In hedging decisions, it is therefore necessary to pay attention to the exchange rate, since its variations may affect hedge operations in a foreign market almost as much as the future price itself. We note that this effect is not present in the producers who acquire a hedge in their own domestic market (Govindaray and Turvey, 2000) because the factor that will affect their hedge will manifest primarily in the future price.

Then, the effects of the future price itself and the exchange rate will affect the contracting of possible hedge in a foreign market. This aspect was ignored in the studies by Arias and Segura (2000), Jaramillo and Benítez (2016) and Ortiz and Montiel (2017).

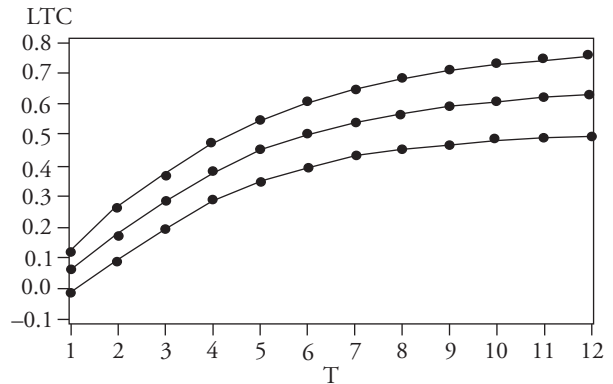
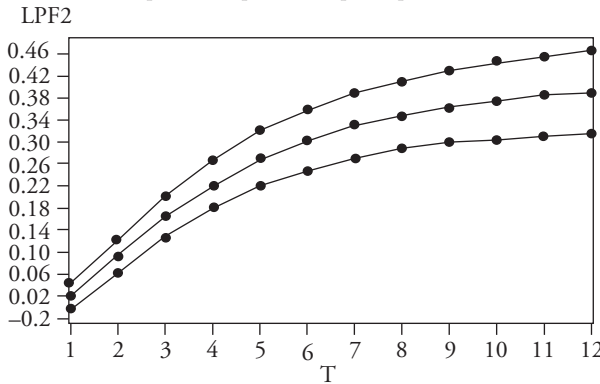
In order to study the effect of both the exchange rate and the future price on the domestic corn price, we estimated the impulse-response functions, which represent the effect that a disturbance has on the domestic price, due to the exchange rate and the future price (Arias and Segura, 2000). It must be recognized that any effect of a disturbance in the future price and the exchange rate (Figure 1) generates a similar behavior in the domestic price, with sustained upward trajectories and of the same sign. For example, the effect of a disturbance in future price and exchange rate on the price paid at the Ecatepec market is shown (Figures 1A and 1B); it is clear that a future price disturbance (called impulse) has the effect of increasing the domestic price (response) in an analogous way to a variation in the exchange rate. This projection confirms what has already been observed: there is a similar effect of the exchange rate and the future price on the domestic price.

The impulse/response analysis is accompanied by a causality test to check whether the coefficients of the future price and the exchange rate are significant for the determination of the domestic price. In the four cases analyzed, the null hypothesis that the domestic price is self-determined was rejected in favor of the alternative that the future price, together with the exchange rate, provide information in determining the domestic price (Table 5).

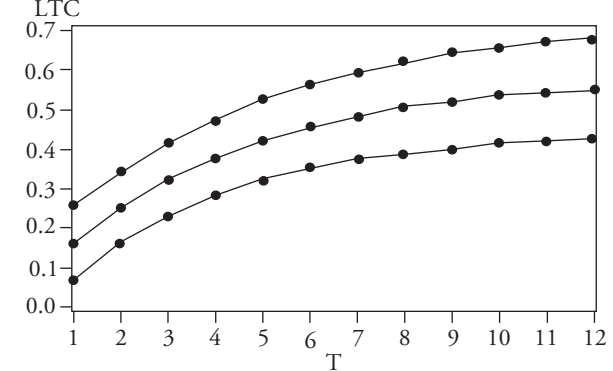
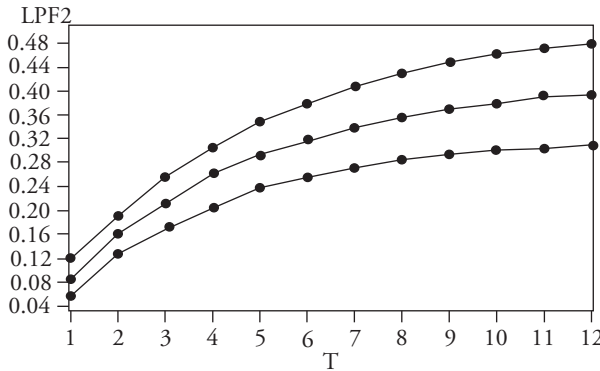
A) Función impulso / respuesta Ecatepec / precio futuro y tasa de cambio.



B) Función impulso / respuesta Iztapala / precio futuro y tasa de cambio.



C) Función impulso / respuesta Jalisco / precio futuro y tasa de cambio.



D) Función impulso / respuesta Sinaloa / precio futuro y tasa de cambio.

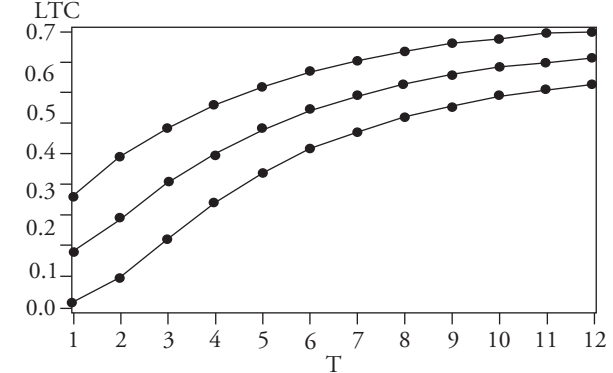
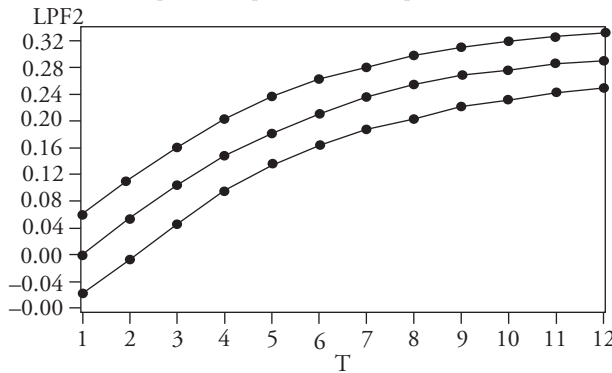


Figura 1. Funciones Impulso-Respuesta Estimadas.
Figure 1. Estimated Impulse/Response Functions.

Cuadro 5. Pruebas de causalidad.
Table 5. Causality tests.

Prueba de causalidad de Granger Jalisco			Prueba de causalidad de Granger Sinaloa		
GL	Chi-cuadrada	Valor de p	GL	Chi-cuadrada	Valor de p
4	28.68	<.0001	4	22.49	0.0002
g. 1=LPJ		g.2=LPF LTC	g.1=LPS		g.2= LPF LTC
Prueba de causalidad de Granger Ixtapalapa			Prueba de causalidad de Granger Ecatepec		
GL	Chi-cuadrada	Valor de p	DF	Chi-cuadrada	Valor de p
4	33.62	<.0001	4	33.32	<.0001
g.1= LPIZT		g.2= LPF LTC	g.1=LPECA		g.2=LPF LTC

LPIZT=precio en Iztapalapa; LPF=precio futuro en bolsa de Chicago; LTC=tasa de cambio peso dólar; LPS=precio en Sinaloa; LPECA=precio en Ecatepec; LPJ=precio en Jalisco. La hipótesis nula especifica que las variables en el grupo 1 (g.1) se determinan independientemente de aquellas en el grupo 2 (g.2). ♦ LPIZT=price in Iztapalapa; LPF=future price on the Chicago stock exchange; LTC=dollar-peso exchange rate; LPS= price in Sinaloa; LPECA=price in Ecatepec; LPJ=price in Jalisco. The null hypothesis specifies that the variables in group 1 (g.1) are determined independently of those in group 2 (g.2).

CONCLUSIONES

En una operación de cobertura foránea al precio nacional del maíz no puede administrarse directamente el riesgo de precio debido a la tasa de cambio. Pero existe potencial de administración de riesgo de precio, por la existencia de al menos un vector cointegrante formado por el precio doméstico de maíz, el precio futuro cotizado en Chicago y la tasa de cambio.

La implicación económica de este resultado es que la cobertura potencial del productor doméstico que opere en el mercado de futuros foráneo de Chicago es factible, sin pérdida o ganancia sistemática, debido a que existe una combinación lineal estacionaria en cada caso.

Con el análisis de causalidad se verificó que la tasa de cambio y el precio futuro tienen efectos simultáneos en la revelación del precio doméstico de maíz.

LITERATURA CITADA

Alarcón-Madrid H., H. Rubio A, L. R. Sánchez A., R. Torres M., S. Lozano A., y R. Favela E. 2008. El futuro del tipo de cambio no es un pronóstico del tipo de cambio spot. 48 Synthesis. Facultad de Contaduría y Administración. Universidad Autónoma de Chihuahua. http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2009/04/27/El_futuro_del_tipo_de_cambio_no_es_un_pronostico_del_tipo_de_cambio_spot.pdf. (Consulta: marzo 2018).

This is consistent with what Martínez and Matus (2017) found in a law of one price context, where the causal element was the exchange rate. It also coincides with Arias and Segura (2000), except that they verified only the causality of the future price and left the exchange rate implicit in the analysis.

CONCLUSIONS

In a national foreign hedging operation at the domestic corn price, price risk cannot be managed directly due to the exchange rate. But there is the potential for price risk management due to the existence of at least one cointegrating vector formed by the domestic corn price, the future price quoted in Chicago and the exchange rate.

The economic implication of this result is that the potential hedging of domestic producers operating in the Chicago foreign futures market is feasible, with no systematic loss or gain, since there is a linear stationary combination in each case.

With the causality analysis, we verified that the exchange rate and the future price have simultaneous effects on the disclosure of the domestic price of corn.

—End of the English version—



- Arias, J., y O. Segura. 2000. Factibilidad de uso de los mercados de futuro, como instrumento de cobertura de riesgo en bolsas de físico en América Latina. 1ª ed. Buenos Aires: VII Encuentro de la Asociación Panamericana de Bolsas de Productos. 36 p.
- Bopp A. E., and G. Lady. 1991. A comparison of petroleum futures versus spot prices as predictors of prices in the future. *Energy Econ.* 13: 274 - 282.
- Dickey, D., and W. Fuller. 1981. Likelihood ratio statistics for autoregressive time series with a unit root. *Econometrica* 4: 1057 - 1072.
- Echanove H. F. 2015. Subsidios gubernamentales para riesgos de precio: el caso de productores de maíz amarillo en México. *Papeles de Geografía* 61: 33 - 43.
- Engle, R., and C. Granger. 1987. Co-Integration and error correction: representation, estimation, and testing. *Econometrica* 55: 251 - 276.
- González P., H., y M. Martínez D. 2015. Efecto de transmisión del precio de mercado del maíz al mercado de la tortilla. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6: 1149 - 1162.
- Govindaraj N. N., and C. G. Turvey. 2000. The simultaneous hedging of price risk, crop yield risk and currency risk. *Can. J. Agric. Econ.* 48: 123 - 140
- Granger, C., and P. Newbold. 1974. Spurious regressions in econometrics. *J. Econ.* 2: 111 - 120
- Guizar-Mateos, M.A. Martínez D., y R. Valdivia. Cobertura óptima en el mercado de futuros bajo riesgo de precio y rendimiento. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3: 1275 - 1284.
- Jaramillo-Villanueva J. L., y E. Benítez-García. 2016. Transmisión de precios en el mercado mexicano e internacional de café (*coffea arabica* L.): Un análisis de cointegración. *Agrociencia* 50: 931 - 944.
- Johansen, S. 1991. Estimation and hypothesis testing of cointegration in Gaussian vector autoregressive models. *Econometrica* 59: 1551 - 1580.
- Martínez D., y J. J. García J. 2010. Política de cobertura de precios de maíz en México. *Rev. Mex. Econ. Agríc. Rec. Nat.* 8: 69 - 76.
- Martínez-Damián M. A., y J. A. Matus G. 2017. Precio del maíz en México y ley del precio único. *CIENCIA ergo-sum* 24: 18 - 24.
- Ortiz-Arango F., y A. N. Montiel-Guzmán. 2017. Transmisión de precios futuros de maíz del Chicago Board of Trade al mercado spot mexicano: un análisis con volatilidad estocástica multivariante durante el periodo 2007 a 2012. *Contaduría y Administración* 62: 924 - 940.
- Protopapadakis A., and H. R. Stoll. 1983. Spot and futures prices and the law of one price. *The J. Finance* 38: 1431 - 1455.
- Robles-Berlanga, H. M. 2013. Los pequeños productores y la política pública. *Subsidios al Campo.org.mx*. Primera ed. México. 30 p.
- SAS Institute Inc. 2014. SAS/ETS® 13.2 User's Guide. The VARMAX Procedure. Cary, NC: SAS Institute Inc. pp: 2415-3507.
- Vukina T, D. Li, and D. M. Holthausen. 1996. Hedging with crop yield futures: A mean-variance analysis. *Am. J. Agric. Econ.* 78: 1015 - 1025.
- Yunez N., A., and J. Taylor. 2006. The effects of nafta and domestic reforms in the agriculture of Mexico: predictions and facts. *Région et Développement* 23: 161 - 185.

PRECIOS, COSTOS Y LA OPCIÓN REAL DE EXPANDIR LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE HUEVO COMERCIAL EN MÉXICO

PRICES, COSTS AND THE REAL OPTION TO EXPAND THE COMMERCIAL EGG PRODUCTION UNIT IN MEXICO

Verónica Pérez-Cerecedo¹, José de J. Brambila-Paz^{1*}, Jaime A. Matus-Gardea¹, Daniel Barrera-Islas¹, Adrián González-Estrada², Marcos Portillo-Vázquez³

¹Socioeconomía. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (verónica_cerecedo@hotmail.com), (jbrambilaa@colpos.mx), (jmatus@colpos.mx), (dbarrera@colpos.mx). ²Campo Experimental Valle de México-INIFAP, Carretera Los Reyes-Texcoco, Km 13.5, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México. 56250. (adrglz@prodigy.net.mx). ³Universidad Autónoma Chapingo-DICEA, Km 38.5, Carretera México- Texcoco, 56230, Texcoco, Estado de México. México. (mportillo49@yahoo.com.mx).

RESUMEN

La tendencia de caída del precio del huevo genérico en México afecta directamente a productores primarios, reduce el ingreso generado por gallina y provoca la pérdida de 30% de las pequeñas empresas y la concentración del mercado nacional. El objetivo de esta investigación fue estimar la conveniencia financiera de seguir en la producción de huevo genérico comercial. Las hipótesis fueron que las pequeñas unidades de producción comercial de huevo genérico tienden a tener un valor menor en la opción de invertir en un instrumento libre de riesgo lo que permite a las empresas medianas y grandes estar en una mejor posición financiera para expandir su producción y, de seguir las tendencias de mercado actual, la producción se concentrará en las grandes empresas. El costo de la opción real de expandir el negocio para cada nivel de producción se estimó, tomando en cuenta el comportamiento volátil del precio del huevo y el rendimiento por gallina, mediante el cálculo de la tendencia del valor por gallina con el modelo Black-Scholes. El costo de expandir resultó considerablemente mayor para los pequeños productores respecto a los medianos y grandes. Si la tendencia de mercado continúa, 50% de las pequeñas empresas productoras de huevo dejarán el negocio por no ser viable en términos financieros.

Palabras clave: volatilidad de precio, opción real, modelo Black-Scholes.

ABSTRACT

The tendency of falling prices of generic egg in Mexico directly affects primary producers, reduces the income generated per hen and provokes the loss of 30% of the small businesses and the concentration of the national market. The objective of the present study was to estimate the financial convenience of continuing the production of commercial generic egg. The hypotheses were that the small commercial production units of generic egg tend to have lower value in the option of investing in a risk free instrument which allows the medium and large businesses to be in a better financial position for expanding their production, and if the present market tendencies continue, production will be concentrated in the large companies. The cost of the real option for expanding the business was estimated for each production level, taking into account the volatile behavior of the price of egg and yield per hen, by means of the calculation of the tendency of the value per hen with the Black-Scholes model. The cost of expansion resulted considerably higher for the small producers with respect the medium and large producers. If the market tendency continues, 50% of the small egg producers will abandon the business because of its financial unviability.

Key words: price volatility, real option, Black-Scholes model.

INTRODUCTION

The alimentation of the Mexican population has changed since the second half of the twentieth century. The consumption of maize (*Zea mays*), bean (*Phaseolus vulgaris*), chili (*Capsicum annuum*), squash (*Curcubita pepa*), fruits and

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 589-600. 2020.

INTRODUCCIÓN

La alimentación de la población mexicana ha cambiado desde la segunda mitad del siglo XX. El consumo de maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), chile (*Capsicum annuum*), calabacita (*Cucurbita pepo*), frutas y verduras cambió por leche, huevo, trigo (*Triticum spp*), carnes rojas, y pollo (SAGARPA, 2017). El consumo anual de huevo *per capita* promedio en 1972 era 7.79 kg y en 2014 fue 20.92 kg. Para satisfacer la demanda creciente la producción nacional aumentó de 401.26 miles de Mg en 1972 a 2567.20 miles de Mg en 2014 (SARH, 1990; SIAP, 2018) y el precio real se redujo de \$79.57 MXN pesos (equivalentes a 4.18 USD, al tipo de cambio de \$19.05 por dólar) por kg al productor a \$20.43 MXN pesos en los mismos años (CEFP, 2015; SIAP, 2018).

Para compensar la baja constante del precio, el productor de huevo genérico usó los avances de la genética para aumentar el rendimiento por gallina, el cual pasó de 4.64 kg anuales en 1972 a 13.27 kg en 2014, e incrementó su escala productiva para reducir costos de producción. Sin embargo, no todos los productores han logrado compensar la baja de precios con rendimiento y crecimiento de escala, por lo que sus costos se elevaron y salieron del mercado de huevo genérico.

En los años sesenta del siglo XX la mayor producción de huevo comercial venía de empresas pequeñas, en los años noventa la producción se concentró en las empresas medianas. En 2015 la estructura de mercado se transformó y concentró la producción en las grandes (51%) y las medianas (41%) empresas dejando a las pequeñas con solo el 8% del mercado. De 1996 al 2015 cerraron 41 empresas productoras de huevo comercial, cerca del 30% de las pequeñas unidades de producción, mientras que el número de empresas grandes aumentó en 67%. Además se estima que solo 10 empresas concentran la mayoría de la producción de huevo genérico en México (UNA, 2015; 2016; 2017).

El objetivo de esta investigación fue estimar la conveniencia financiera de seguir en la producción de huevo genérico comercial al medir la tendencia del valor por gallina con base en el comportamiento

vegetables changed for milk, eggs, wheat (*Triticum spp*), red meats, and chicken (SAGARPA, 2017). The average annual egg consumption *per capita* in 1972 was 7.79 kg and in 2014 was 20.92 kg. To satisfy the growing demand, national production increased from 401.26 thousand Mg in 1972 to 2567,20 thousand Mg in 2014 (SARH, 1990, SIAP, 2018) and the real price was reduced from \$79.57 MXN pesos (equivalent to 4.18 USD, at the exchange rate of \$19.05 per dollar) per kilo to the producer to \$20.43 MXN pesos in the same years (CEFP, 2015; SIAP, 2018).

To compensate the constant price drop, the generic egg producer used the advances in genetics to increase yield per hen, which increased from 4.64 kg per year in 1972 to 13.27 kg in 2014, and increased its productive scale to reduce production costs. However, not all producers have managed to compensate the drop in price with yield and scale growth, and their costs have increased, thus forcing them to leave the generic egg market.

In the decade of the sixties of the twentieth century, the highest commercial egg production was of small producers, while in the nineties, production was concentrated in the medium sized firms. In 2015, the market structure was transformed and production was concentrated in large (51%) and medium sized (41 %) production units, leaving the small producer with only 8% of the market. From 1996 to 2015, 41 commercial egg producers closed, nearly 30% of the small production units, whereas the number of large producers increased by 67%. Furthermore, it is estimated that just 10 companies concentrated the majority of generic egg production in Mexico (UNA, 2015; 2016; 2017).

The objective of the present study was to estimate the financial convenience of continuing commercial egg production through measuring the tendency of the value per hen based on the volatile behavior of the price of egg and yield per hen. The hypotheses were as follows: 1) the tendency of the small production units of commercial generic egg is toward a value lower than the option of investing in a risk free instrument; 2) the tendency of egg production is to concentrate in large production units and to force the small producers out of the market.

volátil del precio del huevo y el rendimiento por gallina. Las hipótesis fueron: 1) la tendencia de las unidades pequeñas de producción comercial de huevo genérico es hacia un valor menor a la opción de invertir en un instrumento libre de riesgo; 2) la tendencia en la producción de huevo es a concentrarse en las empresas grandes y dejar fuera del mercado a los productores pequeños.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cadenas de probabilidad de Markov y la concentración de la producción de huevo

La concentración de la producción de huevo se proyecta al 2030 con el uso de las cadenas de probabilidad de Markov (Pinsky y Karlin, 2010). Las unidades de producción de huevo se dividen en pequeñas, medianas y grandes y se calcula la probabilidad de que sigan en el mismo estrato o cambien. Hay que hacer algunos supuestos: todas las empresas grandes se mantienen en su estrato, solo algunas medianas (4 unidades de producción) se vuelven grandes, solo algunas pequeñas (4) se vuelven medianas y muchas pequeñas (49) salen del mercado de producción de huevo genérico.

En el Cuadro 1 se muestran los datos base para formar la matriz de Markov. Como el período es de 19 años con una vuelta a la matriz de probabilidades y con los datos del 2015 se puede proyectar la concentración de las unidades de producción de huevo esperada para el 2030.

La ecuación de Bellman y el valor mínimo de un proyecto

La ecuación de Bellman señala que el valor que debe agregar un proyecto debe ser mayor o igual al interés que se ganaría si la inversión inicial se depositara en un banco a una tasa libre de riesgo en el periodo establecido (Dixit y Pindyck, 1994), es decir:

$$rvdt \leq E(dv) \tag{1}$$

donde r es la tasa libre de riesgo, v es el valor inicial del proyecto, dt el periodo y $E(dv)$ es el incremento expresado en el valor del proyecto.

El valor del proyecto está en función del precio. En el caso de la producción de huevo las gallinas son el activo, por lo que el valor de las gallinas será el precio del kilo de huevo por el rendimiento promedio de éstas. En el caso presente, al referirse al precio éste ya está ajustado por rendimiento. El valor del activo (gallina) en función del precio y tiempo se denota como: $V(P,t)$.

MATERIALS AND METHODS

The Markov probability chains and the concentration of egg production

The concentration of egg production is projected to 2030 with the use of Markov's probability chains (Pinsky and Karlin, 2010). The production units were divided into small, medium and large, and the probability is calculated of whether they will continue in the same stratus or change. It is necessary to make some assumptions: all of the large firms remain in their stratus, only some (4 production units) of the medium sized producers become large, only some (4) of the small producers become medium sized and many small (49) producers drop out of the generic egg production market.

Table 1 shows the base data for forming the Markov matrix. Given that the period is 19 years with a return to the matrix of probabilities and with the data of 2015, the concentration of the egg production units for 2030 can be projected.

The Bellman equation and the minimum value of a project

The Bellman equation indicates that the value that should be added to a project must be greater than or equal to the interest that would be earned if the initial investment were deposited in a bank at a risk free rate in the established period (Dixit and Pindyck, 1994), that is:

$$rvdt \leq E(dv) \tag{1}$$

where r is the risk free rate, v is the initial value of the project, dt is the period and $E(dv)$ is the increment expressed in the value of the project.

The value of the project is in function of the price. In the case of egg production, the hens are the asset, thus the value of the hens will be the price per kilo of egg by their average yield. In the present case, when referring to price, this was already adjusted by

Cuadro 1. Distribución de las empresas avícolas según estratificación.

Table 1. Distribution of the poultry producers according to stratification.

Tamaño de la empresa	1996	2015
Grande	6	10
Mediana	34	38
Pequeña	170	121

Movimiento geométrico Browniano y la proyección del precio

El precio ajustado por rendimiento de la gallina tiene un comportamiento en el tiempo referido como movimiento geométrico Browniano (Dixit y Pindyck, 1994; Trigeorgis, 1996):

$$dp = \mu P dt + \sigma P dz \tag{2}$$

donde dp es el incremento del precio, μ es la media de la tasa continua de movimiento de los precios reales $\ln\left(\frac{P}{P_{t-1}}\right) = \hat{r}_t$, P es el precio real, σ es la desviación estándar de las tasas de movimiento continuas, dt es el incremento del tiempo y dz es el movimiento de una variable aleatoria z con una distribución normal (0,1). Se supone que $(dz)^2 = dt$ y $(dt)^2 = 0$, entonces dz se comporta como un proceso de Wiener, donde $E(dz) = 0$. Esto permite hacer simulaciones Monte Carlo para estimar el precio real para el año 2030.

La simulación Monte Carlo se utilizó con el programa @Risk (en versión de prueba para fines académicos; Palisade, 2018), para estimar el comportamiento aleatorio de dz de la ecuación (2) y calcular los posibles precios futuros (Sobol, 1983).

Lema de Ito y la estimación del valor del activo

El lema de Ito señala que el incremento de una variable (dv), que es función de otra variable (dp) y del tiempo (dt), se puede expresar como (Dixit y Pindyck, 1994):

$$dv = v' dp + \frac{1}{2} v'' dp^2 \tag{3}$$

donde v' es la primera derivada con respecto al precio y v'' es la segunda derivada. Con las ecuaciones 1 y 2 se puede reescribir la ecuación 3 como:

$$\varepsilon(dv) = v' (\mu P dt + \sigma P dz) + \frac{1}{2} v'' (\mu P dt + \sigma P dz)^2$$

Al tomar en cuenta los supuestos de que $dz^2 = dt$, $dt^2 = 0$ y $E(dz) = 0$ la ecuación se puede reescribir como:

$$\begin{aligned} \varepsilon(dv) &= \mu P v' dt + \sigma P v \varepsilon(dz) + \frac{1}{2} v'' (\mu P dt)^2 + \frac{1}{2} v'' (\sigma P dz)^2 + 2 [\mu P \sigma P d + \varepsilon(dz)] \\ \partial v dt &= \mu P v' dt + \frac{1}{2} \sigma^2 P^2 v'' dt \end{aligned}$$

después de dividir entre dt y reordenando la ecuación anterior, se obtiene:

$$\frac{1}{2} \sigma^2 P^2 v'' + \mu P v' - \partial v = 0 \tag{4}$$

yield. The value of the asset (hen) as a function of the price and time is denoted as: $V(P,t)$.

Brownian geometric movement and price projection

The adjusted price per yield of the hen has a behavior in time referred to as Brownian geometric movement (Dixit and Pindyck, 1994; Trigeorgis, 1996):

$$dp = \mu P dt + \sigma P dz \tag{2}$$

dp is the increment of the price, μ is the mean of the continuous rate of movement of the real prices $\ln\left(\frac{P}{P_{t-1}}\right) = \hat{r}_t$, P is the real price, σ is the standard deviation of the rates of continuous movement, dt is the increment of the time and dz is the movement of a random variable z with a normal distribution (0,1). It is assumed that $(dz)^2 = dt$ and $(dt)^2 = 0$, then dz behaves like a Wiener process, where $E(dz) = 0$. This allows making Monte Carlo simulations for estimating the real price for the year 2030.

The Monte Carlo simulation was employed with the program @Risk (in test version for academic purposes; Palisade, 2018), to estimate the random behavior of dz of equation (2) and to calculate the possible future prices (Sobol, 1983).

Ito's motto and the estimation of the asset value

Ito's motto indicates that the increment of a variable (dv), that is the function of another variable (dp) and of time (dt), can be expressed as (Dixit and Pindyck, 1994):

$$dv = v' dp + \frac{1}{2} v'' dp^2 \tag{3}$$

where v' is the first derivative with respect to price and v'' is the second derivative. With equations 1 and 2, equation 3 can be rewritten as:

$$\varepsilon(dv) = v' (\mu P dt + \sigma P dz) + \frac{1}{2} v'' (\mu P dt + \sigma P dz)^2$$

Considering the assumptions that $dz^2 = dt$, $dt^2 = 0$ and $E(dz) = 0$ the equation can be rewritten as

$$\begin{aligned} \varepsilon(dv) &= \mu P v' dt + \sigma P v \varepsilon(dz) + \frac{1}{2} v'' (\mu P dt)^2 + \frac{1}{2} v'' (\sigma P dz)^2 + 2 [\mu P \sigma P d + \varepsilon(dz)] \\ \partial v dt &= \mu P v' dt + \frac{1}{2} \sigma^2 P^2 v'' dt \end{aligned}$$

after dividing by dt and reordering the above equation, the following is obtained:

El valor del activo puede representarse por una ecuación exponencial en función del precio real y con solución complementaria o solución homogénea (Chiang y Wainwright, 2006) que se puede interpretar como la opción real a expandir el proyecto.

$$V = AP^\lambda \tag{5}$$

donde A y λ son variables a estimar. De la ecuación 5 se deriva V' y V'' :

$$\begin{aligned} V' &= A\lambda P^{\lambda-1} \\ V'' &= A\lambda(\lambda-1)P^{\lambda-2} \end{aligned}$$

después de sustituir V' y V'' en la ecuación 4, se obtiene:

$$\begin{aligned} \frac{1}{2}\sigma^2 P^2 (A\lambda(\lambda-1)P^{\lambda-2}) + \mu P (A\lambda P^{\lambda-1}) - \partial AP^\lambda &= 0 \\ \frac{1}{2}\sigma^2 P^2 P^\lambda P^{-2} [A\lambda(\lambda-1)] + \mu\lambda P P^\lambda P^{-1} - \partial AP^\lambda &= 0 \end{aligned}$$

Si se elimina A y P^λ

$$\frac{1}{2}\sigma^2 \lambda^2 + \lambda \left(-\frac{1}{2}\sigma^2 + \mu \right) \lambda - \partial = 0 \tag{6}$$

Como es una ecuación cuadrática de segundo orden, tiene solución para λ_1 y λ_2 :

$$\lambda_{1,2} = \frac{-(-1/2\sigma^2 + \mu) \pm \sqrt{(-\sigma^2/2 + \mu)^2 - 4(\sigma^2/2)(-\partial)}}{2(\sigma^2/2)} \tag{7}$$

donde se espera que $\lambda_1 > 1$ y $\lambda_2 < 0$ se usa solo $\lambda_1 > 1$ ya que $\lambda_2 < 0$ permite que el valor del proyecto sea $v(0) = 0$ cuando $P=0$.

La solución total para el valor del activo en producción es la suma de la opción a expandir, que es la solución complementaria más la solución particular, que representa el valor presente del activo a perpetuidad (en este caso, con remplazo de la parvada):

$$v = AP^\lambda + \frac{P}{\partial - \mu} - \frac{c}{r} \tag{8}$$

donde $\frac{P}{\partial - \mu} - \frac{c}{r}$ es el valor presente del flujo de efectivo si se considera que el proyecto es una perpetuidad y AP^λ es el valor de la opción de expandir, donde c es el costo, r la tasa libre de riesgo, μ es la tendencia, se requiere $\partial > \mu$ (Brambila, 2011; Ross *et al.*, 2000; Mun, 2002).

$$\frac{1}{2}\sigma^2 P^2 v'' + \mu P v' - \partial v = 0 \tag{4}$$

The active value can be represented by an exponential equation as a function of the real price and with a complementary solution or homogenous solution (Chiang and Wainwright, 2006) that can be interpreted as the real option for expanding the project.

$$V = AP^\lambda \tag{5}$$

where A and λ are variables to be estimated. From equation 5, V' and V'' are derived:

$$\begin{aligned} V' &= A\lambda P^{\lambda-1} \\ V'' &= A\lambda(\lambda-1)P^{\lambda-2} \end{aligned}$$

after substituting V' and V'' in equation 4, the following is obtained:

$$\begin{aligned} \frac{1}{2}\sigma^2 P^2 (A\lambda(\lambda-1)P^{\lambda-2}) + \mu P (A\lambda P^{\lambda-1}) - \partial AP^\lambda &= 0 \\ \frac{1}{2}\sigma^2 P^2 P^\lambda P^{-2} [A\lambda(\lambda-1)] + \mu\lambda P P^\lambda P^{-1} - \partial AP^\lambda &= 0 \end{aligned}$$

If A and P^λ are eliminated

$$\frac{1}{2}\sigma^2 \lambda^2 + \lambda \left(-\frac{1}{2}\sigma^2 + \mu \right) \lambda - \partial = 0 \tag{6}$$

Because it is a second order quadratic equation, it has a solution for λ_1 y λ_2 :

$$\lambda_{1,2} = \frac{-(-1/2\sigma^2 + \mu) \pm \sqrt{(-\sigma^2/2 + \mu)^2 - 4(\sigma^2/2)(-\partial)}}{2(\sigma^2/2)} \tag{7}$$

where it is expected that $\lambda_1 > 1$ and $\lambda_2 < 0$, only $\lambda_1 > 1$ is used, given that $\lambda_2 < 0$ allows the value of the project to be $v(0) = 0$ when $P=0$.

The total solution for the value of the asset in production is the sum of the option to expand, which is the complementary solution plus the particular solution, which represents the present value of the asset to perpetuity (in this case, with replacement of the flock):

$$v = AP^\lambda + \frac{P}{\partial - \mu} - \frac{c}{r} \tag{8}$$

El valor de A se estima como (Dixit y Pindyck, 1994):

$$A = \frac{(\lambda - 1)^{\lambda-1}}{\lambda^\lambda (I)^{\lambda-1}} \quad (9)$$

Para estimar la relación mínima que debe haber entre el valor del proyecto v y la inversión I , la teoría tradicional establece que si $\frac{V}{I} > 1$ se debe invertir en el proyecto, pero no toma en cuenta que hay volatilidad de precios y rendimientos. Así que si $F(V)$ es la opción de invertir y se considera que la solución complementaria es:

$$F(V) = AV^\lambda \quad (10)$$

donde $F(V) = v - I$, que significa que la opción de expandir solo se ejerce si $F(V) > 0$, o sea $V > I$. Se asume que $F'(V) = 1$, es decir, que la opción de invertir aumenta si el valor del proyecto aumenta, donde:

$$F'(V) = 1 = \lambda AV^{\lambda-1} \quad (11)$$

Después de resolver las ecuaciones 10 y 11, se obtiene:

$$F(V) = V - I = AV^\lambda$$

$$A = \frac{V - I}{V^\lambda} = \frac{1}{\lambda V^{\lambda-1}}$$

$$(V - I) \lambda V^{\lambda-1} = V^\lambda$$

Después de simplificar:

$$\frac{V}{I} = \frac{\lambda}{\lambda - 1} \quad (12)$$

La ecuación 12 señala que $\frac{V}{I}$ puede ser mayor a uno porque el valor del activo depende de su tendencia de precios, σ desviación estándar y r tasa libre de riesgo. A mayor riesgo mayor es la relación $\frac{V}{I}$ que se requiere para hacer la inversión.

El productor de huevo genérico comercial tiene la opción real en el 2014, de continuar en el negocio (expandir) o de salirse dada la expectativa del valor del activo para el 2030. La opción real de expandir se puede considerar como un *Call* en el lenguaje financiero internacional (Hull, 2003; Trigeorgis, 1996) y estimarse con el modelo de Black-Scholes (Black y Scholes, 1973).

$$C = SN(d_1) - Ke^{-rt} N(d_2) \quad (13)$$

$$d_i = \frac{\ln\left(\frac{S}{K}\right) + r\left(\frac{\sigma^2}{2}\right)t}{\sigma\sqrt{t}} \quad (14)$$

where $\frac{P}{\partial - \mu} - \frac{c}{\partial}$ is the present value of the cash flow if it is considered that the project is a perpetuity and AP^{∂} is the value of the option to expand, where c is the cost, r the risk free rate, μ is the tendency, $\partial > \mu$ is required (Brambila, 2011; Ross *et al.*, 2000; Mun, 2002).

The value of A is estimated as (Dixit and Pindyck, 1994):

$$A = \frac{(\lambda - 1)^{\lambda-1}}{\lambda^\lambda (I)^{\lambda-1}} \quad (9)$$

To estimate the minimum relationship there should be between the value of the project and the investment I , the traditional theory establishes that if $\frac{V}{I} > 1$, then investment in the project should occur, but it does not take into account that there is volatility of prices and yields. Thus, if $F(V)$ is the option of investing and it is considered that the complementary solution is

$$F(V) = AV^\lambda \quad (10)$$

where $F(V) = v - I$, which means that the option of expansion is only applied if $F(V) > 0$, or $V > I$. It is assumed that $F'(V) = 1$, that is, that the option of investing increases if the value of the project increases, where:

$$F'(V) = 1 = \lambda AV^{\lambda-1} \quad (11)$$

After solving equations 10 and 11, the following is obtained:

$$F(V) = V - I = AV^\lambda$$

$$A = \frac{V - I}{V^\lambda} = \frac{1}{\lambda V^{\lambda-1}}$$

$$(V - I) \lambda V^{\lambda-1} = V^\lambda$$

After simplifying:

$$\frac{V}{I} = \frac{\lambda}{\lambda - 1} \quad (12)$$

Equation 12 indicates that $\frac{V}{I}$ can be greater than one because the value of the asset depends on its price tendency, σ standard deviation and r risk free rate. The greater the risk $\frac{V}{I}$, the higher the ratio required to make the investment.

The producer of commercial generic egg has the real option in 2014 of continuing in the business (expand) or to get out, given the expectation of the value of the asset for 2030. The real option of expanding can be considered as a *Call* in international

$$d_2 = d_1 - \sigma\sqrt{t} \tag{15}$$

donde C es el valor de la opción de expandir la producción según el tamaño del productor; S es el valor de la gallina en el 2014; K es el valor de la gallina en el 2030; r es la tasa libre de riesgo (5% para fines de esta investigación); t es el tiempo de 2014 a 2030; σ es la desviación estándar de la tasa continua de movimiento del precio real por gallina (definido por el precio del huevo por el rendimiento); $N(d_1)$ es la probabilidad de tabla Z de d_1 , y $N(d_2)$ es la probabilidad de tabla Z de d_2 .

Es de esperarse que a mayor costo la opción de expandir sea más costosa. Esto es, si las empresas pequeñas tienen un costo de producción alto, es probable que no les convenga financieramente continuar en la producción, a menos que logren un precio mayor por su producto.

Datos y cálculos

Para el cálculo de precios reales se utilizó el precio promedio al productor de huevo del período 1980-2014 (SIAP, 2018) y el índice nacional de precios al consumidor, base de datos 2014 (INEGI, 2018). El rendimiento promedio anual por ave se calculó dividiendo la producción nacional de huevo entre el inventario nacional de aves ponedoras (SIAP, 2018). De ahí se obtuvo el valor del activo (gallina).

La tasa continua de movimiento del valor del activo (que es el precio real de la gallina) se calculó usando $\ln\left(\frac{P_t}{P_{t-1}}\right) = \hat{r}$ y se estimó su media (μ) y la desviación estándar (σ). La tasa libre de riesgo es el valor real a largo plazo de certificado de la tesorería que subasta BANXICO y es de 5%.

Los costos de producción se obtuvieron con base en el compendio de indicadores económicos del sector avícola (UNA, 2015; 2016; 2017) y equivalen a un porcentaje del precio. Para el 2014 se estimó que el costo para los pequeños productores asciende a \$200 pesos mexicanos (equivalentes a 10.50 USD, al tipo de cambio de \$19.05 por dólar), para los medianos \$190 MXN y para los grandes \$180 MXN pesos.

La estimación del movimiento browniano calculado con la Ecuación 2 para el periodo 1980-2014 es:

$$dp = -0.00592498Pdt + 0.114328Pdz.$$

La simulación con método Monte Carlo permitió postular que el valor del activo promedio se reducirá con el paso del tiempo, y que para el 2020 llegará a ser de \$256.39 MXN, para el 2025 será de \$255.68 MXN, y para el 2030 se reducirá hasta \$215.57 MXN (Figura 1).

financial terms (Hull, 2003; Trigeorgis, 1996) and can be estimated with the Black-Scholes model (Black and Scholes, 1973).

$$C = SN(d_1) - Ke^{-rt} N(d_2) \tag{13}$$

$$d_1 = \frac{\ln\left(\frac{S}{K}\right) + r\left(\frac{\sigma^2}{2}\right)t}{\sigma\sqrt{t}} \tag{14}$$

$$d_2 = d_1 - \sigma\sqrt{t} \tag{15}$$

where C is the value of the option of expanding production according to the size of the producer; S is the value of the hen in 2014; K is the value of the hen in 2030; r is the risk free rate (5% for purposes of this investigation); t is the time of 2014 to 2030; σ is the standard deviation of the continuous rate of movement of the real price per hen (defined by the price of egg times yield); $N(d_1)$ is the probability of table Z of d_1 , and $N(d_2)$ is the probability of table Z of d_2 .

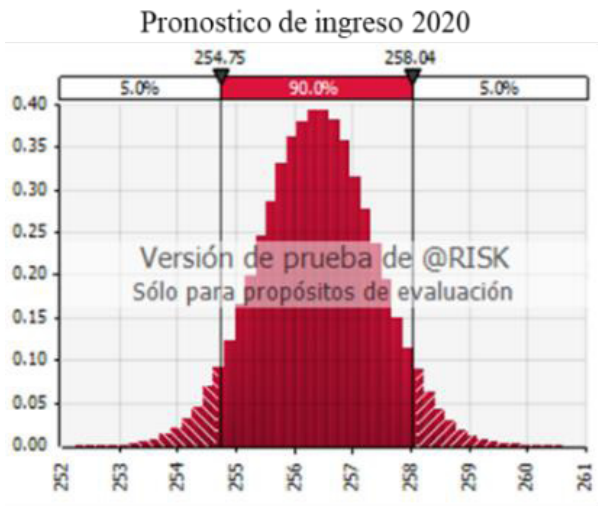
It is to be expected that the higher the cost the more expensive the option of expanding. That is, if the small businesses have a high production cost, it is probable that it will not be financially convenient for them to continue production, unless they can obtain a higher price for their product.

Data and calculations

For the calculation of real prices, the average price to the egg producer was calculated for the period 1980-2014 (SIAP, 2018) and the national index of prices to the consumer, data base 2014 (INEGI, 2018). The average annual yield per hen was calculated by dividing the national egg production by the national inventory of laying hens (SIAP, 2018). From this figure the value of the asset (hen) was obtained.

The continuous rate of movement of the value of the asset (which is the real price of the hen) was calculated using $\ln\left(\frac{P_t}{P_{t-1}}\right) = \hat{r}$ and its mean (μ) was estimated along with the standard deviation (σ). The risk-free rate is the long term real value of treasury certificate auctioned by BANXICO which is 5%.

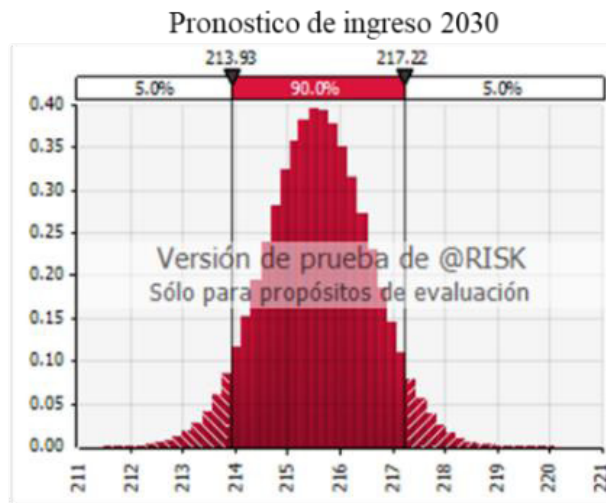
The production costs were obtained based on the compendium of economic indicators of the poultry sector (UNA, 2015; 2016; 2017) and are equivalent to a percentage of the price. For 2014, it was estimated that the cost for the small producers would rise to \$200 Mexican pesos (equivalent to 10.50 USD, at the exchange rate of \$19.05 per dollar), for medium sized producers, \$190 MXN and for large producers, \$180 MXN.



Estadísticos 2020	
Mínimo	252.22
Máximo	260.60
Media	256.39



Estadísticos 2025	
Mínimo	221.43
Máximo	229.80
Media	225.68



Estadísticos 2030	
Mínimo	211.46
Máximo	220.09
Media	215.57

Figura 1. Pronósticos de ingreso 2020, 2025, 2030.
 Figure 1. Predictions of income 2020, 2025, 2030.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cálculo de la distribución del mercado para el 2030 usando cadenas de probabilidad de Markov permite determinar que de continuar con las tendencias dicho mercado se concentraría según el Cuadro 2.

Si los pequeños productores de huevo genérico no buscan opciones que les permitan reducir costos o incrementar sus ingresos, se estima que para el 2030 el mercado del huevo podría concentrarse en empresas grandes y es posible que la producción de 50% de las empresas pequeñas ya no exista.

Al aplicar la ecuación de Bellmann (Ecuación 1), el valor del activo en el 2014 fue de \$271.18 MXN pesos, si se deposita esta cantidad en un bono libre de riesgo a largo plazo, a una tasa de interés de 5%, el valor en el 2030 será: $(1 + 0.05)^{16} (271.18) = 591.95$, entonces, si el valor del activo (gallina) en el 2030 es menor a esta cantidad, no se deberá seguir invirtiendo en la producción de huevo.

La ecuación Browniana estimó $dp = -0.00542498Pdt + 0.114328Pdz$ dado que $\mu = -0.00542498$, $\sigma = 0.114329$ y $r = 0.05$, con estos datos (se operó la Ecuación 7) y se determinaron los valores de $\lambda_1 = 3.82359$ y $\lambda_2 = -1.99465$. Con los valores estimados λ_1 y λ_2 , se calculó el valor de A usando la Ecuación 9.

Después de aplicar los resultados de la simulación Monte Carlo en promedio el precio real ajustado por rendimiento es de \$248.60 MXN para el 2030 (en términos reales los costos se mantuvieron como en 2014). El valor del activo (gallina) considerado en la opción de expandir $[(0.15) (10)^{-7}(P^{3.824})]$, y el valor presente neto tradicional $\frac{P}{0.05 + 0.00543} - \frac{c}{0.05}$ para cada tamaño de empresa se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 2. Distribución de las empresas avícolas según estratificación, proyección 2030.

Table 2. Distribution of the poultry producers according to stratification, projection 2030.

Tamaño de la empresa	Estimación 2030
Grande	19
Mediana	38
Pequeña	59
Salen	53

The estimation of the Brownian movement calculated with Equation 2 for the period 1980-2014 is as follows:

$$dp = -0.00592498Pdt + 0.114328Pdz.$$

The simulation with the Monte Carlo method made it possible to postulate that the average value of the asset will be lowered with the passing of time, and that for 2020 it will be \$256.39 MXN, for 2025 it will be \$225.68 MXN and for 2030 it will drop to \$215.57 MXN (Figure 1).

RESULTS AND DISCUSSION

The calculation of the market distribution for 2030 using Markov probability chains makes it possible to determine that if these tendencies continue, the market will be concentrated according to Table 2.

If the small generic egg producers do not find options that allow them to reduce costs or increase their income, it is estimated that by 2030 the egg market will be concentrated in large companies and it is possible that the production of 50% of the small producers will no longer exist.

By applying the Bellman equation (Equation 1), the value of the asset in 2014 was \$271.18 MXN pesos, if this amount is deposited in a risk-free long term bond, at an interest rate of 5%, the value in 2030 will be: $(1 + 0.05)^{16} (271.18) = 591.95$, therefore, if the value of the asset (hen) in 2030 is lower than this amount, it is infeasible to continue investing in egg production.

The Brownian equation estimated $dp = -0.00542498Pdt + 0.114328Pdz$ given that $\mu = -0.00542498$, $\sigma = 0.114329$ and $r = 0.05$. This data was used for Equation 7 and the values of $\lambda_1 = 3.82359$ and $\lambda_2 = -1.99465$ were determined. With the estimated values λ_1 and λ_2 , the value of A was calculated using Equation 9.

After applying the results of the Monte Carlo simulation, on the average the real price adjusted per yield is \$248.60 MXN for 2030 (in real terms the costs were maintained as in 2014). The value of the asset (hen) considered in the option of expanding $[(0.15) (10)^{-7}(P^{3.824})]$, and the traditional net present value $\frac{P}{0.05 + 0.00543} - \frac{c}{0.05}$ for each size of producer are shown in Table 3.

If the investment (\$271.18 MXN) is deposited in 2014 at a risk-free rate (5%), in 2030 the value

Si la inversión (\$271.18 MXN) se deposita en el 2014 a una tasa libre de riesgo (5%) en el 2030, el valor del activo será de \$591.45 pesos mexicanos. La comparación con los resultados del Cuadro 3 permite observar que las empresas pequeñas están por debajo de este valor, lo que se puede interpretar como que esas empresas (si continúan tal como están) probablemente cierren. Como era de esperarse, las empresas grandes y medianas se expandirán o mantendrán dentro de la producción.

El resultado de la Ecuación 12 es:

$$\frac{V}{T} = \frac{3.82359}{3.82359 - 1} = 1.354$$

lo que se interpreta como: “cualquier proyecto de producción de huevo debe tener \$1.35 MXN pesos de beneficio por peso invertido, esto debido a la tendencia y volatilidad del precio del huevo y del rendimiento por gallina”

El valor del *Call* que es la opción de expandir la producción, se obtiene de las ecuaciones 13 a 15.

Para el productor pequeño:

$$C = 271.18 N(d_1) - 541.23 e^{-0.05(16)}$$

$$d_1 = \frac{\ln\left(\frac{271.18}{541.23}\right) + \left(0.05 + \frac{0.01307}{2}\right)16}{0.1143\sqrt{16}} = -1.51$$

$$d_2 = -1.51 - 0.4576 = -1.97$$

$$C = 271.18 (0.1469) - 243.1948(0.0228) = 39.29$$

Para el productor mediano:

$$C = 271.18 (0.0139) - 333.09 (0.0035) = 2.60$$

Para el productor grande:

$$C = 271.18 (0.0032) - 422.92 (0.0007) = 0.57$$

Esto es, el costo de la opción de expandir la producción de huevo es más elevado para los pequeños productores, a quienes les cuesta \$39.29 MXN pesos por gallina la continuación en el negocio, en comparación de los \$2.60 pesos o los 57 centavos (\$0.57 MXN) que les cuesta a los medianos y grandes la opción de expandirse.

Cuadro 3. Valor del activo (gallina) y costo en 2030 según tamaño de la empresa.
Table 3. Value of the asset (hen) and cost in 2030 according to size of producer.

Tamaño de la empresa	Costo	Valor del activo (gallina)
Grandes	\$180.00	\$941.23
Medianos	\$190.00	\$741.23
Pequeños	\$200.00	\$541.23

of the asset will be \$591.45 Mexican pesos. The comparison with the results of Table 3 shows that the small producers are below this value, which can be interpreted to mean that these producers (if they continue as they are) will probably close. As would be expected, the large and medium sized businesses will expand or remain in production.

The result of Equation 12 is as follows:

$$\frac{V}{T} = \frac{3.82359}{3.82359 - 1} = 1.354$$

which is interpreted as: “any egg production project should have \$1.35 MXN pesos of benefit per peso invested, due to the tendency and volatility of the price of egg and of the yield per hen”.

The value of the *Call* which is to expand production, is obtained from equations 13 to 15.

For the small producer:

$$C = 271.18 N(d_1) - 541.23 e^{-0.05(16)}$$

$$d_1 = \frac{\ln\left(\frac{271.18}{541.23}\right) + \left(0.05 + \frac{0.01307}{2}\right)16}{0.1143\sqrt{16}} = -1.51$$

$$d_2 = -1.51 - 0.4576 = -1.97$$

$$C = 271.18 (0.1469) - 243.1948(0.0228) = 39.29$$

For the medium sized producer:

$$C = 271.18 (0.0139) - 333.09 (0.0035) = 2.60$$

For the large producer:

$$C = 271.18 (0.0032) - 422.92 (0.0007) = 0.57$$

CONCLUSIONES

La tendencia mostrada por el modelo es que las empresas grandes dominarán el mercado de huevo genérico, al limitar el producto diferenciado, si no se aplica una estrategia de reducción de costos o se incrementan los ingresos para mejorar el precio a los pequeños productores.

La reducción de costos se lograría a través de compras consolidadas de alimentos balanceados, y mejor manejo de parvadas, entre otros. El incremento de los ingresos se obtendría a través del incremento en el rendimiento, la reducción de costos, los productos diferenciados o su individualización.

El valor del activo (gallina) es 75% y 40% mayor en las empresas grandes y medianas en relación a los pequeños, debido a la diferencia en costos. Los pequeños productores deben buscar una ventaja en precio o costo, que permita incrementar sus utilidades para poder seguir en la producción, porque el costo de su opción real de expandirse es demasiado alto (\$39.29 pesos por gallina en relación al 2.6 y 0.57 pesos para las medianas y grandes respectivamente).

La disparidad en el valor competitivo se demuestra al definir que si el pequeño productor quiere expandir su negocio debe invertir \$39.29 MXN pesos por cada gallina ponedora que quiera agregar; mientras que, si los grandes quieren expandirse, solo deberán invertir \$0.57 MXN pesos por ave extra.

LITERATURA CITADA

- Brambila P, J. J. 2011. Bioeconomía: Instrumentos para su Análisis Económico. Editorial SAGARPA, México. 312 p.
- Black, F., and M. Scholes. 1973. The pricing of options and corporate liabilities. *J. Polit. Economy* 81: 637-654.
- Dixit, A. K., and R. S. Pindyck 1994. *Investment Under Uncertainty*. Princeton University Press., New Jersey. 468 p.
- CEFP (Centro de Estudios de las Finanzas Públicas). 2015. Análisis del impacto del precio en el consumo de huevo en México. Editorial CEFP, México. 8 p.
- Chiang, C. A., y K. Wainwright. 2006. *Métodos Fundamentales de la Economía Matemática. Análisis dinámico* (Cap. 14-18). Editorial Mc Graw Hill/INTERAMERICANA. México, D.F. pp: 444 - 591.
- Hull J. C. 2003. *Options, Futures, & Other Derivatives*. 5a. ed. Prentice Hall. New York. 744 p.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) 2018. Índice Nacional de Precios al Consumidor - Huevo genérico. <http://www.inegi.org.mx> (Consulta: enero 2018).
- Mun, J. 2002. *Real Options Analysis: Tools and Techniques for Valuing Strategic Investments and Decisions*. John Wiley and Sons. New York. 386 p.

That is, the cost of the option of expanding egg production is higher for the small producers, for whom it costs \$39.29 MXN pesos per hen to continue in the business, compared with \$2.60 pesos or 57 cents (\$0.57 MXN) which it costs the medium and large sized producers for the option of expanding.

CONCLUSIONS

The tendency shown in the model is that the large producers will dominate the generic egg market, by limiting the differentiated product, if a strategy of cost reduction is not applied or if income is not increased to improve the price to the small producers.

The reduction of costs will be achieved through the consolidated purchase of balanced feed, and better management of flocks, among others. The increment of income would be obtained through the increase in yield, reduction of costs, differentiated products or their individualization.

The value of the asset (hen) is 75% and 40% higher in the large and medium sized production units with respect to the small ones, due to the difference in costs. The small producers should seek an advantage in price or cost, that will permit them to increase their utilities in order to continue in production, because the cost of their real option of expanding is too high (\$39.29 pesos per hen compared with 2.6 and 0.57 pesos for the medium sized and large producers, respectively).

The disparity in the competitive value is shown by defining that if the small producer wishes to expand his business, he must invest \$39.29 MXN pesos for each laying hen he wishes to add; whereas if the large producers wish to expand, they only need to invest \$0.57 MXN pesos per extra hen.

—End of the English version—

-----*-----

- Palisade. 2018. Open Access Downloaded Program @Risk www.palisade.com. (Consulta: junio 2018).
- Pinsky M. A. and S. Karlin 2010. *An Introduction to Stochastic Modeling*. Academic Press, fourth edition. Stanford. 584 p.
- Ross, S. A., R. W. Westerfield, y B. D. Jordan. 2000. *Fundamentos de Finanzas Corporativas*. 5ª McGraw-Hill. Madrid, España. 912 p + Aps.

- Sobol I., M. 1983. Método de Montecarlo. 2da ed. Editorial MIR, Moscú. 78 p.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Estadísticos de producción por producto (Huevo comercial) período 1980 a 2014. SIAP Organismo descentrado. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/op-testadisticasiacon2014parcialasiacon-zip/>. (Consulta: enero 2018).
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017. La Dieta de la Milpa, Modelo de Alimentación, Mesoamérica Biocompatible. Libro digital disponible en www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/98453/La_Dieta_de_la_Milpa.pdf. (Consulta: enero 2018).
- Trigeorgis, L. 1996. Real Options: Managerial Flexibility and Strategy in Resource Allocation. The MIT Press, Cambridge, MA. 427 p.
- SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos). 1990. Compendio histórico estadístico del subsector pecuario 1972-1988, SARH, México, D.F.
- UNA (Unión Nacional de Avicultores). 2015. Indicadores económicos. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2016. UNA, México, D.F. 64 p.
- UNA (Unión Nacional de Avicultores). 2016. Indicadores económicos. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2016. UNA, México, D.F. 71 p.
- UNA (Unión Nacional de Avicultores). 2017. Indicadores económicos. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2017. UNA, México, D.F. 68 p.