

CONTENIDO ❖ CONTENTS		
Volumen 54	1 de abril - 15 de mayo, 2020	Número 3
Agua-Suelo-Clima / Water-Soil-Climate		
PRONÓSTICO HORARIO DE CAUDALES MEDIANTE FILTRO DE KALMAN DISCRETO EN EL RÍO HUAYNAMOTA, NAYARIT, MÉXICO / HOURLY STREAMFLOW FORECASTING FOR THE HUAYNAMOTA RIVER, NAYARIT, MEXICO, USING THE DISCRETE KALMAN FILTER. Leticia Alvarado-Hernández , Laura A. Ibáñez-Castillo , Agustín Ruiz-García , Fernando González-Leiva , Mario A. Vázquez-Peña		295
Biotecnología / Biotechnology		
IDENTIFICACIÓN DE DIVERSIDAD PATOGENICA DE <i>Phomopsis</i> sp. CAUSAL DEL TIZÓN DEL TALLO Y VAINA EN SOYA (<i>Glycine max</i>) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES / IDENTIFICATION OF PATHOGENIC DIVERSITY IN <i>Phomopsis</i> sp. CAUSING STEM BLIGHT IN SOYBEANS (<i>Glycine max</i>) BY MOLECULAR MARKERS. Facundo Ezequiel-Hernández , Alejandra M. Peruzzo , Guillermo R. Pratta , Rosanna N. Pioli		313
Ciencia de los Alimentos / Food Science		
PRINCIPALES MOTIVACIONES DEL CONSUMIDOR DE ALIMENTOS ECOLÓGICOS EN ITALIA. EL CASO DEL ACEITE DE OLIVA / MAIN MOTIVATIONS OF ORGANIC FOOD CONSUMERS IN ITALY. THE CASE OF OLIVE OIL. Manuela Vega-Zamora , Simona Naspetti , Raffaele Zanoli		327
ADICIÓN DE GARBANZO (<i>Cicer arietinum</i> L.) Y TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i>) DESHIDRATADO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y VIDA DE ANAQUEL DE SALCHICHA TIPO FRANKFURT / ADDITION OF CHICKPEA (<i>Cicer arietinum</i> L.) AND DEHYDRATED TOMATO (<i>Solanum lycopersicum</i>) ON ANTIOXIDANT CAPACITY AND SHELF-LIFE OF FRANKFURTER SAUSAGE. Nora E. Ponce-Fernández , Gregorio Pollorena-López , Cindy Rosas-Domínguez , Vida M. López-Peñuelas , Sandra C. Osuna-Izaguirre		337
Fauna Silvestre / Wildlife		
DIFERENCIACIÓN DEL SEXO DEL GORRIÓN DE BAIRD (<i>Centronyx bairdii</i>) POR MEDIO DE REDES NEURONALES ARTIFICIALES Y DATOS MORFOMÉTRICOS / SEX DIFFERENTIATION OF THE BAIRD SPARROW (<i>Centronyx bairdii</i>) THROUGH ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS AND MORPHOMETRIC DATA. Martin E. Pereda-Solís , Francisco García-Fernández , Daniel Sierra-Franco , José H. Martínez-Guerrero , Irene Ruvalcaba-Ortega , Erin Hennegan-Strasser		353
Fitociencia / Crop Science		
SEED YIELD AND FATTY ACID COMPOSITION IN SESAME (<i>Sesamum indicum</i> L.) AS AFFECTED BY SILICON APPLICATION UNDER A SEMI-ARID CLIMATE / EFECTO DE LA APLICACIÓN DE SILICIO EN EL RENDIMIENTO DE SEMILLAS Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN AJONJOLÍ (<i>Sesamum indicum</i> L.) EN UN CLIMA SEMIÁRIDO. Abdul Manaf , Mehreen Shoukat , Ahmad Sher , Abdul Qayyum , Ahmad Nawaz		367
INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PRECIPITACIÓN Y RADIACIÓN SOLAR EN EL RENDIMIENTO DE MAÍZ EN EL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO / INFLUENCE OF TEMPERATURE, PRECIPITATION AND SOLAR RADIATION ON MAIZE YIELD IN THE VALLEY OF TOLUCA MÉXICO. Alejandro Morales-Ruiz , Ernesto Díaz-López		377
IMPROVEMENT OF DIRECT REGENERATION OF MEXICAN SOYBEAN FROM COTYLEDONARY NODES / MEJORA DE LA REGENERACIÓN DIRECTA DE SOYA MEXICANA A PARTIR DE NODOS COTILEDONALES. Soledad Mora-Vásquez , Silverio García-Lara , Edgardo J. Escalante-Vázquez , Guy A. Cardineau		387
NÍQUEL EN LA COMPOSICIÓN MINERAL Y EL RENDIMIENTO DE PIMIENTO MORRÓN (<i>Capsicum annuum</i> L.) CULTIVADO EN CASA SOMBRA / NICKEL IN THE MINERAL COMPOSITION AND YIELD OF BELL PEPPER (<i>Capsicum annuum</i> L.) GROWN IN A SHADE HOUSE. Saúl Parra-Terraza		401
ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS MINERALES ESENCIALES Y TÓXICOS EN TEJIDOS VEGETALES / ANALYSIS OF ESSENTIAL AND TOXIC MINERAL ELEMENTS IN PLANT TISSUE. Juliana Padilla-Cuevas , Hernani T. Yee-Madeira , Agustín Merino-García , Claudia Hidalgo , Jorge D. Etchevers		413

1 de abril - 15 de mayo, 2020

Agrociencia

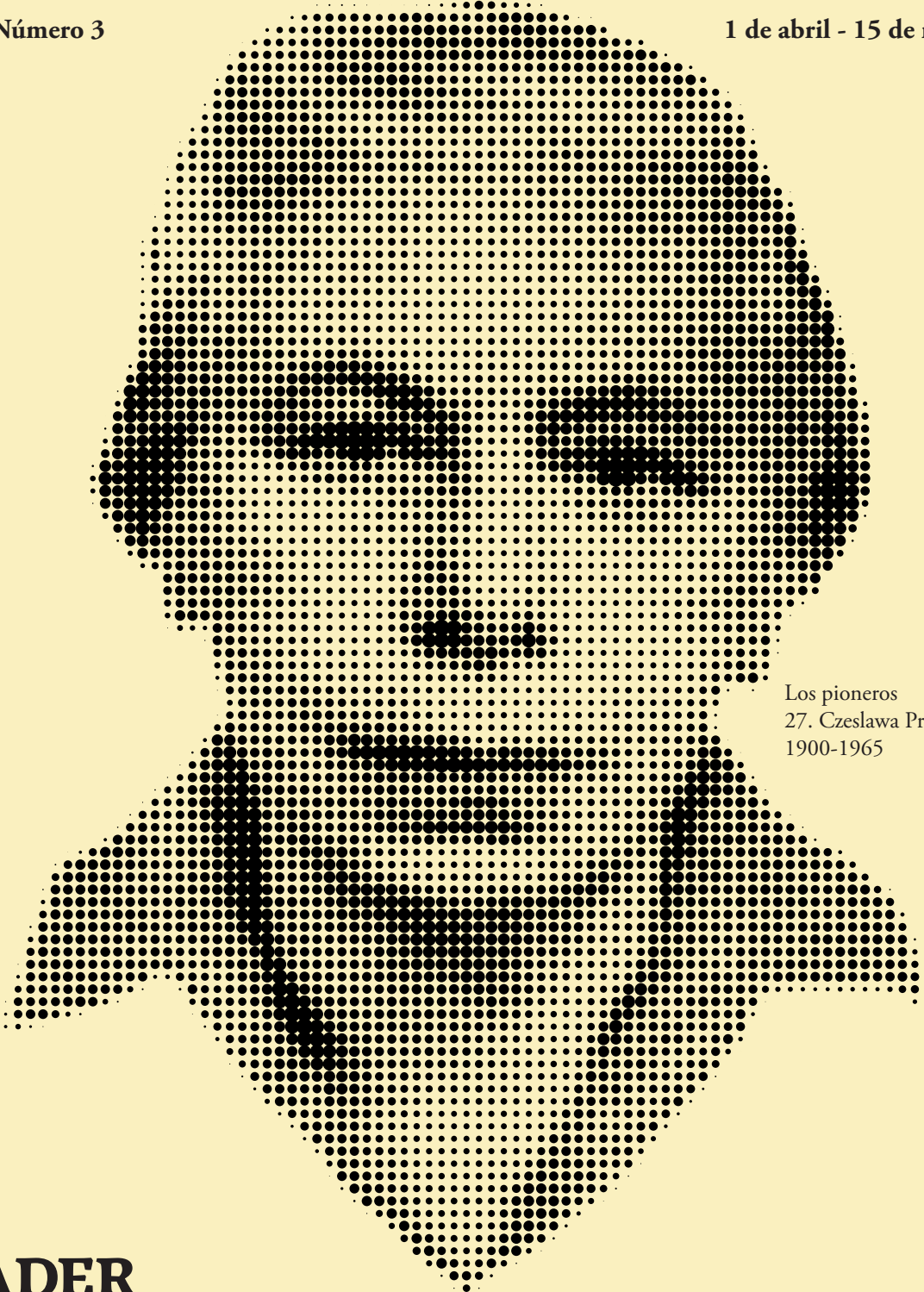
Volumen 54, Número 3: 295-457

ISSN 2521-9766

Agrociencia

Volumen 54, Número 3

1 de abril - 15 de mayo, 2020



Los pioneros
27. Czesława Prywer Lidzbarzka
1900-1965



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 3, 1 de abril - 15 de mayo 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, 15 de mayo 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 (TEAL), 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 Luis 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/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

Czesława Prywer Lidzbarska (1900-1965)

SADER
SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL



CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 54

1 de abril - 15 de mayo, 2020

Número 3

Agua-Suelo-Clima / Water-Soil-Climate

- PRONÓSTICO HORARIO DE CAUDALES MEDIANTE FILTRO DE KALMAN DISCRETO EN EL RÍO HUAYNAMOTA, NAYARIT, MÉXICO / HOURLY STREAMFLOW FORECASTING FOR THE HUAYNAMOTA RIVER, NAYARIT, MEXICO, USING THE DISCRETE KALMAN FILTER.
Leticia **Alvarado-Hernández**, Laura A. **Ibáñez-Castillo**, Agustín **Ruiz-García**, Fernando **González-Leiva**, Mario A. **Vázquez-Peña** 295

Biocnología / Biotechnology

- IDENTIFICACIÓN DE DIVERSIDAD PATOGENICA DE *Phomopsis* sp. CAUSAL DEL TIZÓN DEL TALLO Y VAINA EN SOYA (*Glycine max*) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES / IDENTIFICATION OF PATHOGENIC DIVERSITY IN *Phomopsis* sp. CAUSING STEM BLIGHT IN SOYBEANS (*Glycine max*) BY MOLECULAR MARKERS.
Facundo **Ezequiel-Hernández**, Alejandra **M. Peruzzo**, Guillermo **R. Pratta**, Rosanna **N. Pioli** 313

Ciencia de los Alimentos / Food Science

- PRINCIPALES MOTIVACIONES DEL CONSUMIDOR DE ALIMENTOS ECOLÓGICOS EN ITALIA. EL CASO DEL ACEITE DE OLIVA / MAIN MOTIVATIONS OF ORGANIC FOOD CONSUMERS IN ITALY. THE CASE OF OLIVE OIL.
Manuela **Vega-Zamora**, Simona **Naspetti**, Raffaele **Zanoli** 327
- ADICIÓN DE GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) Y TOMATE (*Solanum lycopersicum*) DESHIDRATADO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y VIDA DE ANAQUEL DE SALCHICHA TIPO FRANKFURT / ADDITION OF CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) AND DEHYDRATED TOMATO (*Solanum lycopersicum*) ON ANTIOXIDANT CAPACITY AND SHELF-LIFE OF FRANKFURTER SAUSAGE.
Nora E. **Ponce-Fernández**, Gregorio **Pollorena-López**, Cindy **Rosas-Domínguez**, Vida M. **López-Peñuelas**, Sandra C. **Osuna-Izaguirre** 337

Fauna Silvestre / Wildlife

- DIFERENCIACIÓN DEL SEXO DEL GORRIÓN DE BAIRD (*Centronyx bairdii*) POR MEDIO DE REDES NEURONALES ARTIFICIALES Y DATOS MORFOMÉTRICOS / SEX DIFFERENTIATION OF THE BAIRD SPARROW (*Centronyx bairdii*) THROUGH ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS AND MORPHOMETRIC DATA.
Martin E. **Pereda-Solís**, Francisco **García-Fernández**, Daniel **Sierra-Franco**, José H. **Martínez-Guerrero**, Irene **Ruvalcaba-Ortega**, Erin **Hennegan-Strasser** 353

Fitociencia / Crop Science

- SEED YIELD AND FATTY ACID COMPOSITION IN SESAME (*Sesamum indicum* L.) AS AFFECTED BY SILICON APPLICATION UNDER A SEMI-ARID CLIMATE / EFECTO DE LA APLICACIÓN DE SILICIO EN EL RENDIMIENTO DE SEMILLAS Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN AJONJOLÍ (*Sesamum indicum* L.) EN UN CLIMA SEMIÁRIDO.
Abdul **Manaf**, Mehreen **Shoukat**, Ahmad **Sher**, Abdul **Qayyum**, Ahmad **Nawaz** 367
- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PRECIPITACIÓN Y RADIACIÓN SOLAR EN EL RENDIMIENTO DE MAÍZ EN EL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO / INFLUENCE OF TEMPERATURE, PRECIPITATION AND SOLAR RADIATION ON MAIZE YIELD IN THE VALLEY OF TOLUCA MÉXICO.
Alejandro **Morales-Ruiz**, Ernesto **Díaz-López** 377
- IMPROVEMENT OF DIRECT REGENERATION OF MEXICAN SOYBEAN FROM COTYLEDONARY NODES / MEJORA DE LA REGENERACIÓN DIRECTA DE SOYA MEXICANA A PARTIR DE NODOS COTILEDONALES.
Soledad **Mora-Vásquez**, Silverio **García-Lara**, Edgardo J. **Escalante-Vásquez**, Guy A. **Cardineau** 387
- NÍQUEL EN LA COMPOSICIÓN MINERAL Y EL RENDIMIENTO DE PIMIENTO MORRÓN (*Capsicum annuum* L.) CULTIVADO EN CASA SOMBRA / NICKEL IN THE MINERAL COMPOSITION AND YIELD OF BELL PEPPER (*Capsicum annuum* L.) GROWN IN A SHADE HOUSE.
Saúl **Parra-Terraza** 401
- ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS MINERALES ESENCIALES Y TÓXICOS EN TEJIDOS VEGETALES / ANALYSIS OF ESSENTIAL AND TOXIC MINERAL ELEMENTS IN PLANT TISSUE.
Juliana **Padilla-Cuevas**, Hernani T. **Yee-Madeira**, Agustín **Merino-García**, Claudia **Hidalgo**, Jorge D. **Etchevers** 413

Protección Vegetal / Plant Protection

LIBERACIÓN DE *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) Y MANEJO PARA EL CONTROL DE *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae) EN CULTIVO DE SORGO / RELEASE OF *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) AND MANAGEMENT TO CONTROL *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae) IN SORGHUM.

Martín **Palomares-Pérez**, Manuel **Bravo-Núñez**, Hugo C. **Arredondo-Bernal**..... 435

Socioeconomía / Socioeconomics

COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA RELATIVA PARA LA ESTRATIFICACIÓN ÓPTIMA EN LA TIPOLOGÍA DE PRODUCTORES AGROPECUARIOS / COMPARISON OF RELATIVE EFFICIENCY FOR OPTIMAL STRATIFICATION IN THE AGRICULTURAL PRODUCERS TYPOLOGY.

Juan **Ruiz-Ramírez**, Felipe **Gallardo-López**, Gabriela E. **Hernández-Rodríguez**, Carlos M. **Hernández-Suárez**, Pedro **Cisneros-Saguilán**, Héctor **Chalate-Molina**..... 445

PRONÓSTICO HORARIO DE CAUDALES MEDIANTE FILTRO DE KALMAN DISCRETO EN EL RÍO HUAYNAMOTA, NAYARIT, MÉXICO

HOURLY STREAMFLOW FORECASTING FOR THE HUAYNAMOTA RIVER, NAYARIT, MEXICO, USING THE DISCRETE KALMAN FILTER

Leticia Alvarado-Hernández¹, Laura A. Ibáñez-Castillo^{1*}, Agustín Ruiz-García¹, Fernando González-Leiva², Mario A. Vázquez-Peña¹

¹Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua, Universidad Autónoma Chapingo, 56230 Chapingo, Estado de México. (libacas@gmail.com). ²Departamento de Ingeniería Hidráulica y Ambiental, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago Chile.

RESUMEN

Debido a los eventos de precipitación extrema provocada por el cambio climático y a la alteración acelerada de las cuencas por el crecimiento poblacional, es importante pronosticar los caudales que generan las cuencas por los eventos de precipitación. El objetivo de este estudio fue predecir caudales horarios en la cuenca del río Huaynamota usando el Filtro de Kalman Discreto (DKF) junto con un modelo autorregresivo con entrada exógena (ARX). Al inicio los parámetros del filtro de Kalman se definen y después se recalculan por periodos definidos, es decir los valores de los parámetros del modelo se actualizan constantemente. El pronóstico de caudales se realizó en seis pasos hacia adelante (L=1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas). La cuenca de estudio es parte del río Huaynamota, delimitada por la estación hidrométrica Chapalagana, aguas arriba de la presa Aguamilpa, en Nayarit, México. La cuenca del río Huaynamota es un tributario del río Santiago. Series de datos horarias se emplearon para precipitación y caudal, de agosto a septiembre del 2017. El modelo de pronóstico DKF-ARX mostró índices de eficiencia de Nash-Sutcliffe entre 0.99 y 0.85 con L=1 y L=6, respectivamente. Se concluye que es factible obtener un buen pronóstico de caudales horarios con filtro de Kalman discreto.

Palabras clave: filtro de Kalman discreto, modelos autorregresivos, predicción caudal.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la función de respuesta de la cuenca es necesario para planear y manejar los recursos hídricos, sin embargo, por la

ABSTRACT

Because of extreme rainfall events caused by climate change and of accelerated alteration of basins by population growth, it is important to forecast streamflow generated by precipitation events. The objective of this study was to predict hourly flows in the Huaynamota River basin using the Discrete Kalman Filter (DKF), together with the autoregressive exogenous input model (ARX). Initially, the Kalman filter parameters are defined then recalculated for defined periods; that is, the model parameter values are constantly updated. Flows were forecasted six steps ahead (L=1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours). The basin studied is part of the Huaynamota River, delimited by the Chapalagana hydrometric station, upstream from the Aguamilpa reservoir, Nayarit, Mexico. The Huaynamota River is a tributary of the Santiago River. Hourly data series were used for precipitation and flow from August to September 2017. The DKF-ARX forecasting model showed Nash-Sutcliffe efficiency indexes between 0.99 and 0.85, with L=1 and L=6, respectively. It is concluded that it is feasible to obtain a good forecast of hourly streamflow with the discrete Kalman filter.

Key words: discrete Kalman filter, autoregressive models, flow prediction.

INTRODUCTION

Knowledge of the basin response function is necessary to plan and manage water resources. However, because of the complexity of the processes that intervene in the water cycle and their superficial and sub-superficial interrelations, abstraction is necessary to determine and control some aspects of its behavior: the object of watershed modeling (Chong-yu Xu, 2002).

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2019. Aprobado: noviembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 295-312. 2020.

complejidad de los procesos que intervienen en el ciclo hidrológico y sus interrelaciones superficiales y subsuperficiales, la abstracción es necesaria para conocer y controlar algunos aspectos de su comportamiento, lo cual es objeto de la modelación de cuencas (Chong-yu Xu, 2002).

Los modelos del proceso lluvia-escurrimiento se desarrollaron desde el siglo XIX, Vargas-Castañeda *et al.* (2015) realizaron una revisión histórica de este tipo de modelos resaltando las tendencias actuales. Los modelos más completos son los llamados distribuidos de base física como los indicados por Devi *et al.* (2015). Los modelos distribuidos son más complejos que los agregados, aunque no necesariamente los más eficaces (Beven, 1989; Mendoza *et al.*, 2002). Estos autores indican que esta complejidad de los modelos distribuidos se debe a las simplificaciones de sus ecuaciones, la no linealidad de los procesos individuales del ciclo hidrológico, así como la falta de información de las condiciones físicas de la cuenca y datos climatológicos. Algunos ejemplos de este tipo de modelos son los desarrollados por Vargas-Castañeda *et al.* (2018) y Zhen-lei *et al.* (2018).

Uno de los mayores inconvenientes para la generación de modelos de lluvia-escurrimiento de cualquier tipo, es la falta de información para alimentarlos, así como para calibrarlos y validarlos. Las bases de datos climatológicos horarios generados en México son principalmente precipitación y caudales de escurrimiento, sobre todo en cuencas con gran inversión económica, como por ejemplo las monitoreadas por la Comisión Federal de Electricidad (CFE) en donde existen presas para la generación de energía eléctrica; éste es el caso de la cuenca del río Santiago, del cual forma parte la zona de estudio en esta investigación. Sobre el río Santiago, en Nayarit, hay tres presas para generación de energía eléctrica: Aguamilpa, El Cajón y la Yesca (Comisión Federal de Electricidad, 2017). Al considerar este tipo de información para predecir la respuesta de la cuenca, se desarrollaron modelos de caja negra como el filtro de Kalman.

El filtro de Kalman es un sistema de ecuaciones matemáticas que implementa un estimador tipo predictor-corrector que es óptimo en el sentido que minimiza el error estimado de la covarianza (Castañeda *et al.*, 2013). Este tipo de algoritmo se utiliza en una amplia gama de temas como edafología, biología, medicina, hidrología, etc. (Valdés *et al.* 1980; Hernández y Medina, 2012; Padilla *et al.*, 2013; Hobson y Kardynal, 2015).

Models of the rainfall-runoff process were developed since the 19th century. Vargas-Castañeda *et al.* (2015) carried out a historic review of this type of model, highlighting the current trends. The most complete models are those called physically based distributed models, such as those described by Devi *et al.* (2015). Distributed models are more complex than aggregated models, though not necessarily more effective (Beven, 1989; Mendoza *et al.*, 2002). These authors indicate that the complexity of distributed models is due to the simplifications of their equations, the non-linearity of the individual processes of the water cycle, as well as the lack of information of the physical conditions of the basin and climatological data. Examples of this type of model were developed by Vargas-Castañeda *et al.* (2018) and Zhen-lei *et al.* (2018).

One of the greatest inconveniences in generating rainfall-runoff models of any type is the lack of data to feed them, as well as to calibrate and validate them. The hourly climate databases generated in México are mainly rainfall and runoff flows, especially in basins where economic investment is high, such as those monitored by the Federal Electricity Commission (CFE) where there are hydroelectric dams: Aguamilpa, El Cajón and La Yesca (Comisión Federal de Electricidad, 2017). Considering this type of information for forecasting basin response, black box models like the Kalman filter were developed.

The Kalman filter is a system of mathematical equations that implement a predictor-corrector type estimator, which is optimal in the sense that it minimizes the estimated error of the covariance (Castañeda *et al.*, 2013). This type of algorithm is used in a wide variety of fields, such as edaphology, biology, medicine, hydrology, etc. (Valdés *et al.* 1980; Hernández and Medina, 2012; Padilla *et al.*, 2013; Hobson and Kardynal, 2015).

Morales-Velázquez *et al.* (2014) applied the discrete Kalman filter to predict hourly flows in the watershed of the Ángel Albino Corso (Peñitas) dam. The model was evaluated using the flows obtained from the modified inverse routing reservoir, measured at the Sayula hydrometric station and obtained Nash-Sutcliffe efficiency indexes of 0.98 for hourly flow forecast. González-Leiva *et al.* (2015) implemented a discrete Kalman Filter model, autoregressive exogenous input (DKF-ARX) to predict daily mean streamflow in the Turbio River basin, Guanajuato;

Morales-Velázquez *et al.* (2014) aplicaron el filtro de Kalman discreto para predecir caudales horarios en la cuenca de la presa Ángel Albino Corso (Peñitas); el modelo se evaluó a partir de caudales obtenidos del tránsito inverso modificado en vasos o antitránsito medidos en la estación hidrométrica Sayula, y tuvo valores del índice de eficiencia de Nash-Sutcliffe para pronóstico de caudal a cada hora de 0.98. González-Leiva *et al.* (2015) implementaron un modelo de Filtro de Kalman discreto, autorregresivo y entrada exógena (DKF-ARX) para predicción de caudal medio diario en la cuenca del río Turbio, Guanajuato; no se implementó una predicción horaria, porque en la estación de aforo trabajada, Las Adjuntas, no existen datos medidos horarios; la cuenca del río Turbio no es de interés hidroeléctrico para la CFE, por lo que no hay medición continua de caudales. González-Leiva *et al.* (2015) consideraron cuatro pasos de tiempo de anticipación (L1, L2, L3 y L4), es decir los tiempos en que no se ejecutó la fase de corrección del modelo DKF; de los dos periodos analizados el del año 2003 presenta valores del índice de eficiencia de Nash-Sutcliffe de 0.95, 0.87, 0.76 y 0.63 para los distintos pasos de anticipación, y análogamente para la serie de datos de 2004 los valores de Nash-Sutcliffe fueron 0.93, 0.82, 0.72 y 0.62.

Al considerar los cambios actuales de los regímenes de precipitación y por ende de la función de respuesta de la cuenca a fenómenos extremos, se hace necesario el desarrollo de modelos alimentados con información horaria, que puedan generar información fehaciente para utilizar en los sistemas de alerta temprana o en los planes de operación del sistema de presas hidroeléctricas. Así el objetivo de esta investigación fue evaluar, a partir de medidas de bondad de ajuste, el pronóstico de caudales horarios mediante un modelo autorregresivo con entrada exógena (ARX) en conjunto con filtro de Kalman discreto (DKF), pronosticados a 1, 2, 4 y 6 h de anticipación, en la cuenca del río Huaynamota en los estados de Durango, Nayarit, Jalisco y Zacatecas. La hipótesis fue que el filtro de Kalman discreto puede ser una buena herramienta para pronosticar caudales horarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

El algoritmo de filtro de Kalman discreto (DKF) junto con un modelo autorregresivo con entrada exógena (ARX) se utilizó

hourly prediction was not implemented because at the gauging station Las Adjuntas there are no measured hourly data. The Turbio River basin is not of hydroelectric interest for the CFE and thus there is no continuous measurement of flows. González-Leiva *et al.* (2015) considered four anticipation times (L1, L2, L3 and L4); that is, the times at which the correction phase of the DKF model was not executed. Of the two periods analyzed, 2003 had Nash-Sutcliffe efficiency indexes of 0.95, 0.87, 0.76 and 0.63 for the different anticipation times, and analogously, for the 2004 data series, the Nash-Sutcliffe values were 0.93, 0.82, 0.72 and 0.62.

Considering the current changes in precipitation regimes and, therefore, in the basin's response function to extreme phenomena, it is necessary to develop models fed hourly information that can generate reliable information to use in early warning systems or in system operation plans of hydroelectric dams. Thus, the objective of this research was to evaluate, using goodness of fit measurements, hourly streamflow forecasts 1, 2, 4 and 6 h in anticipation, of an autoregressive model with exogenous input (ARX) in conjunction with a discrete Kalman filter, in the Huayanamota River basin in the states of Durango, Nayarit, Jalisco and Zacatecas. The hypothesis was that the discrete Kalman filter can be a good tool for forecasting hourly streamflow.

MATERIALS AND METHODS

The discrete Kalman filter (DKF) algorithm, together with an autoregressive model with exogenous input (ARX), was used to predict flows, considering past time series of rainfall and flows; rainfall is in mm and flows are in $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$. The current considered, Chapalagana or Atengo River, is one of the main tributaries of the Huaynamota River basin, delimited by the Chapalagana hydrometric station, Nayarit, Mexico. The other tributary of the Huaynamota is the Jesús María River. The Chapalagana River (12 080 km^2) approximately 4 km downstream of the Chapalagana station joins the Jesús María River (5185 km^2) and together form the Huaynamota River; 25 km downstream after the union is the Aguamilpa hydroelectric dam (INEGI, 2018).

Huaynamota River Basin

The Huaynamota River basin in central Mexico (21° 24' 36.82" and 23° 25' 3.26" N and 104° 30' 34.03" and 103° 24' 26.73" W) includes the states of Durango, Jalisco, Zacatecas

para predecir los caudales, considerando series de tiempo pasadas de precipitación y caudales; las precipitaciones están en mm y los caudales están en $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$. La corriente considerada, río Chapalagana o río Atengo, es uno de los dos principales tributarios de la cuenca del río Huaynamota, delimitada por la estación hidrométrica Chapalagana en Nayarit, México; el otro tributario de la cuenca Huaynamota es el río Jesús María. De hecho, aproximadamente 4 kilómetros aguas abajo, de la estación Chapalagana, al continuar su rumbo el río Chapalagana ($12\,080 \text{ km}^2$) se une al río Jesús María (5185 km^2) y juntos forman el río Huaynamota. Una vez unidos, 25 kilómetros aguas abajo, está la presa hidroeléctrica Aguamilpa (INEGI, 2018).

Cuenca Huaynamota

La cuenca del río Huaynamota en el centro de México ($21^\circ 24' 36.82''$ y $23^\circ 25' 3.26''$ N y $104^\circ 30' 34.03''$ y $103^\circ 24' 26.73''$ O), abarca parte de los estados de Durango, Zacatecas y Nayarit (Figura 1). El área de la cuenca es $12\,080 \text{ km}^2$, las elevaciones van de 216 a 3148 msnm, y la elevación mínima corresponde a la salida de la cuenca en la estación hidrométrica Chapalagana. La pendiente media de la cuenca es 31%. La

and Nayarit (Figure 1). The basin covers $12\,080 \text{ km}^2$ at altitudes of 216 to 3148 m; the lowest elevation is the outlet at the Chapalagana hydrometric station. The mean slope of the basin is 31%. The main channel is 321 km and has a slope of 0.68%. The basin concentration time is 44 h.

Climate information

Average annual rainfall in the basin is 600 mm, most between June and October. For this study, we selected a period of analysis of 1360 h, covering 09:00 h 02 August to 00:00 h 28 September 2017. This period was selected because it is one of the periods with the largest streamflow values during the year (two floods in the order of $1171 \text{ m}^3 \text{s}^{-1}$ and $1070 \text{ m}^3 \text{s}^{-1}$). Another criterion was the availability of complete information within the basin; that is, it was selected based on two criteria: 1) extreme rainfall or streamflow events, or both, and 2) access to more recent and complete historic information.

Hydroclimatological information of the study period 2017 was obtained from the network of hydroclimatological stations of the Comisión Federal de Electricidad (2017) located in the Santiago River basin: Jesús María, Chapalagana, Bolaños,

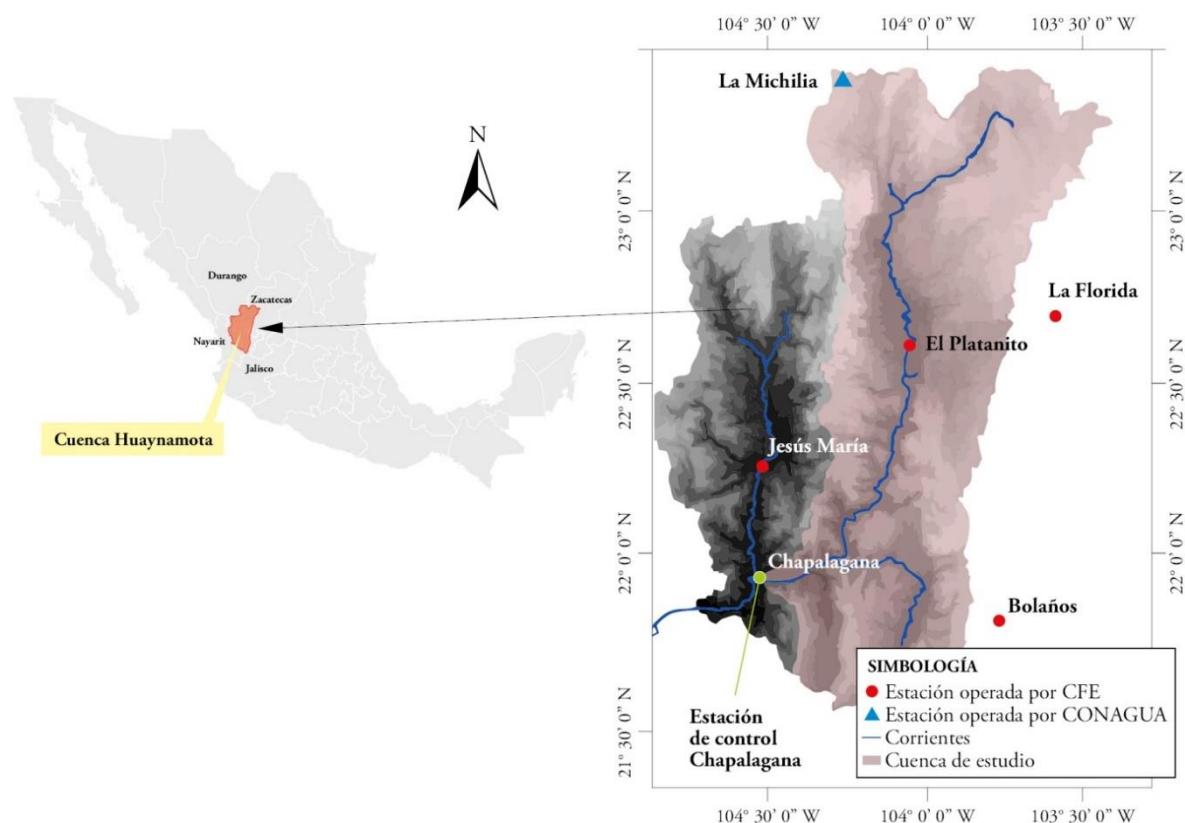


Figura 1. Ubicación de la cuenca del río Huaynamota.
Figure 1. Location of the Huaynamota River.

longitud y pendiente de su cauce principal son 321 km y 0.68%. El tiempo de concentración de la cuenca es 44 h.

Información climatológica

La lluvia promedio anual en la cuenca es 600 mm, la mayor parte entre junio y octubre. Para esta investigación se eligió un periodo de análisis de 1360 h, desglosado a nivel hora y comprendido entre el 02 de agosto a las 09:00 h y el 28 de septiembre a las 00:00 h de 2017. Este periodo se eligió por ser uno de los periodos con valores de caudales más grandes durante el año (dos avenidas máximas de $1171 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ y de $1070 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). Otro criterio fue la disponibilidad completa de la información dentro de la cuenca, o sea se eligió con base a dos criterios: 1) eventos máximos de lluvia o caudal o ambos, y 2) contar con la información histórica más reciente y completa.

La información hidroclimatológica del periodo de estudio 2017 se obtuvo de la red de estaciones hidroclimatológicas de la Comisión Federal de Electricidad (2017) ubicadas en la cuenca del río Santiago, y las estaciones son: Jesús María, Chapalagana, Bolaños, Platanito y Florida. Además se usó la información de lluvia registrada en la estación meteorológica automática la Michilia, Durango, operada por el Servicio Meteorológico Nacional, SMN (2017). En el Cuadro 1 se muestran las coordenadas de ubicación de las estaciones de registro de lluvia y caudal. El periodo de la información para alimentar al modelo corresponde a la precipitación media de la cuenca calculada mediante el método de polígonos de Thiessen a partir de los datos de precipitación horaria en cada estación; además, se obtuvieron los caudales de escurrimiento en la estación Chapalagana, la cual es la salida de la cuenca.

Metodología

Modelo autorregresivo con entrada exógena (ARX)

El modelo ARX relaciona las entradas con las salidas del sistema mediante una ecuación lineal (ecuación 1) en diferencias

Platanito and Florida. We also used the rainfall information recorded in the automated weather station La Michilia, Durango, operated by the Servicio Meteorológico Nacional, SMN (2017). Table 1 shows the coordinates where the rainfall and flow gauging stations are located. The information to feed the model is mean rainfall in the basin during the study period calculated with the Thiessen polygon method using data on hourly precipitation in each station. The runoff flows from the Chapalagana station at the basin outlet were also obtained.

Methodology

Autoregressive model with exogenous input (ARX)

The ARX model relates the system's input with output using a linear equation (equation 1) in differences with constant coefficients; that is, programmed in OFF LINE (Hsu *et al.*, 2009).

$$y_{t+1} = \sum_{i=0}^{na} \alpha_i y_{t-i} + \sum_{j=0}^{nb} \beta_j r_{t-j} + e_{t+1} \quad (1)$$

where:

y_t is the vector that represents the output variable, which is the runoff flow at the Chapalagana station.

r_t is the vector that represents the exogenous input variable, precipitation at time t .

e_{t+1} is the term of error in flow estimation.

α_i and β_j are parameters to determine how, indicated in the following paragraph.

The indexes na and nb indicate the order of the model; na is the number of delays of the variable flow, and nb is the number of delays of the external variable precipitation.

The ARX model was programmed in Matlab® with the Toolbox systems identification (Ljung, 2017) with which the order of the model was determined (na , nb), as well as the

Cuadro 1. Estaciones de registro horario de lluvia y caudal.
Table 1. Gauging stations that register hourly rainfall and flow.

Estación	Tipo	Latitud	Longitud	Operador
Chapalagana, Nayarit	hidroclimatológica	21.945	-104.508	CFE
Bolaños, Jalisco	hidroclimatológica	21.825	-103.783	CFE
La Florida, Zacatecas	hidroclimatológica	22.686	-103.602	CFE
Jesús María, Nayarit	hidroclimatológica	22.2552	-104.516	CFE
El Platanito, Zacatecas	hidroclimatológica	22.6113	-104.050	CFE
La Michilia, Durango	Meteorológica	23.3875	-104.247	SMN

con coeficientes constantes, es decir programado en OFF LINE (Hsu *et al.*, 2009).

$$y_{t+1} = \sum_{i=0}^{na} \alpha_i y_{t-i} + \sum_{j=0}^{nb} \beta_j r_{t-j} + e_{t+1} \quad (1)$$

donde:

y_t es el vector que representa la variable de salida que es el caudal de escurrimiento en la estación Chapalagana.

r_t es el vector que representa la variable de entrada exógena y es la precipitación en el tiempo t ,

e_{t+1} es el término de error en la estimación del caudal.

α_i y β_j son parámetros para determinar como se indica en el siguiente párrafo.

Los índices na y nb indican el orden del modelo; na es el número de retrasos de la variable caudal y nb el número de retrasos de la variable externa precipitación.

El modelo ARX se programó en Matlab® con el Toolbox identificación de sistemas (Ljung, 2017) con lo cual se determinó el orden del modelo (na , nb), así como los parámetros a y b , en el caso de nk para estudios hidrológicos se considera uno, a no ser que existan presas de almacenamiento que retrasan la respuesta del sistema lluvia-escurrimiento. Ljung (2017) indica que debido al uso del mismo conjunto de datos para la estimación y validación, se deben utilizar los criterios de Rissanen MDL e información de Akaike (AIC) para obtener las órdenes del modelo.

Filtro de Kalman Discreto (DKF)

El Filtro de Kalman es una técnica de asimilación de datos que opera en dos fases: predicción y corrección. Solera (2003) indica que el algoritmo pronostica el estado del sistema en el tiempo t a partir de información en $t-1$ y añade un término de corrección proporcional al error de predicción; este último se minimiza estadísticamente. La Figura 2 muestra la idea simplificada del filtro de Kalman Discreto (Welch y Bishop, 2006); además, ellos indican que el Filtro de Kalman discreto estima el estado $X \in R_n$ de un proceso controlado en un tiempo discreto a partir de una ecuación lineal estocástica (ecuación 2):

$$x_t = Ax_{t-1} + BU_t + w_t \quad (2)$$

Con una medida del estado $z \in R_m$, que es la ecuación 3:

$$z_t = Hx_t + v_t \quad (3)$$

parameters a and b . In the case of nk for hydrological studies, it is considered 1, unless there are reservoirs that delay the response of the rain-runoff system. Ljung (2017) indicates that, due to the use of the same data set to estimate and validate, the Rissanen MDL and Akaike information criteria should be used to obtain the orders of the model.

Discrete Kalman Filter (DKF)

The Kalman filter is a data assimilation technique that operates in two phases: prediction and correction. Solera (2003) indicates that the algorithm forecasts the state of the system in time t from information in $t-1$ and adds a correction term proportional to the prediction error, which is minimized statistically. Figure 2 shows Welch and Bishop's (2006) simplified idea of the discrete Kalman filter. Moreover, they indicate that the discrete Kalman filter estimates the $X \in R_n$ state of a controlled process in a discrete time using a linear stochastic equation (equation 2):

$$x_t = Ax_{t-1} + BU_t + w_t \quad (2)$$

With a measure of the $z \in R_m$ status, which is equation 3:

$$z_t = Hx_t + v_t \quad (3)$$

Matrix A ($n \times n$) relates the state in the previous step $t-1$ to the state of the current step. Matrix B ($n \times l$) relates the control input, which in this case is the exogenous variable. Matrix H ($m \times n$) relates the state to measurement.

The variables w_t and v_t represent the process and measurement errors, respectively, which are assumed as independent of each other; they are white noise and fit a Gaussian probability distribution function with a mean of zero and variance Q and R for the noise of the process and measurements, respectively.

The covariance matrixes of disturbance of the Q process and R measurement can change over time, but it is assumed that they are constant. Valdés *et al.* (1980) defines the R matrix as $\propto Q_{t-1}$, that is, the variance corresponds to a value that is proportional to flow, and González-Leiva *et al.* (2015) indicate that the value of a is 5%, which is the error likely committed in measurement of the flow at the gauging station.

As indicated above, the Kalman filter operates in two phases, and the equations used at both times are presented in the Figure 2 algorithm.

Valdés *et al.* (1980) and Morales-Velázquez *et al.* (2014) indicate that the considerations for the initial state referent to the covariance matrix can assume the value of $P_0 = KI$, where K is a scale large enough to reflect the uncertainty of the assumed

La matriz A ($n \times n$) relaciona el estado en el paso anterior $t-1$ al estado del paso actual, la matriz B ($n \times l$) relaciona la entrada de control, en este caso corresponde a la variable exógena, y la matriz H ($m \times n$) relaciona al estado con la medición.

Las variables w_t y v_t representan el error del proceso y de las mediciones, respectivamente, las cuales se asumen como independientes entre ellas, son ruido blanco y se ajustan a una función de distribución de probabilidad Gaussiana con media cero y varianza Q y R para el ruido del proceso y mediciones, respectivamente.

Las matrices de covarianza de perturbación del proceso Q y medición R pueden cambiar en el tiempo, pero se asume que son constantes. Valdés *et al.* (1980) definen la matriz R como $\propto Q_{t-1}$, es decir la varianza corresponde a un valor proporcional al caudal, y González-Leiva *et al.* (2015) indican que el valor de α es 5% que representa el error que probablemente se haya cometido en la medición del caudal en la estación hidrométrica.

Como ya se indicó, el filtro de Kalman opera en dos fases, y las ecuaciones que se emplean en ambos tiempos se presentan en el algoritmo de la Figura 2.

Valdés *et al.* (1980) y Morales-Velázquez *et al.* (2014) indican que las consideraciones para el estado inicial, referentes a la matriz de covarianza, puede asumir el valor de $P_0=KI$, donde K es un escalar lo suficientemente grande como para reflejar la incertidumbre de los valores supuestos en el estado inicial, se asume un valor de 1000, e I es la matriz identidad.

values in the initial state; a value of 1000 is assumed and I is the identity matrix.

Model ARX+DKF

To determine the possible orders of the ARX model with the system identification Toolbox, three subsets of data were analyzed to estimate parameters and validate the ARX model: (1) 10:90, (2) 25:75, and (3) 50:50 (%;%). For example, the case of 25%:75%, means that 25% of the total data were used to estimate parameters and 75% to validate the model. Of course, the AIC and MDL criteria are considered in all cases.

The model ARX+DKF initially uses a period for estimating the parameters a and b of the ARX model; then the DKF model is used to forecast streamflow. Because of climate variability and changes in physical conditions of the basin that could change its response function, we recalculated the a and b parameters of the ARX model every certain time (Figure 3).

To determine the orders of the more adequate ARX model (na and nb), in the combined ARX+DKF model the periods for parameter estimation were evaluated 10% (136 h), 25% (340 h) and 50% (680 h), and the orders of the model determined with the system identification Toolbox were evaluated to forecast at one step ahead of $L=1$. Once the period and the orders of the more adequate model were selected, the flow forecasts were evaluated at different forward passages of time (L).

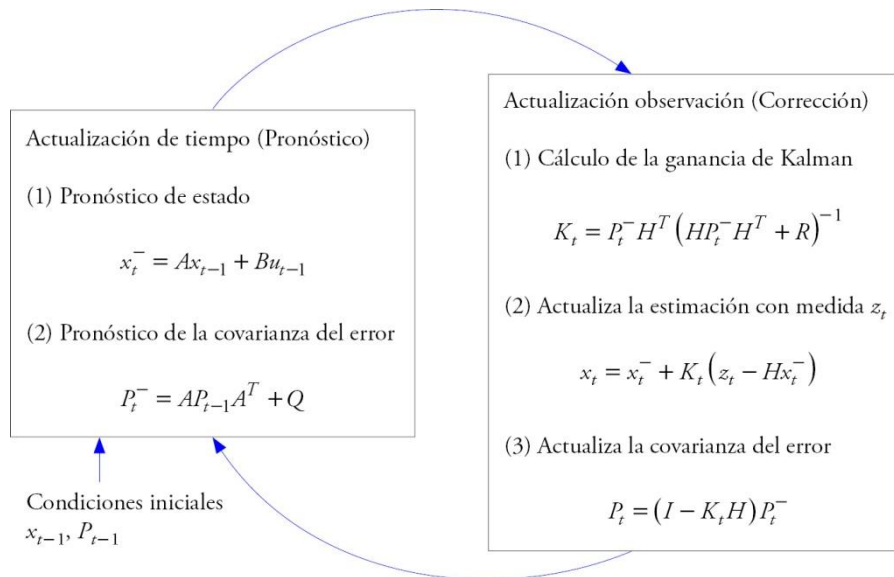


Figura 2. Algoritmo del filtro de Kalman Discreto (Welch y Bishop, 2006).
Figure 2. Discrete Kalman filter algorithm (Welch and Bishop, 2006).

Modelo ARX+DKF

Para determinar las posibles órdenes del modelo ARX con el Toolbox identificación de sistemas se analizaron tres subconjuntos de datos para estimar parámetros y validar el modelo ARX: (1) 10:90, (2) 25:75, y (3) 50:50 (%; %). Por ejemplo, en el caso 25%:75%, significa que se usó el 25% del total de los datos para estimar parámetros y el 75% para validar el modelo. Desde luego se consideran los criterios de AIC y MDL en todos los casos.

El modelo en conjunto ARX+DKF utiliza al inicio un periodo para la estimación de los parámetros a y b del modelo ARX, y después se utiliza el modelo DKF para el pronóstico de caudales. Debido a la variabilidad climática y al cambio de las condiciones físicas de la cuenca que pudieran cambiar la función de respuesta de la misma, se planteó recalcular los parámetros a y b del modelo ARX cada cierto periodo (Figura 3).

Para determinar las órdenes del modelo ARX más adecuado (na y nb) se evaluaron en el modelo en conjunto ARX+DKF los periodos para estimación de parámetros; 10% (136 h), 25% (340 h) y 50% (680 h), y las órdenes del modelo determinadas con el Toolbox identificación de sistemas, se evaluaron para el pronóstico a un paso hacia adelante $L=1$. Una vez elegido el periodo y órdenes del modelo más adecuados se realizó la evaluación de pronóstico de caudales a distintos pasos de tiempo (L) hacia adelante.

En la aplicación del modelo DKF la etapa de pronóstico se realizó 6 pasos (L) hacia adelante, es decir 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h, después se realizó la etapa de actualización para el caudal pronosticado en el tiempo $L=1$ y a partir de éste se pronosticó de nuevo seis pasos hacia adelante, como se muestra en la Figura 4.

When applying the DKF model, the forecasting stage carried out 6 forward steps (L), that is 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h. The updating stage was then carried out for the predicted flow at time $L=1$ and from this forecast, six steps ahead were again forecasted, as shown in Figure 4.

Statistical analysis

Krause *et al.* (2005) suggest Nash-Sutcliffe efficiency criteria (E) and the root mean square of the error ($RMSE$) as efficiency criteria for evaluating hydrological models.

RESULTS AND DISCUSSION

To feed the model, 1360 data were introduced every hour (Figure 5). These data reflect rainfall and response functions of several events in the Huaynamota River Basin.

Table 2 presents the orders of the ARX model obtained from the subset of percent estimation-validation data, as well as the results of the indexes of efficiency necessary to evaluate the results of the ARX+DKF model, considering an $L=1$ forward step in time. Table 2 will serve as a base to decide which is the best model in a later analysis.

The graphs of the predicted versus observed flows, evaluated with the model orders under the AIC criterion, show 10%:90% and 25%:75% for the first two subsets, large variations in forecasted values at the end of the period of analysis. These differences in

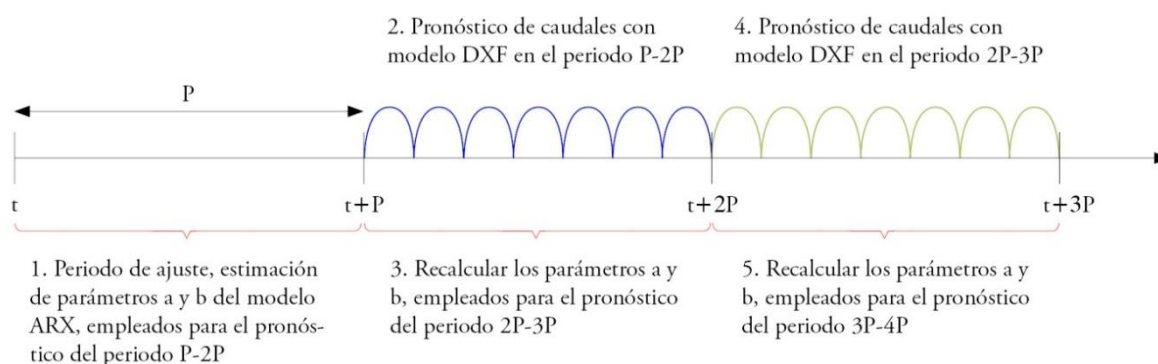


Figura 3. Proceso de estimación de parámetros y pronóstico de caudales.
Figure 3. Process of estimating parameters and forecasting stream flows.

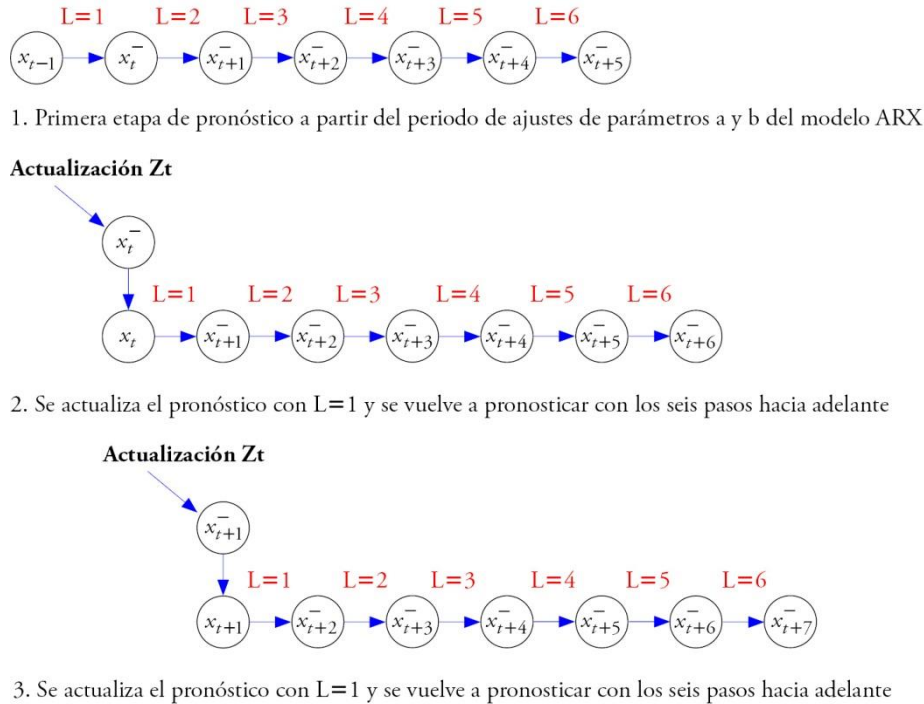


Figura 4. Pronóstico de caudales L pasos hacia adelante.

Figure 4. Forecasting flows L steps ahead.

Análisis estadístico

Krause *et al.* (2005) sugieren como criterios de eficiencia para evaluar modelos hidrológicos los criterios de eficiencia de Nash-Sutcliffe (E) y la raíz del error cuadrático medio ($RMSE$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cada hora se introdujeron 1360 datos para alimentar al modelo (Figura 5), los cuales reflejan las precipitaciones y las funciones de respuesta de varios eventos en la cuenca del río Huaynamota.

El Cuadro 2 presenta las órdenes del modelo ARX obtenidas a partir del subconjunto de datos estimación-validación porcentual, así como los resultados de los índices de eficiencia necesarios para evaluar los resultados del modelo ARX+DKF, considerando un paso de tiempo hacia adelante $L=1$. El Cuadro 2, en un análisis posterior, servirá de base para decidir cual es el mejor modelo.

Las gráficas de los caudales pronosticados versus los observados, evaluados con las órdenes del modelo bajo el criterio AIC, muestra para los primeros dos

the forecasts decrease in the third subset 50%:50%. Like the flow forecasts obtained with the AIC criterion, the first subset evaluated with the MDL 10%:90% criterion show these variations at the end of the period of analysis; the variations decrease for subsets two and three.

The Nash-Sutcliffe efficiency index is not conclusive for evaluating the subsets, relative to the two criteria. However, when considering the analysis of Figures 6 and 7, better results can be seen with the MDL criterion model orders. Moreover, these orders are lower than those of the AIC criterion. The orders of the model that give better results in comparing observed and forecasted flows (Figure 6 and Figure 7) are those of the subset 25%:75% under the Rissanen criterion (MDL) and the $RMSE$ value is lower. In this sense and considering the six steps forward in the flow forecast, the period in which the parameters were recalculated was 338 h and $na=2$ and $nb=1$ model orders

Figure 8 shows the best forecast model (DKF-ARX), considering the previous analysis based on Table 2 and Figures 6 and 7. The general shapes of the

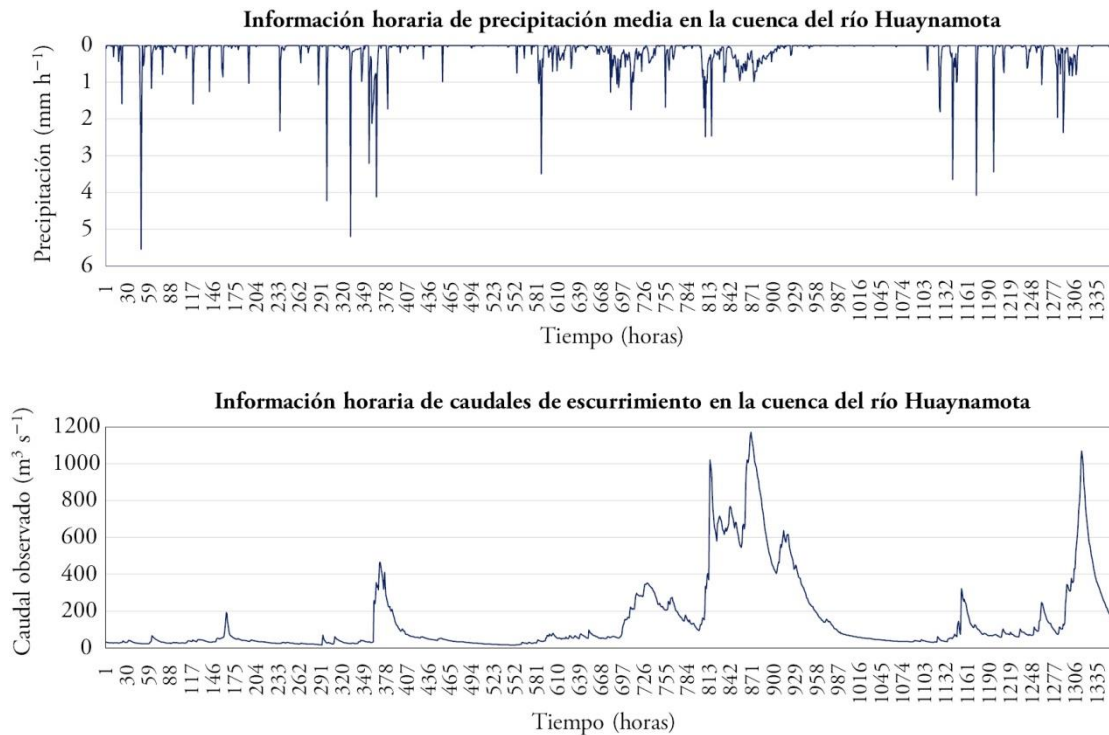


Figura 5. Datos de precipitación y caudales de escurrimiento introducidos al modelo ARX-DKF.
Figure 5. Rainfall and streamflow data introduced into the ARX-DKF model.

subconjuntos 10%:90% y 25%:75% grandes variaciones en los valores pronosticados al final del periodo de análisis; estas diferencias en los pronósticos decrecen en el tercer subconjunto 50%:50%. Al igual que los pronósticos de los caudales obtenidos con el criterio AIC, el primer subconjunto evaluado con el criterio MDL 10%:90% muestra estas variaciones al final del periodo de análisis, las cuales se reducen para los subconjuntos dos y tres.

forecasted hydrograph and the observed hydrograph are similar, with underestimated flow forecasts, out of phase L steps forward.

The maximum flow observed in the analyzed period was $1171 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, which occurred September 7, 2017, at 13:00 h. A second maximum flow of $1070 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ occurred September 26 at 02:00 h. The mean and standard deviation of the observed flows are 190.27 and $231.78 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$; for flow forecasted one

Cuadro 2. Órdenes del modelo ARX para un paso hacia adelante.
Table 2. ARX model orders for one step ahead.

Subconjunto	Horas para estimación de parámetros	na	nb	Nash-Sutcliffe	RMSE
Considerando criterio AIC					
10% : 90%	136	2	1	0.98	27.52
25% : 75%	340	3	2	0.98	29.12
50% : 50%	680	3	2	0.98	32.94
Considerando Criterio MDL					
10% : 90%	136	1	1	0.98	28.55
25% : 75%	340	2	1	0.98	28.29
50% : 50%	680	1	2	0.98	32.99

El índice de eficiencia Nash-Sutcliffe no es concluyente para evaluar los subconjuntos respecto a los dos criterios, sin embargo, al considerar el análisis de las Figuras 6 y 7 se aprecian mejores resultados con las órdenes del modelo del criterio MDL, además que estas órdenes resultan menores que las del criterio AIC. Las órdenes del modelo que dan mejores resultados al comparar caudales observados y pronosticados (Figura 6 y Figura 7) son los del subconjunto

step forward $L=1$ they are 187.16 and $227.75 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. The Nash-Sutcliffe coefficient for one step forward is 0.99 and RMSE is 28.37 . The forecast of the first peak flow occurred on September 7, 2017, at 14:00 h with a value of $1135.84 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$; the second peak was on September 26 at 3:00 h with a value of $1087.61 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. The percent difference is less than 3.1 in both cases, and the forecasts are out of phase one step forward in time (Figure 8), relative to observed

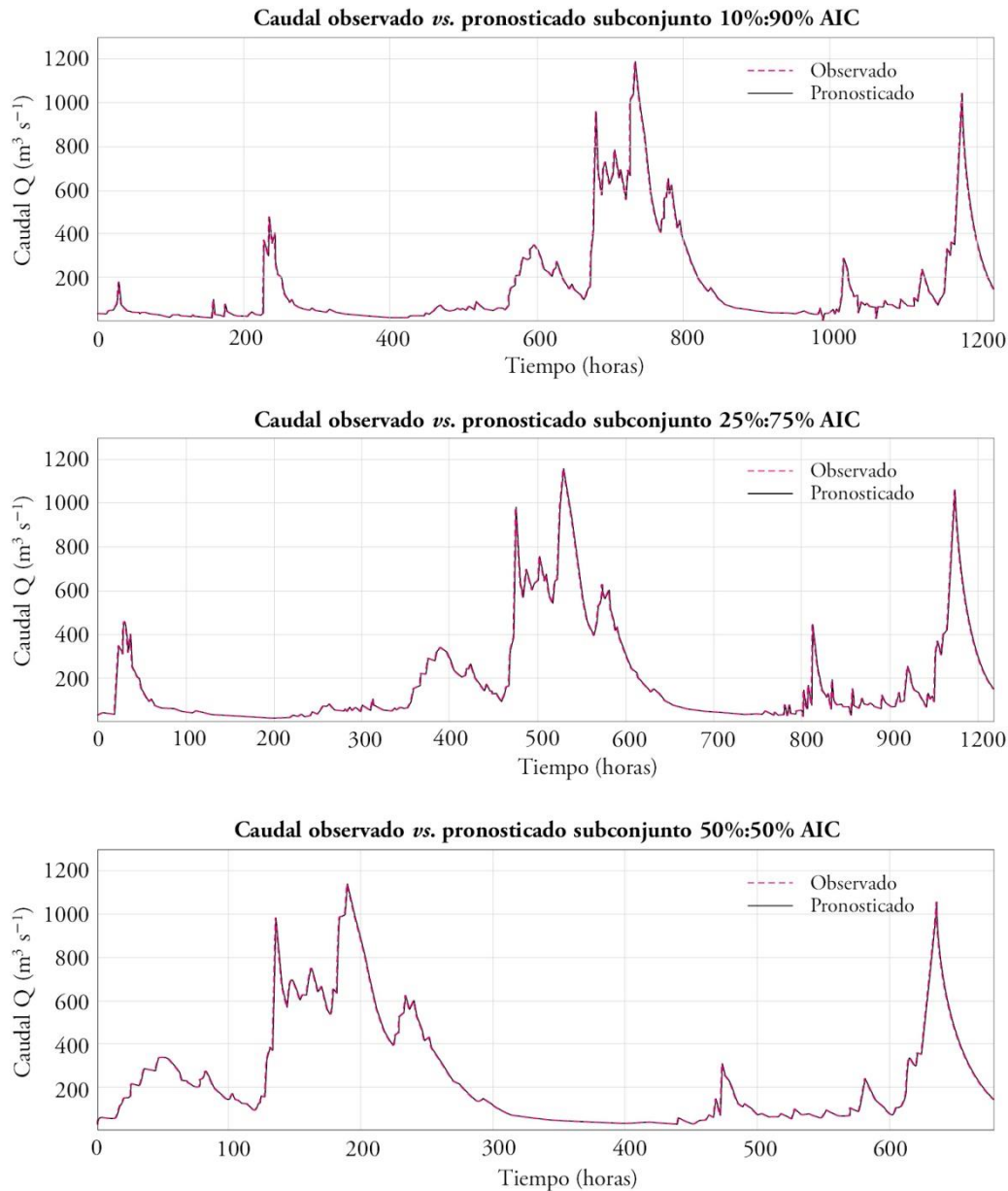


Figura 6. Caudales pronosticados *vs.* observados para órdenes de modelo bajo el criterio AIC.
Figure 6. Forecasted *vs.* observed flows for model orders under the AIC criterion.

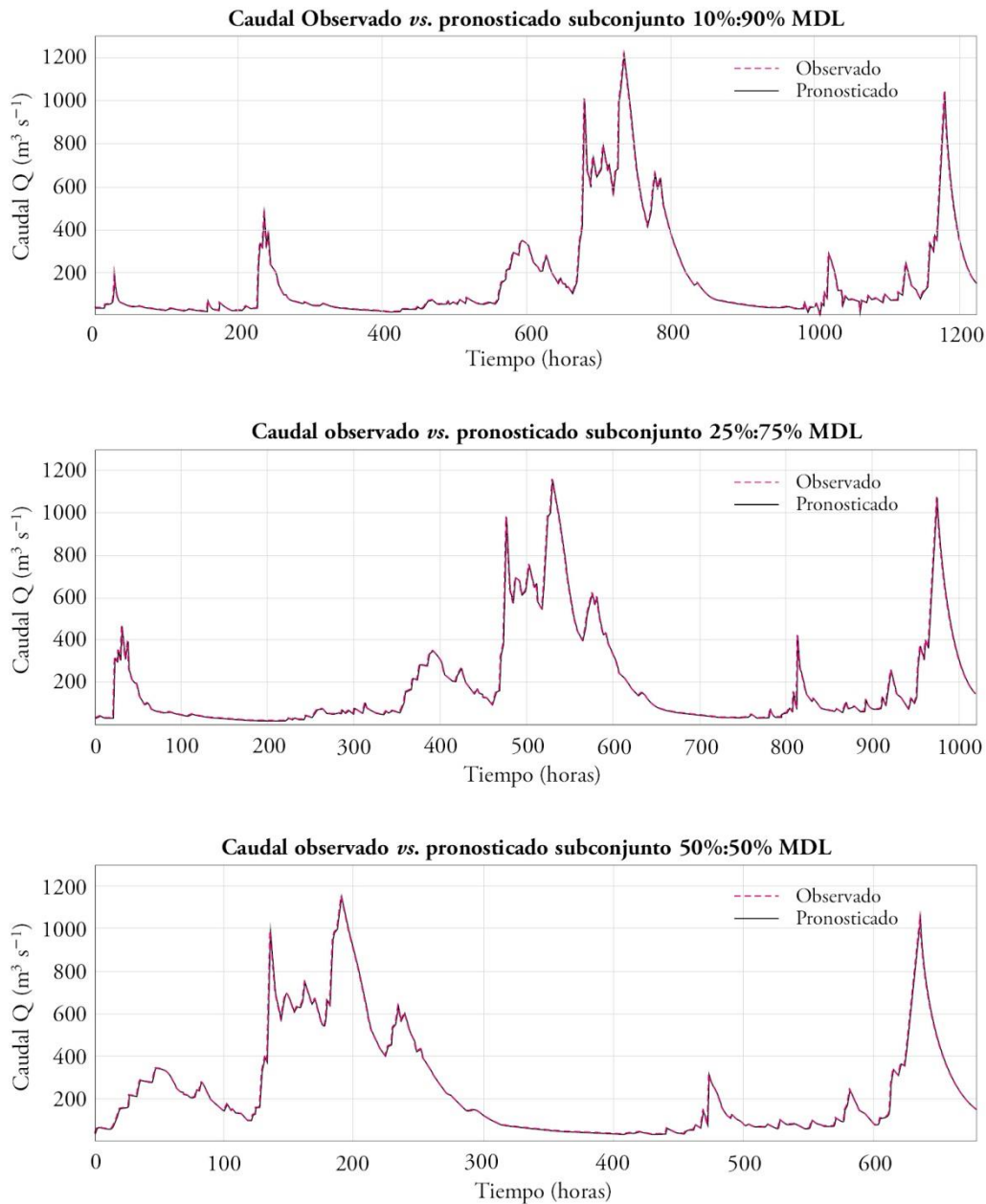


Figura 7. Caudales pronosticados vs. observados para órdenes de modelo bajo el criterio MDL.

Figure 7. Forecasted vs. observed flows for model orders under the MDL criterion.

2%:75%, bajo el criterio de Rissanen (MDL) y se observa que su valor de *RMSE* es menor. En este sentido y al considerar los seis pasos hacia adelante en el pronóstico de caudales, el periodo en el cual se recalcularon los parámetros fue 338 h y órdenes del modelo $na=2$ y $nb=1$.

La Figura 8 muestra el mejor modelo de pronóstico (DKF-ARX) al considerar el análisis anterior basado en el Cuadro 2 y las Figuras 6 y 7. La forma

data. Morales-Velázquez *et al.* (2014) determined a Nash-Sutcliffe coefficient of 0.98 for the short-term forecast of flows with DFK, considering the unit hydrograph as a response function of the basin. For this reason, the model implemented in our study notably improved this result.

As the flow forecasts increased *L* steps forward, the Nash-Sutcliffe coefficients decrease, while *RMSE* increase (Table 3). This suggests that the accuracy of

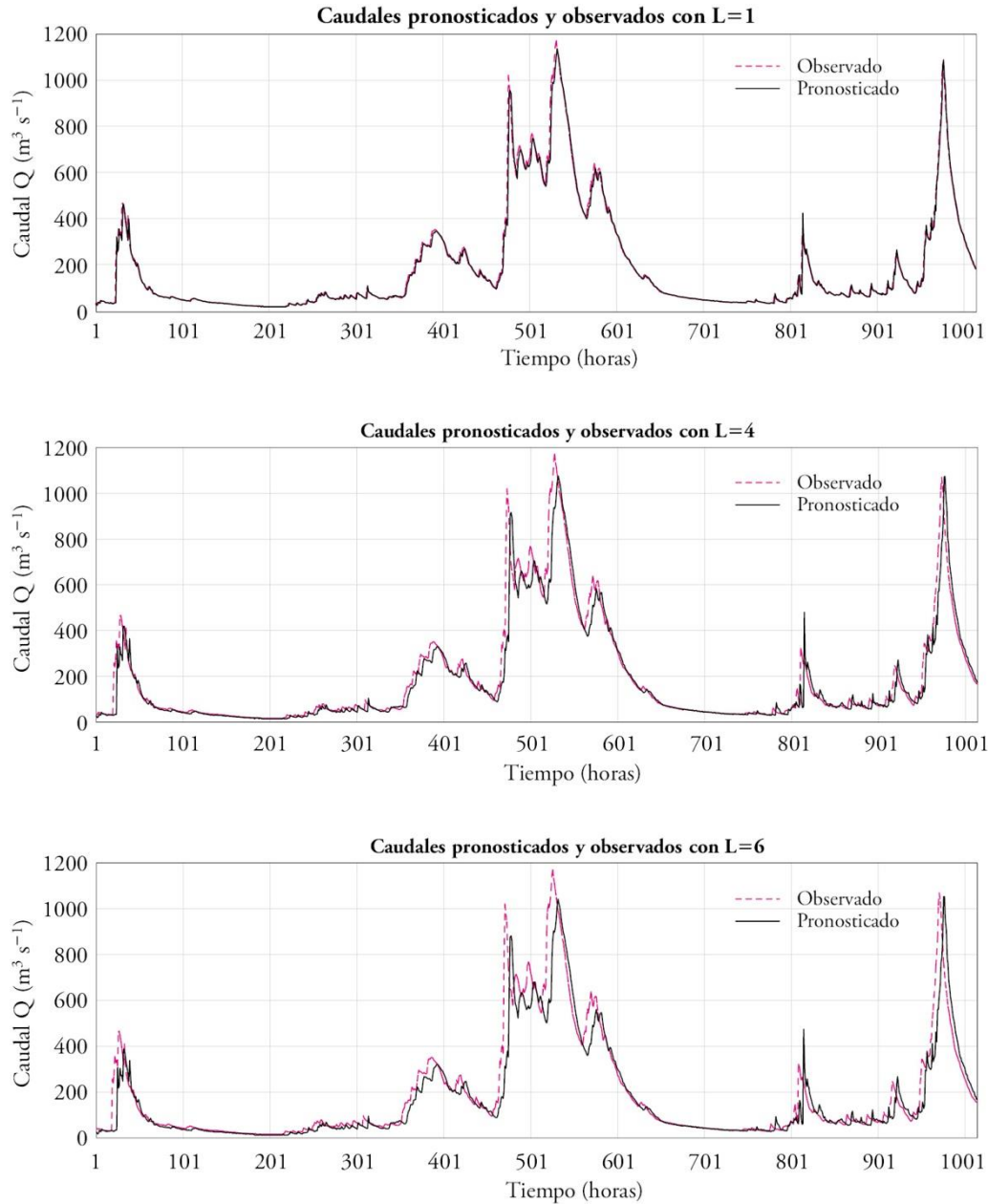


Figura 8. Caudales pronosticados vs. observados con el mejor modelo ARX-DXF para L=1, 4 y 6.
Figure 8. Forecasted vs. observed flows with the best ARX-DXF model for L=1, 4 and 6.

general del hidrograma pronosticado tiene similitud respecto al hidrograma observado, con caudales pronosticados subestimados y desfasados L pasos hacia adelante.

El caudal máximo observado en el periodo analizado fue $1171 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ y ocurrió el 7 de septiembre del 2017 a las 13:00; un segundo valor máximo de $1070 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ se presentó el 26 de septiembre a las

the forecast is being lost and the covariance of error of the forecasted flows increases at each step of time. However, according to the adjustment criteria, they are acceptable and the Nash-Sutcliffe coefficient for six steps forward $L=6$ is 0.85. What was considered as a possibility at the end of this study was to group data every 12 h and make forecasts at 12, 24 and 36 h, considering the 44-h concentration time. But we did

02:00. La media y desviación estándar de las caudales observados son 190.27 y 231.78 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, para los caudales pronosticados un paso hacia adelante $L=1$ son 187.16 y 227.75 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, el valor del coeficiente de Nash-Sutcliffe para un paso hacia adelante es 0.99, RMSE es 28.37. El pronóstico del primer caudal pico se presentó el 7 de septiembre del 2017 a las 14:00 con un valor de 1135.84 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, para el segundo pico se presenta el 26 de septiembre a las 3:00 con un valor de 1087.61 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, la diferencia porcentual es menor de 3.1 en ambos casos, y los pronósticos se desfasan un paso de tiempo hacia adelante (Figura 8) respecto a los datos observados. Morales-Velázquez *et al.* (2014) determinaron un coeficiente de Nash-Sutcliffe de 0.98 para el pronóstico de caudales a corto plazo con DFK considerando el hidrograma unitario como función de respuesta de la cuenca, por lo que el modelo implementado en nuestro estudio mejoró sensiblemente este resultado.

Conforme se incrementa el pronóstico de caudales L pasos hacia adelante, el coeficiente de Nash-Sutcliffe decrece, mientras que en RMSE se aumentan (Cuadro 3); esto sugiere que la precisión en el pronóstico se va perdiendo y la covarianza de error de los caudales pronosticados aumenta a cada paso de tiempo. Sin embargo, de acuerdo con los criterios de ajuste, estos son aceptables y el coeficiente de Nash-Sutcliffe para seis pasos hacia adelante $L=6$ es 0.85. Lo que se consideró como una posibilidad al final de este estudio fue agrupar los datos cada 12 h y realizar pronósticos a 12, 24 y 36 h, al considerar que el tiempo de concentración es 44 h. Pero no se hizo porque al dejar el pronóstico cada hora y pronosticar 12 h hacia adelante, la confiabilidad del pronóstico va decayendo. O bien, como lo realizaron González-Leiva *et al.* (2015), pronosticar caudal medio cada 24 h, y considerar como variable exógena la lluvia acumulada las 24 h anteriores.

La media y desviación estándar de las caudales observados son 190.93 y 231.51 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, para los caudales pronosticados seis pasos hacia adelante $L=6$ son 173.00 y 210.60 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, respectivamente (Figura 8). El pronóstico del primer caudal pico se presenta el 07 de septiembre a las 19:00 con un valor de 1042.81 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ que subestima el valor máximo observado con una diferencia porcentual de 10.95, para el segundo pico se presenta el 26 de septiembre a las 8:00 con un valor de 1053.59 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ que subestima el caudal con una diferencia porcentual de 1.53, y el pronóstico se

not because, by leaving the forecast every hour and forecasting 12 h forward, reliability of the forecast declines. Or rather, like González-Leiva *et al.* (2015), half flow can be forecasted every 24 h, considering the rainfall accumulated in the previous 24 h as an exogenous variable.

The mean and standard deviation of the observed flows are 190.93 and 231.51 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$; for six steps forward $L=6$, are 173.00 and 210.60 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, respectively (Figure 8). The forecast of the first peak flow on September 7 at 19:00 h with a value of 1042.81 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ underestimates the maximum observed value with a difference of 10.95%. For the second peak on September 26 at 8:00 with a value of 1053.59 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, the flow is underestimated by 1.53%, and the forecast is 6 h out of phase ahead of the observed peak flow.

González-Leiva *et al.* (2015), to forecast flows for the ARX+DFK model with average daily (24 h) information for a model order of $na=1$, $nb=2$, and at $L=1, 2, 3$ and 4 steps forward, obtained Nash-Sutcliffe coefficients of 0.92, 0.82, 0.72 and 0.63, respectively. In our study, the results improved considerably because when the information is hourly, the response function of the basin is better represented.

The dispersion graph of Figure 9, for one step forward $L=1$, shows that at least 4 values of forecasted flows are underestimated because they move away from the 45° line. This error occurs where the flow increases significantly from one step in time to another, as shown in Figure 10. In the other dispersion graphs the values disperse more because, as we commented above, the forecasted hydrograph becomes out of phase with the observed hydrograph causing large residuals.

Simple linear regression was carried out with a straight-line model of the $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_i$ type,

Cuadro 3. Estadísticas de pronóstico de caudales del modelo ARX-DXF.

Table 3. Statistics of the ARX-DXF model flow forecast.

Pasos hacia adelante L	Nash-Sutcliffe	RMSE
$L=1$	0.99	28.37
$L=2$	0.96	44.72
$L=4$	0.91	69.00
$L=6$	0.85	89.11

desfaza 6 h hacia adelante respecto al caudal pico observado.

González-Leiva *et al.* (2015) para el pronóstico de caudales para un modelo ARX+DFK con información promedio diaria (24 h), obtuvieron para una orden de modelo $na=1$, $nb=2$, y a $L=1, 2, 3$ y 4 pasos hacia adelante, valores del coeficiente de Nash-Sutcliffe de 0.92, 0.82, 0.72 y 0.63, respectivamente. En el presente estudio se mejoraron considerablemente los resultados, porque al ser información horaria la función de respuesta de la cuenca se representa de mejor manera.

La gráfica de dispersión de la Figura 9, para un paso hacia adelante $L=1$, muestra por lo menos 4 valores de caudales pronosticados son subestimados porque se alejan de la línea a 45° ; este error se presenta donde el caudal aumente de manera significativa de un paso de tiempo a otro, como se muestra en la Figura 10. En las otras gráficas de dispersión los valores se van dispersando más, porque como ya se comentó, el hidrograma pronosticado se desfaza del observado provocando residuales grandes.

and the values of parameters β_0 and β_1 are presented in Table 4.

Analysis of the b_1 regression coefficient is important in forecasting flows one step ahead $L=1$. The value $\beta_1=0.9754$ indicates that the forecast slightly underestimates the flows. As the L steps forward increase for flow forecasting, the regression coefficient decreases, and for six steps forward $L=6$, it has the value of $\beta_1=0.8426$, as shown in the dispersion graphs of Figure 9.

The graphs of residuals in Figure 10 show increasing variability in the measure that the flow increases, especially when the forecast L steps ahead is greater. In this case, for the forecast $L=3, 4, 5$ and 6 h ahead, the residues tend to underestimate the flows. This can be explained because in the hydrograph of the forecasted flow is out of phase and, when compared with real values, the variations are greater at the peaks.

Figure 11 shows the high variability in the entire range of flows but, according to the margins with a confidence interval of 95%, it can be better seen as of $760 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$.

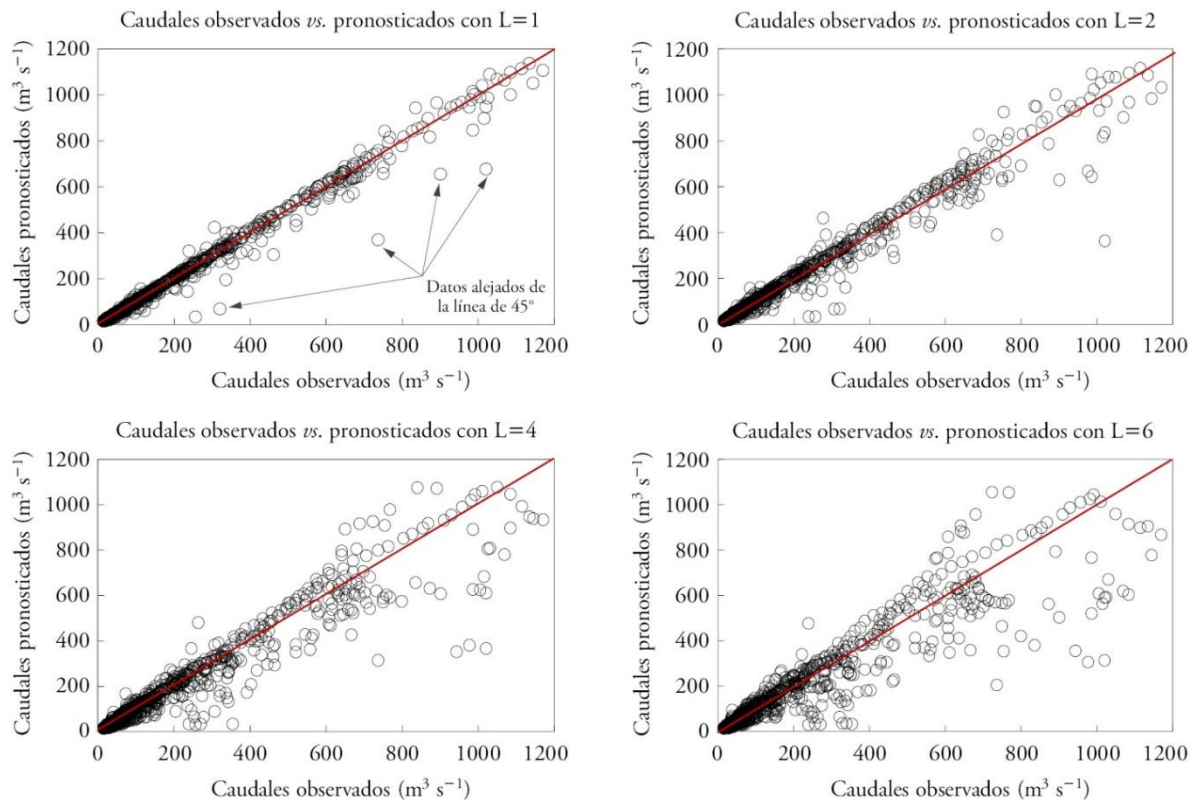


Figura 9. Diagramas de dispersión para caudales pronosticados *vs.* observados.

Figure 9. Dispersion diagrams for forecasted *vs.* observed flows.

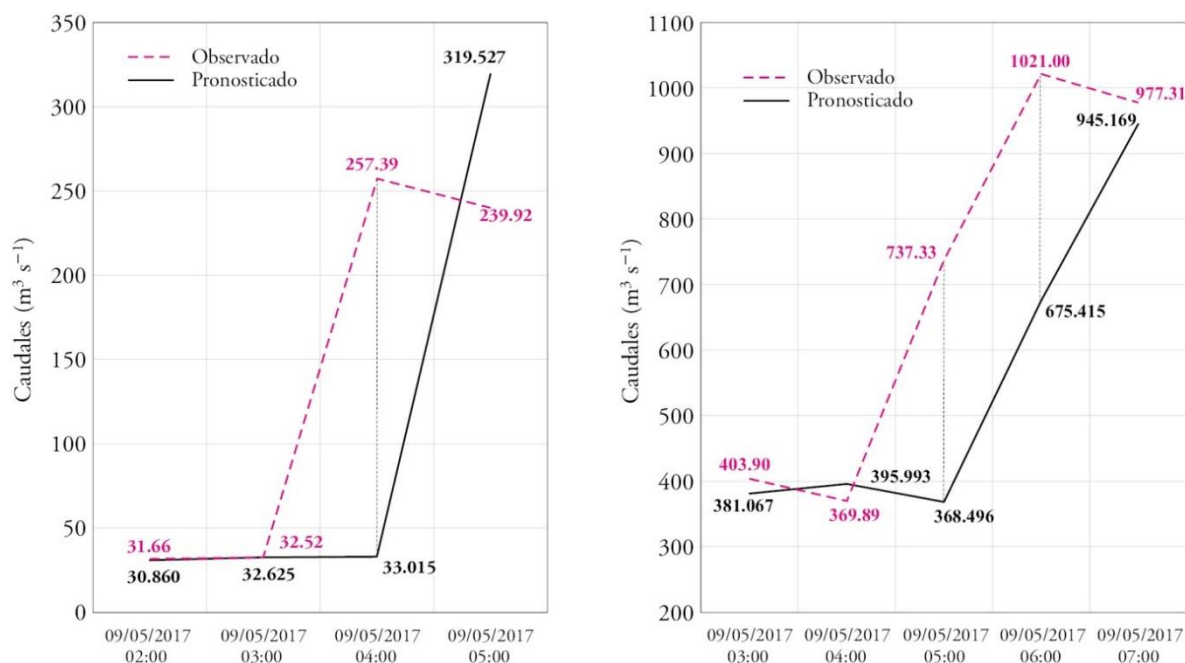


Figura 10. Datos alejados de la línea a 45° para L=1.
Figure 10. Data removed from the 45° line for L=1.

La regresión lineal simple se realizó con un modelo de línea recta del tipo $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_i$, y los valores de los parámetros β_0 y β_1 se presentan en el Cuadro 4.

El análisis del coeficiente de regresión β_1 es importante para el pronóstico de caudales un paso hacia adelante L=1 el valor $\beta_1=0.9754$, lo cual indica que el pronóstico subestima ligeramente los caudales, y conforme aumentan los L pasos hacia adelante para el pronóstico de caudales el coeficiente de regresión disminuye y para seis pasos hacia adelante es L=6 el valor de $\beta_1=0.8426$, como se muestra en las gráficas de dispersión de la Figura 9.

Las gráficas de residuales en la Figura 10 muestran una variabilidad creciente a medida que los caudales aumentan, sobre todo cuando el pronóstico L pasos hacia adelante es mayor. En este caso para el pronóstico L=3, 4, 5, y 6 h hacia adelante los residuos muestran una tendencia a subestimar los caudales. Esto se explica debido al desfase del hidrograma de caudal pronosticado, que al compararse con los valores reales las variaciones son mayores en los picos.

La Figura 11 muestra la alta variabilidad en todo el rango de caudales, pero de acuerdo con las franjas con un intervalo de confianza de 95%, se aprecia más desde 760 m³ s⁻¹.

CONCLUSIONS

The correct identification of model orders and the period for recalculating the values of the a and b parameters of the ARX model is relevant for obtaining good quality flow forecasts.

The Discrete Kalman Filter (DKF) model, together with an autoregressive model with exogenous input (ARX) performed well in forecasting hourly flows, as indicated by their statistical efficiency criteria (Nash-Sutcliffe and RSME) when comparing observed and forecasted flows. The model, even in the most critical condition for forecasting flows six steps ahead (L=6), produces a value of $E=0.85$; that is, the flow forecast considering hourly data gives satisfactory

Cuadro 4. Parámetros de la línea de regresión.
Table 4. Parameters of the regression line.

Pasos hacia adelante L	β_0	β_1
L=1	1.5837	0.9754
L=2	3.3356	0.9506
L=4	7.4034	0.8977
L=6	12.1199	0.8426

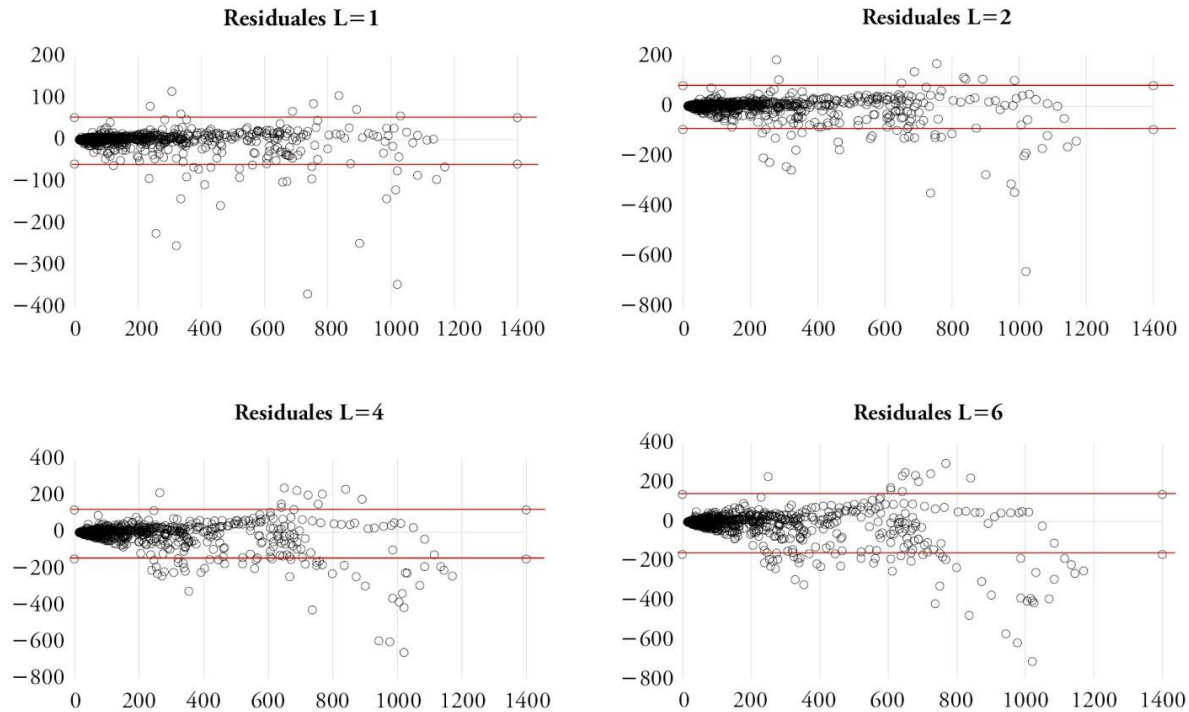


Figura 11. Graficas de residuales con franjas para un nivel de confianza de 95%.
Figure 11. Graphs of residuals with margins for a confidence level of 95%.

CONCLUSIONES

La identificación correcta de las órdenes del modelo y el periodo para recalcular los valores de los parámetros a y b del modelo ARX, son relevantes para obtener una buena calidad de caudales pronosticados.

El modelo de filtro de Kalman Discreto (DKF) junto con un modelo autorregresivo con entrada exógena (ARX) fueron buenos en el pronóstico de caudales horarios, porque sus criterios de eficiencia estadística (Nash-Sutcliffe y RSME) lo indican al momento de comparar los caudales observados contra los pronosticados. El modelo, aún en la condición más crítica para el pronóstico de caudales seis pasos hacia adelante ($L=6$) da un valor de $E=0.85$, es decir el pronóstico de caudales considerando datos horarios da resultados satisfactorios que pudieran emplearse para sistema de alerta temprana. A pesar del desfase de los caudales picos pronosticados para los diferentes pasos hacia adelante, no se pierde la utilidad práctica de estos valores, al considerar que el tiempo de concentración de la cuenca Huaynamota es 44 h.

results that can be used for an early warning system. Despite the lack of coincidence of the forecasted peak flows for different steps ahead, there is no loss of practical usefulness of these values, considering that concentration time in the Huaynamota basin is 44 h.

Because of the lack of hydroclimatological information in the country to implement this type of models for forecasting flows, planning for instrumentation of the basins is necessary, especially to improve the forecasting model that is fed hourly information.

—End of the English version—

Debido a la falta de información hidroclimática en el país, para implementar este tipo de modelos para pronóstico de caudales es necesaria una planeación para la instrumentación de las cuencas, en especial para mejorar el pronóstico el modelo que se alimenta con información horaria.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Federal de Electricidad por permitir acceso a su base de datos hidrometeorológica, a través del sitio web administrado por el Instituto Nacional de Electricidad y Energías Limpias.

LITERATURA CITADA

- Beven, K. 1989. Changing ideas in hydrology-the case of physically-based models. *J. Hydrol.* 105: 157-172.
- Castañeda C., J. A., M. A. Nieto A., and V. A. Ortiz B. 2013. Analysis and application of the Kalman filter to a signal with random noise. *Scientia et Technica* 18: 267-274.
- Chong-yu Xu. 2002. *Hydrologic Models*. Uppsala University. Suecia. 168 p.
- Comisión Federal de Electricidad. 2017. Sistema de Monitoreo de Cuencas de la CFE. <https://h06814.ije.org.mx/cuencas/logon.aspx?ReturnUrl=%2fcuencas%2fdefault.aspx>. (Consulta: septiembre 2017).
- Devi K., G., B. P. Ganasri, and G. S. Dwarakish. 2015. A review on hydrological models. *Aquatic Procedia* 4: 1001-1007.
- González-Leiva, F., L. A. Ibáñez-Castillo, J. B. Valdés, M. A. Vázquez-Peña, y A. Ruiz-García. 2015. Pronóstico de caudales con Filtro de Kalman Discreto en el río Turbio. *Tecnol. Ciencias del Agua* 6: 5-24.
- Hernández P., Y. y H. Medina G. 2012. Estimación de la humedad del suelo mediante técnicas de asimilación de datos. *Rev. Ciencias Téc. Agropec.* 21: 30-35.
- Hsu, K.-L., H. Moradkhani, and S. Sorooshian. 2009. A sequential Bayesian approach for hydrologic model selection and prediction, *Water Resour. Res.* 45: W00B12.
- Hobson, K. A., and K. J. Kardynal. 2015. Western Veeries use an eastern shortest-distance pathway: New insights to migration routes and phenology using light-level geolocators. *The Auk* 132: 540-550.
- INEGI. 2018. Red hidrográfica 1:50,000, edición 2.0. http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/topografia/regiones_hidrograficas.aspx. (Consulta: enero 2018).
- Krause, P., D. P. Boyle, and F. Base. 2005. Comparison of different efficiency criteria for hydrological model assessment. *Adv. Geosci.* 5: 89-97.
- Ljung, L. 2017. *System Identification Toolbox. Getting Started Guide*. The MathWorks INC. 226 p.
- Mendoza, M., G. Bocco, M. Bravo, C. Siebe, y M. A. Ortiz. 2002. Modelamiento hidrológico espacialmente distribuido: una revisión de sus componentes, niveles de integración e implicaciones en la estimación de procesos hidrológicos en cuencas no instrumentadas. *Invest. Geog.* 47: 36-58.
- Morales-Velázquez. M. I., J. Aparicio, y J. B. Valdés. 2014. Pronóstico de avenidas utilizando el Filtro de Kalman Discreto. *Tecnol. Cienc. Agua* 5: 85-110.
- Padilla B., J. I., L. D. Avendaño V., y G. Castellanos D. 2013. Estimación mejorada de modelos AR multivariados en el análisis de señales EEG. *Rev. Ing.* 38: 20-26.
- Servicio Meteorológico Nacional. 2017. Datos Históricos de Estaciones Meteorológicas Automáticas operadas por el SMN. (Consulta: septiembre 2017).
- Solera R., A. 2003. El Filtro de Kalman. Documento de trabajo del Banco central de Costa Rica, elaborado en la División Económica, Departamento de Investigaciones Económicas. 33 p.
- Vargas-Castañeda G., L. A. Ibáñez-Castillo, and R. Arteaga-Ramírez. 2015. Development, classification and trends in rainfall-runoff modeling. *INAGBI* 7: 5-21.
- Vargas-Castañeda. G., L. A. Ibáñez-Castillo, R. Arteaga-Ramírez, and G. Arévalo-Galarza. 2018. Kinematic wave hydrologic model of the Turbio River basin, Guanajuato, Mexico. *INAGBI* 10: 33-47.
- Valdés, J. B., J. Mejía V., e I. Rodríguez I. 1980. Filtros de Kalman en la hidrología: predicción de descargas fluviales para la operación óptima de embalses. Informe Técnico No. 80-2. Caracas: Universidad Simón Bolívar, Decanato de Estudios de Posgrado, Posgrado en Planificación e Ingeniería de Recursos Hídricos. 37 p.
- Zhen-lei, W., X. Yue-Ping, S. Hong-yue, W. Xie, and W. Gang. 2018. Predicting the occurrence of channelized debris flow by an integrated cascading model: A case study of a small debris flow-prone catchment in Zhejiang Province, China, *Geomorphology* doi:10.1016/j.geomorph.2018.01.027
- Welch, G., and G. Bishop. 2006. *An Introduction to the Kalman Filter*. Chapel Hill: University of North Carolina at Chapel Hill. 16 p.

IDENTIFICACIÓN DE DIVERSIDAD PATOGENICA DE *Phomopsis* sp. CAUSAL DEL TIZÓN DEL TALLO Y VAINA EN SOYA (*Glycine max*) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

IDENTIFICATION OF PATHOGENIC DIVERSITY IN *Phomopsis* sp. CAUSING STEM BLIGHT IN SOYBEANS (*Glycine max*) BY MOLECULAR MARKERS

Facundo Ezequiel-Hernández¹, Alejandra M. Peruzzo¹, Guillermo R. Pratta¹, Rosanna N. Pioli^{2*}

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias Rosario (IICAR). Facultad de Ciencias Agrarias. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y Universidad Nacional de Rosario (UNR). ²Campo Experimental J. Villarino. CC14 (2125) Zavalla, S. Fe. Argentina. (pioli@iicar-conicet.gob.ar).

RESUMEN

Phomopsis longicolla (Plo) y *P. phaseoli* var. *sojae* (Pps) son causantes del tizón del tallo y vainas (TTV) y decaimiento de semillas (DS) en soja (*Glycine max*). El objetivo fue estudiar la variabilidad genética y patogénica de *Phomopsis* al interactuar con cultivares con resistencia variada o susceptibilidad; así como conocer la asociación entre el perfil molecular y patogénico en las interacciones estudiadas. La hipótesis fue que existe variabilidad genética en los germoplasmas fúngico y vegetal que incrementa la diversidad de reacciones específicas durante el desarrollo del TTV. Por lo tanto, en este estudio se propone una metodología para analizar la asociación entre atributos patogénicos (expresión fenotípica de la enfermedad) y marcadores moleculares. Seis aislamientos de Plo y uno de Pps se inocularon en seis cultivares de soja. La variabilidad genética fúngica se evaluó mediante marcadores tipo RAPD e ITS y el comportamiento patogénico de los aislamientos fúngicos a través de la severidad (S%) de la enfermedad generada en los cultivares de soja. La caracterización molecular separó a los aislamientos de Plo de Pps. Las interacciones específicas evidenciaron comportamientos diferenciales entre aislamientos fúngicos y entre cultivares de soja. El estudio permitió identificar asociaciones entre la variabilidad molecular de los patógenos y los comportamientos diferenciales en el conjunto de aislamientos de *Phomopsis* y cultivares de soja frente a TTV en *G. max*.

Palabras clave: biodiversidad, interacción planta × patógeno, marcadores moleculares, análisis biplot, resistencia genética, agricultura sostenible.

ABSTRACT

Phomopsis longicolla (Plo) and *P. phaseoli* var. *sojae* (Pps) are causal agents of stem blight (SB) and seed decays (SD) in soybean (*Glycine max*). The objective was to study genetic and pathogenic variability of *Phomopsis* in interactions with cultivars of varied resistance or susceptibility, and to study the association between molecular and pathogenic profiles in the analyzed interactions. The hypothesis was that the existence of genetic variability in both fungus and plant materials increases the biodiversity in specific reactions during the development of SB. For contrasting this hypothesis, a new approach of the widely known statistical methods GGE Biplot was proposed for measuring the correlation among pathogenic attributes (phenotypic expression of the plant pathology) and molecular markers. Six isolates of Plo and one of Pps were inoculated to six soybean cultivars. Genetic variability in the fungi was evaluated at the molecular level by RAPD and ITS markers and at the phenotypic level by their pathogenic performance through the severity (S%) of the pathology caused in soybean cultivars. Molecular characterization separated the Plo isolates from the Pps isolate. Specific interaction between each isolate-cultivar combination evidenced differential pathogenic performances in respect to resistance/susceptibility. The study identified associations between the molecular variability of pathogens and the differential behavior observed in the set of soybean cultivars that interacted with *Phomopsis* isolates that cause TTV in *G. max*.

Key words: biodiversity, plant × pathogen interaction, molecular markers, biplot analysis, genetic resistance, sustainable agriculture.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2019. Aprobado: julio, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 313-326. 2020.

INTRODUCCIÓN

D*iaporthe/Phomopsis* (DP) es un complejo fúngico, hemi-biótrofo, que afecta a más de 900 hospedantes que incluyen especies cultivadas y no cultivadas, forestales nativas, frutales y malezas (Dissanayake *et al.*, 2017); además, pueden sobrevivir en semillas y rastrojo. El binomio genérico-específico: *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. (teleomorfo, forma sexual perfecta, DP) - *Phomopsis phaseoli* (Desmaz.) Sacc (anamorfo, forma asexual imperfecta, PP) y la especie independiente *P. longicolla* T.W. Hobbs (forma asexual, imperfecta o anamorfo (Plo) de un teleomorfo aún desconocido) están presentes en Argentina (Pioli *et al.*, 2003) y en otros países de América, Europa, Asia y África (Vidic *et al.*, 1995). La plasticidad patogénica de DP ha permitido su expansión en diferentes agro-ecosistemas de Argentina (Alzugaray *et al.*, 2007), limitando la producción y calidad de grano seco, fresco (edamame) y semillas (Pioli *et al.*, 1997). *D. phaseolorum* var. *sojae* (Dps) (anamorfo *P. phaseoli* var. *sojae*, Pps) asociado a Plo causan la enfermedad Tizón del tallo y vainas (TTV) y el decaimiento o pudrición de semillas (DS) en los estadios reproductivos del cultivo de soja y deben su expansión a la disponibilidad de distintas fuentes de inóculo (Vidic *et al.*, 1995). El transporte a larga distancia y la transmisión por semillas son la causa principal de la introducción e infección primaria en lotes libres de la enfermedad (Pioli *et al.*, 2000). Estudios moleculares realizados sobre Dps y Plo demostraron una notable variabilidad genética de este grupo fúngico (Pioli *et al.*, 2003; Li, 2010; Vidic *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2015), que dieron origen a la aparición de nuevas razas fisiológicas (Udayanga *et al.*, 2014; Dissanayake *et al.*, 2017). El mejoramiento genético de soja en el mundo ha permitido disponer de genotipos portadores de genes de resistencia a TTV-DS (Zimmerman and Minor, 1993; Smith *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009), pero no en particular a TTV. Por ello, si bien en Argentina se ha logrado caracterizar y seleccionar algunas fuentes potenciales de resistencia (Hernández *et al.*, 2013), es relevante profundizar el estudio de esta enfermedad.

Los análisis de datos de ensayos multi-ambientales, dialélicos e interacciones planta $\times$ patógeno han incluido el concepto de biplot GGE (Yan and Falk, 2002), adaptándolo a cada situación biológica particular que implican estos estudios. Así, este tipo de

INTRODUCTION

D*iaporthe/Phomopsis* (DP) is a fungal complex, hemi-biotroph that affects more than 900 hosts including cultivated and uncultivated species of native forest, fruits and weeds (Dissanayake *et al.*, 2017); they can also survive on seeds and stubble. The binomial specific generic: *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. (teleomorph, perfect sexual form, DP) - *Phomopsis phaseoli* (Desmaz.) Sacc (anamorph, imperfect asexual form, PP) and the independent species *P. longicolla* T.W. Hobbs (asexual form, imperfect o anamorph (Plo) of a teleomorph still unknown) are present in Argentina (Pioli *et al.*, 2003) and in other countries of America, Europe, Asia and Africa (Vidic *et al.*, 1995). The pathogenic plasticity of DP has promoted its expansion in different agro-ecosystems of Argentina (Alzugaray *et al.*, 2007), limiting the production and quality of dry, fresh grain (edamame) and seeds (Pioli *et al.*, 1997). *D. phaseolorum* var. *sojae* (Dps) (anamorph *P. phaseoli* var. *sojae*, Pps) associated to Plo cause the disease stem and pod blight (SPB) and seed decay (SD) in the reproductive stages of soybean crop (Vidic *et al.*, 1995). Long distance transport and transmission by seeds are the main causes of inoculum introduction and primary infection in disease free batches (Pioli *et al.*, 2000). Molecular studies applied on Dps and Plo demonstrated a remarkable genetic variability within this fungal group (Pioli *et al.*, 2003; Li, 2010; Vidic *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2015), that gave rise to the appearance of new physiological races (Udayanga *et al.*, 2014; Dissanayake *et al.*, 2017). Resistant genotypes to SPB-SD were obtained by breeding programs worldwide (Zimmerman and Minor, 1993; Smith *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009), but not particularly to BSP. Therefore, although in Argentina it was possible to characterize and select some potential sources of resistance (Hernández *et al.*, 2013), it is relevant to deepen the study o these diseases.

Data analysis of multi-environmental trials, diallelic studies and pathogen plant interactions have included the concept of biplot GGE (Yan and Falk, 2002), adapting it to each particular biological situation that these studies imply. Thus, this type of analysis allows not only to identify differential behaviors between the virulence of various DP isolates when interacting with different soy genetic

análisis permite no sólo identificar comportamientos diferenciales entre la virulencia de diversos aislamientos DP al interactuar con germoplasma de soja de distinto origen genético, sino también detectar asociaciones entre el polimorfismo de los perfiles moleculares y la diversidad patogénica de los hongos.

En este contexto, la hipótesis de este estudio fue que existe variabilidad genética en los germoplasmas fúngico y vegetal, que incrementa la diversidad de reacciones específicas durante el desarrollo del TTV. Esta variabilidad genética permite detectar asociación entre la virulencia de cada aislamiento y marcadores moleculares. El objetivo fue identificar interacciones específicas entre aislamientos de *Phomopsis* y cultivares de soja, así como conocer la asociación entre el perfil patogénico y molecular mediante un análisis biplot.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización molecular del material fúngico

Siete aislamientos de *Phomopsis* causales de TTV (seis de Plo y una Pps), caracterizados morfológica y molecularmente por RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar) de acuerdo a Pioli *et al.* (2003) y por ITS (espaciadores internos transcritos) de acuerdo con Hernández *et al.* (2015), se seleccionaron desde la colección fúngica que dispone el Área Fitopatología, Biodiversidad Vegetal y Microbiana (BioVyM-FRE). Los aislamientos se desarrollaron como cultivos puros en medio agar-papa-glucosado 2% acidulado (APGA) y el ADN se extrajo de 5 mg de micelio fresco de colonias obtenidas luego de 5 d de incubación. Las reacciones de amplificación para la caracterización molecular se hicieron a partir de 10 ng de ADN fúngico (Hernández *et al.* (2015) con 4 cebadores: OP-AA01 (5'AGACGGCTCC3'), OP-AA06 (5'GTGGGTGCCA3'), Plo5 (cebador directo 5'CGAGCTCGCCACTAGATTTC3' y cebador reverso 5'CCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGG3'), e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). La diversidad genética en el nivel molecular se evaluó por análisis de agrupamiento mediante el método de Ligamiento Promedio Ponderado a partir de la presencia/ausencia de los amplicones de RAPD e ITS obtenidos en cada cepa, y se usó como métrica a las distancias Euclídeas.

Caracterización de la diversidad de las reacciones patogénicas en la interacción soja-*Phomopsis*

Los siete aislamientos se inocularon y evaluaron en sus interacciones con seis cultivares de soja; dos de ellos portadores de

backgrounds, but also to detect associations between the polymorphism of molecular profiles and the pathogenic diversity of fungi.

In this context, the hypothesis of this study was that there is genetic variability in fungal and plant germplasm, which increases the diversity of specific reactions to BSP. This genetic variability allows to detect association between the virulence of each isolation and molecular markers. The objective was to identify specific interactions between *Phomopsis* isolates and soybean cultivars, as well as to know the association between the pathogenic and molecular profiles through a biplot analysis.

MATERIALS AND METHODS

Molecular characterization of fungal material

Seven *Phomopsis* isolates causing SB (six of Plo and one of Pps), morphologically and molecularly characterized by RAPD (random amplified polymorphic DNA) and by ITS (internal transcript spacers) according to Pioli *et al.* (2003) and Hernández *et al.* (2015), respectively, were selected from the fungal collection available at Plant Pathology Area, Plant and Microbe Biodiversity (BioVyM-FRE). Isolates were grown as pure cultures in Potato dextrose agar (PDA) medium 2% acid. Total DNA was extracted from 5 mg of fresh mycelium collected in independent colonies after 5 d of incubation. Amplification reactions for molecular characterization were made from 10 ng of fungal ADN (Hernández *et al.* (2015) with 4 primers: OP-AA01 (5'AGACGGCTCC3'), OPAA06 (5'GTGGGTGCCA3'), Plo5 (direct primer 5'CGAGCTCGCCACTAGATTTC3' and reverse primer 5'CCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGG3'), and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). Genetic diversity at the molecular level was evaluated by hierarchical cluster analysis by UPGMA algorithm from the matrix of presence/absence of RAPD and ITS amplified fragments in each isolate, with the Euclidean distance as the metric.

Characterization of the biodiversity in pathogenic reactions of soybean-*Phomopsis* interactions

The seven isolates were inoculated and evaluated on six soybean cultivars; two of them carrying resistance genes combinations: PI 360841 (*Rpsd1* y *Rpsd2*); PI 417479 (*Rpsd2* y *Rpsd3*); other two carrying single genes: PI 80837 (*Rpsd2*) y PI 562694 (*Rpsd3*); and two without known *Rpsd* genes CVS-5 y CVS-6 (Smith *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012).

The inoculations were performed through a micro wound injection of 10 ml suspension containing $10^{-6} \times 10^5$ of conidia

genes de resistencia combinados: PI 360841 (*Rpsd1* y *Rpsd2*); PI 417479 (*Rpsd2* y *Rpsd3*); dos con genes únicos: PI 80837 (*Rpsd2*) y PI 562694 (*Rpsd3*); y dos sin genes *Rpsd* conocidos CVS-5 y CVS-6 (Smith *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012).

Las inoculaciones se realizaron a través de una micro herida e inyección de 10 mL de una suspensión de $1-6 \times 10^{5-6}$ de conidios de cada cepa fúngica, en la axila foliar (nudo 2) de 12 plantas por cada interacción soja-Plo/Pps, distribuidas en 3 macetas (consideradas como repeticiones para el análisis estadístico). A partir de los 7 d después de la inoculación, se cuantificaron los síntomas y expresaron en valores de severidad (S%) de TTV, siendo $S\% = \frac{\sum (\% \text{ área infectada en cada entrenudo o tallo})}{n^\circ \text{ de entrenudos o tallos evaluados en cada interacción soja-Phomopsis}}$ (Hernández *et al.*, 2015). El comportamiento de los aislamientos fúngicos se infirió a través del grado de Avirulencia/virulencia observado.

Con el fin de agrupar a los aislamientos de *Phomopsis* con base al comportamiento general de los aislamientos en el total de las interacciones analizadas, se generó un dendrograma por el método de Ligamiento Promedio Ponderado usando como métrica las distancias euclídeas (Hernández *et al.*, 2015). Los valores de S% se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, porque esta variable no se distribuyó normalmente ($W=0.89$ $p \leq 0.0001$), para estimar la diversidad fúngica, vegetal y sus interacciones específicas. Para visualizar las interacciones mediante aproximaciones convencionales, se graficó la regresión conjunta (Eberhart and Russell, 1966), en la que los cultivares de soja fueron considerados los ambientes donde las cepas del patógeno (entradas) expresaron su virulencia. Las interacciones específicas entre aislamientos y cultivares se visualizaron por la aproximación GGE del Análisis Biplot (Yan and Falk, 2002), tomando también como entradas a las cepas del patógeno y como ambientes o testers a los cultivares de soja.

Asociación entre la diversidad molecular fúngica y la diversidad patogénica

Polimorfismos moleculares, cuya posición relativa en el gráfico generado por el Análisis Biplot varía conjuntamente con el valor de S% en cada interacción específica, fueron identificados. Además, con la visualización gráfica que este análisis permite, se nombraron los aislamientos con base a la presencia de cada marcador molecular amplificado (Hernández *et al.*, 2015). Estos biplots se emplearon para seleccionar marcadores cuya presencia/ausencia está claramente diferenciada en los distintos sectores del biplot, lo que indicaría un comportamiento patogénico diferencial. Luego, se construyó un dendrograma por el método de Ligamiento Promedio y las distancias euclídeas (d.e)

from each fungal strain, in the leaf axilla (node 2) of 12 plants for each interaction soy-Plo/Pps, distributed in 3 pots (each of them considered as replications for statistical analysis). Symptoms were quantified from 7 d after inoculation, and expressed in severity values (S%) of BSE, being $S\% = \frac{\sum (\% \text{ infected area on each internode or stem})}{n^\circ \text{ of node or stem evaluated in each interaction soy-Phomopsis}}$ (Hernández *et al.*, 2015). The behavior of fungal isolates was inferred through the degree of Avirulence/virulence observed.

In order to group *Phomopsis* isolates based on their general behavior, a dendrogram was generated by the Weighted Average Ligation method using the Euclidean distances as a metric (Hernández *et al.*, 2015). In order to estimate fungal and plant diversity and their specific interactions, severity values were analyzed with the non-parametric Kruskal-Wallis test, since this variable was not normally distributed ($W=0.89$ $p \leq 0.0001$). To visualize the interactions using conventional approaches, the joint regression was plotted (Eberhart and Russell, 1966), considering soybean cultivars as environments where the pathogen strains (inputs) expressed their virulence. The specific interactions between isolates and cultivars were visualized by a GGE of Biplot Analysis approximation (Yan and Falk, 2002), also taking soybean cultivars as environment or testers and the pathogen strains as inputs.

Association between fungal molecular diversity and pathogenic diversity

Molecular polymorphisms, whose relative position in the graph generated by the Biplot Analysis varied together with the value of S% in each specific interaction, were identified. Besides, with the graphics visualization allowed by this analysis, isolates were identified according to the presence of each amplified molecular marker (Hernández *et al.*, 2015). These biplots were used to select markers whose presence/absence are clearly differentiated in the distinct sectors of the biplot, which would indicate a differential pathogenic performance. Then, a dendrogram was constructed with the Average Linking method and Euclidean distances (e.d) as metric, starting from molecular polymorphisms whose presence/absence allowed differentiating among pathogenic interactions in the biplots performed. Comparison of this dendrogram with that obtained with all the molecular markers allowed to verify if the polymorphism selected based on the biplots were a representative sample of the molecular diversity present in the isolates, or if there is a bias related to its pathogenic diversity (Hernández *et al.*, 2015).

como métrica, a partir de los polimorfismos moleculares cuya presencia/ausencia diferenció a las interacciones patogénicas en los biplots realizados. La comparación de este dendrograma con el obtenido con base a la totalidad de los marcadores moleculares permitió verificar si los polimorfismos seleccionados con base a los biplots, constituyen una muestra representativa de la diversidad molecular presente en los aislamientos o si presenta algún sesgo relacionado con su diversidad patogénica (Hernández *et al.*, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la diversidad molecular del material fúngico

En total se detectaron 245 bandas amplificadas por los cuatro tipos de cebadores (OP-AA01, OP-AA06, ITS4 y Plo5), de ellas 136 fueron polimórficas. En el dendrograma obtenido a partir de estos 136 amplicones, que tuvo una correlación cofenética de 0.994, los siete aislamientos Plo y Pps seleccionados se agruparon en correspondencia a su identidad genética (Figura 1A). El análisis mostró variabilidad inter-específica entre las dos especies de *Phomopsis* (*P. longicolla* y *P. sojae*) que divergen a una d.e de 22 y variabilidad intra-específica, dentro de Plo, separándolos a partir de una d.e de 17.

En coincidencia con lo informado por Hernández *et al.* (2015), la caracterización molecular por marcadores RAPD e ITS separó a los aislamientos de *P. longicolla* y *P. sojae* en dos grupos y permitió poner en evidencia la diferenciación inter-específica. Esto se debe a la amplificación de regiones genómicas al azar, no necesariamente involucradas en la determinación de la Avirulencia/virulencia de las cepas fúngicas evaluadas (Pioli *et al.*, 2003).

Caracterización de la diversidad de las reacciones patogénicas en la interacción soja-*Phomopsis*

El dendrograma (Figura 1 B) obtenido con base a la reacción patogénica observada en los aislamientos DP (Cuadro 1), tuvo un valor de correlación cofenética de 0.853 y mostró la diversidad patogénica del grupo de seis aislamientos de Plo y un Pps. Ambas especies son causantes de TTV en soja y los aislamientos evaluados constituyeron una muestra representativa de una colección mayor de *Phomopsis*, que fueron diferenciados en dos grupos fúngicos de patogenicidad

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the molecular diversity in fungal material

A total of 245 fragments amplified by the four types of primers (OP-AA01, OPAA06, ITS4, and Plo5) were detected, and 136 of them were polymorphics. In the dendrogram obtained with these 136 amplified fragments, with a cophenetic correlation of 0.994, the seven selected Plo and Pps isolates were grouped according to their genetic identity (Figure 1A). This analysis evidenced inter-specific variability between both *Phomopsis* species (*P. longicolla* and *P. sojae*), which diverged a 22 e.d and intra-specific variability, within Plo, separating them starting from a 17 e.d.

According to the report of Hernández *et al.* (2015), the molecular characterization by RAPD and ITS markers separated the 6 *P. longicolla* isolate from the unique *P. sojae* isolate, forming two groups that allow evidencing the inter-specific differentiation. This observation can be explained because amplification of genomic regions was random so that these regions are not necessarily involved in genetic determination of Avirulence/virulence of the isolates under study (Pioli *et al.*, 2003).

Characterization of diversity in pathogenic reactions of the soybean-*Phomopsis* interactions

The dendrogram (Figure 1 B) obtained based on the pathogenic reaction observed in the DP isolates (Table 1), had a co-genetic correlation value of 0.853 and showed the pathogenic diversity of the group of six isolates of Plo and one Pps. Both species are causing TTV in soybeans and the isolates evaluated constituted a representative sample from a larger collection of *Phomopsis*, which were differentiated into two fungal groups of different pathogenicity according to S% average. Group I, included less virulent isolates, with a range of variation for S% between 27 and 32%, and was molecularly and taxonomically more heterogeneous, since It included Pps isolation (QCol7) and three Plo (Group 3.4, CaB, B5L16). Group II included three Plo isolates (B4L17, 8413, 227-B2) more virulent and causing TTV with values of S% average between 35 and 40% (Table 1).

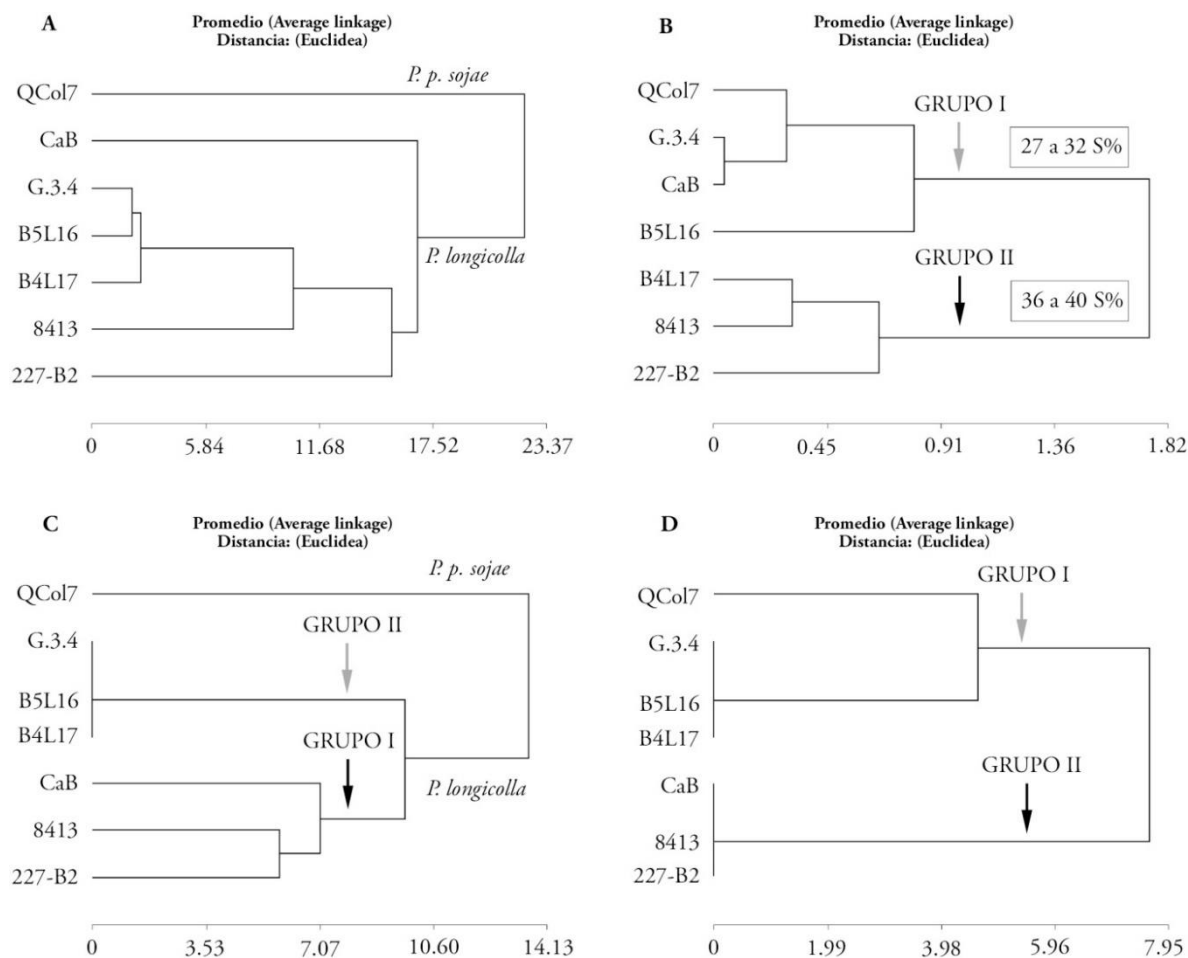


Figura 1. Agrupamiento de los siete aislamientos evaluados de *Phomopsis* spp. con base a diferentes atributos y cálculo de las distancias euclídeas entre ellos. A: dendrograma obtenido a partir de los 136 amplicones polimórficos generados con el total de cebadores (RAPD e ITS). B: dendrograma obtenido a partir de la severidad promedio (%) de cada aislamiento sobre los 6 cultivares inoculados de soja. C: dendrograma obtenido a partir de 49 amplicones polimórficos generados con el cebador RAPD OP-AA01. D: dendrograma obtenido a partir de 18 amplicones polimórficos generados por el cebador RAPD OP-AA01 que, de acuerdo con su presencia/ausencia, se ubicaron diferencialmente en el biplot (ver Figura 2).

Figure 1. Seven isolates of *Phomopsis* grouped on the base of different genetic attributes and measurements of Euclidean distances among them. A: dendrogram obtained with the 136 polymorphic fragments amplified by the total of primers (RAPD and ITS). B: dendrogram obtained with the mean severity (S%) of each isolate upon the 6 soybean inoculated cultivars. C: dendrogram obtained with the 49 polymorphic fragments amplified by primer RAPD OP-AA01. D: dendrogram obtained with the 18 polymorphic fragments amplified by primer RAPD OP-AA01, which were differentially positioned according to their presence/absence in the biplot (see Figure 2).

diferente de acuerdo a S% promedio. El Grupo I, menos virulento y con un rango de variación para S% entre 27 y 32%, fue más heterogéneo molecular y taxonómicamente, pues incluyó al aislamiento Pps (QCol7) y a tres Plo (Grupo 3.4, CaB, B5L16). El Grupo II incluyó a tres aislamientos de Plo (B4L17, 8413, 227-B2) más virulentos y causantes de valores de S% promedio entre 35 y 40% (Cuadro 1).

When comparing Figures 1A and 1B, it is observed that the isolates were grouped differentially according to their molecular diversity or their diversity in the pathogenic reaction or both, because in the first case the fungal genomic regions relieved are not necessarily related to virulence with respect to TTV, and in the second they are grouped only based on the S% caused on a group of soybean cultivars.

Cuadro 1. Valores de porcentaje de severidad promedio de tizón del tallo y vaina (TTV) en interacciones de seis cultivares de soja y seis aislamientos de *P. longicolla* y uno de *P. phaseoli* var. *sojae*.**Table 1. Percentage values of mean severity for stem blight (SB) in plant-pathogen interactions of six soybean cultivars with six *P. longicolla* isolates and one *P. phaseoli* var. *sojae* isolate.**

Aislamientos de <i>Phomopsis</i>	Severidad (%S) de TTV observado en cultivares de soja						S%
	PI360841	PI417479	PI562694	PI80837	Cv 5	Cv 6	
227-B2	49.45	31.25	50.00	50.00	40.90	16.66	39.71
B4L17	31.81	31.25	37.50	38.88	54.16	30.00	37.27
B5L16	40.90	18.5	20.83	54.16	36.36	12.50	32.09
CaB	33.33	16.67	16.67	55.55	40.90	8.30	28.57
GRUPO 3.4	25.00	25.00	9.09	50.00	45.45	18.18	28.79
8413	40.90	44.44	37.50	41.66	50.00	0.00	35.75
Qcol7	27.27	25.00	22.72	54.54	25.00	9.09	27.27
S%	35.52	28.77	27.76	49.26	41.82	13.53	32.78

%S Porcentaje de severidad promedio ♦ Percent mean severity (%S) of SB.

Al comparar las Figuras 1A y 1B, se observa que los aislamientos se agruparon diferencialmente según su diversidad molecular o su diversidad en la reacción patogénica o ambos, porque en el primer caso se ¿relevantan? regiones genómicas de los hongos que no necesariamente están relacionadas con la virulencia respecto a TTV, y en el segundo se los agrupa sólo en base al S% causado sobre un grupo de cultivares de soja.

Sin embargo, hay antecedentes de la existencia de interacciones específicas entre aislamientos de patógenos y cultivares vegetales (Flor, 1971; De Wit, 1992; Pioli *et al.*, 1999), por lo cual la patogenia suele no ser un buen indicador para seleccionar fuentes de resistencia a una enfermedad fúngica (Chiesa *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2015). En concordancia con esos resultados, en este estudio no se detectaron diferencias significativas entre aislamientos fúngicos (con una variación entre 27 y 40%) ($H=7.36$; *n.s.*) (Cuadro 1). En cuanto a la caracterización de las interacciones planta-patógeno, la prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre cultivares ($H=39.69$; $p \leq 0.01$) y para la interacción ($H=64.90$; $p \leq 0.01$). Los resultados de este análisis pueden verificarse visualmente en el gráfico de la regresión conjunta (Figura 2A), en el cual se observa que las diferencias en el desarrollo de TTV (representadas en el eje de las ordenadas) son mayores entre los seis cultivares evaluados (representados en el eje de las abscisas) que entre los siete aislamientos DP (cada uno representado por una línea diferente en el plano definido por ambos ejes de coordenadas).

However, previous studies reported the existence of specific interactions between pathogenic isolates and plant cultivars (Flor, 1971; De Wit, 1992; Pioli *et al.*, 1999), thus the pathogenicity is usually not a good indicator to select sources of resistance for a fungal disease (Chiesa *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2015). In agreement with those results, in this study no significant differences were detected between fungal isolates (with a variation between 27 and 40%) ($H=7.36$; *n.s.*) (Table 1). Regarding the characterization of plant-pathogen interactions, the Kruskal-Wallis test indicated significant differences between cultivars ($H=39.69$; $p \leq 0.01$) and for the interaction ($H=64.90$; $p \leq 0.01$). The results of this analysis can be visually verified in the joint regression graph (Figure 2A), which shows that the differences in the development of TTV (represented in the axis of the ordinates) are greater among the six cultivars evaluated (represented on the abscissa axis) than those observed among the seven DP isolations (each represented by a different line in the plane defined by both coordinate axes).

Figure 2A shows that the isolates are ordered differently according to the S% of TTV generated in each cultivar, indicated by the individual points of each line projected at the corresponding abscissa values, which is consistent with the statistically significant interactions detected by Kruskal-Wallis.

In the biplot (Figure 2B) different behaviours can be observed for both, DP isolates, cultivars and their interactions. In addition, if the axis of coordinates defined by Principal Components (CP)

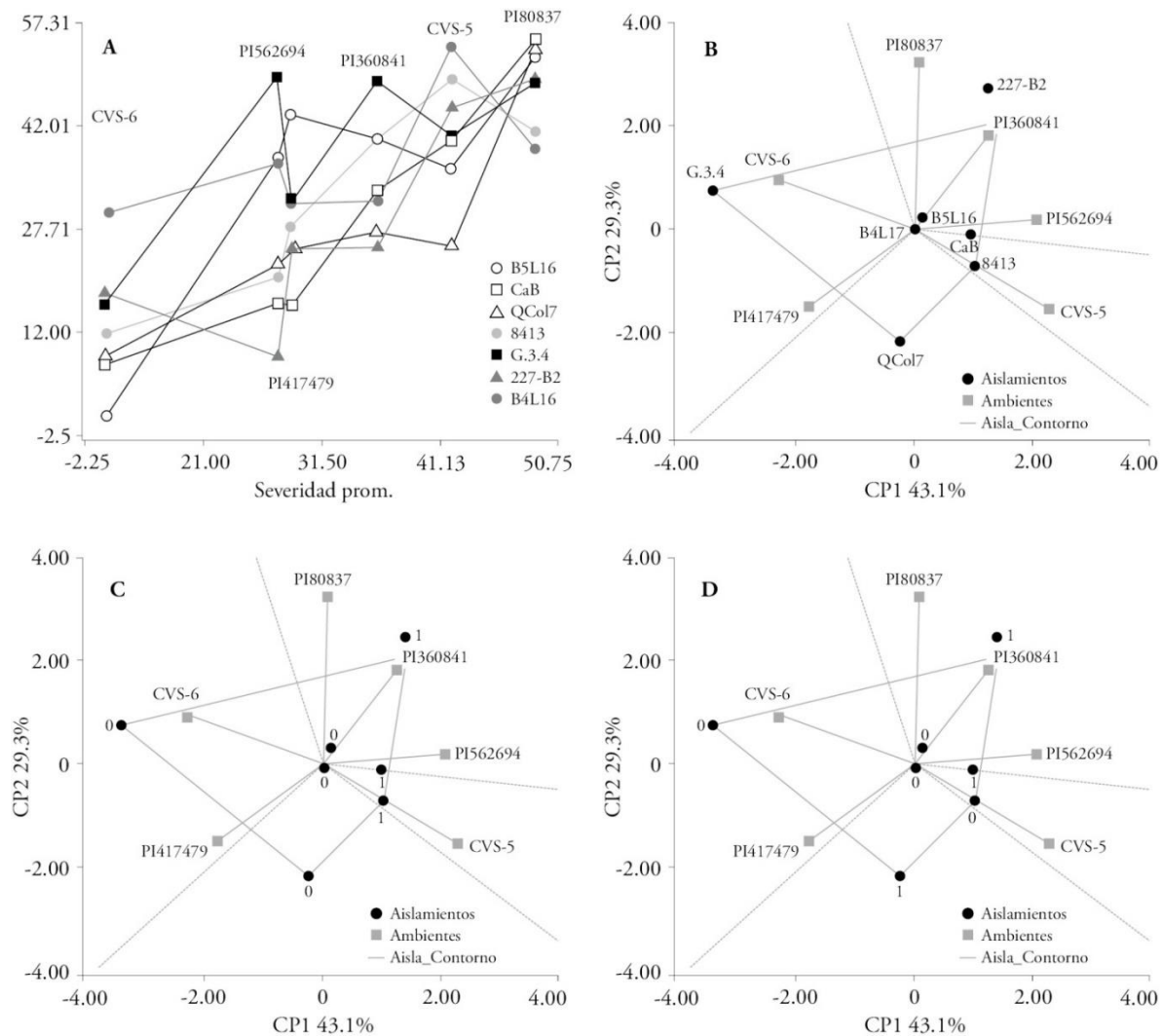


Figura 2. Análisis de la interacción cultivares de soja × aislamientos de *Phomopsis* spp. en diferentes niveles. A: análisis de la interacción a través de la regresión conjunta, graficada en base a valores promedio de severidad de TTV (S%), considerando todos los aislamientos de *Phomopsis*, observada en cada cultivar en el eje de las abscisas y la S% promedio de cada aislamiento sobre cada cultivar en particular en las ordenadas. B: análisis de la interacción a través del Biplot GGE (Yan, 1971), en el que los aislamientos son las entradas (*entries*) y los cultivares son los ambientes (*testers*). C y D: análisis de la interacción que surge de reemplazar el nombre de los aislamientos por la presencia (identificada por 1) y la ausencia (identificada por 0) de los 49 amplicones generados por el cebador OP-AA01. La Figura 2 C corresponde a un amplicón asociado con la interacción soja × *Phomopsis* spp. de patogenicidad específica, en tanto que la 2D ejemplifica un amplicón no asociado con la interacción soja × *Phomopsis* spp. de patogenicidad específica.

Figure 2. Analysis of soybean cultivars × *Phomopsis* spp. isolates in different levels. A: analysis of the interaction by joint regression, plotted on mean SB perceptual severity (S%) of SB through all *Phomopsis* isolates on each cultivar in the abscises axis and mean S% of each isolate on each cultivar in the ordinate axis. B: analysis of the interaction by GGE Biplot (Yan, 1971), considering the isolates as entries and the cultivars as testers. C and D: analysis of the interaction obtained by replacing the name of each isolates by the presence (identified by 1) and the absence (identified by 0) of the 49 polymorphic fragments amplified by primer OP-AA01. Figure 2C shows an amplified fragment associated to *Phomopsis* spp. × soybean interactions of specific pathogenicity, while Figure 2D shows an amplified fragment non associated to specific pathogenicity in *Phomopsis* spp. × soybean interactions.

La Figura 2A muestra que los aislamientos se ordenan de forma diferente de acuerdo con la S% de TTV generada en cada cultivar, indicado por los puntos individuales de cada línea proyectados en los valores de las abscisas correspondientes, lo que concuerda con las interacciones estadísticamente significativas detectadas por Kruskal-Wallis.

En el biplot (Figura 2B) pueden observarse diferentes comportamientos para los aislamientos DP, los cultivares y sus interacciones. Además, si se considera que el eje de coordenadas definido por Componentes Principales (CP) indica cuáles son las fuentes de variación que resultaron más importantes para explicar la variabilidad total encontrada en el conjunto de datos, se puede inferir que la CP1, que corresponde a los ambientes o cultivares de soja y las interacciones, explicó la mayor proporción de variabilidad (43.1%) en tanto que la CP2, que corresponde a las interacciones y las entradas o aislamientos de *Phomopsis*, explicó una proporción menor (29.3%). Al aporte acumulado (72.4 %) de ambas componentes, CP1 y CP2, se sumó además la CP3 (análisis no mostrado) y se alcanzó explicar el 92.4% de la variabilidad total, con lo que se logró una alta eficiencia analítica en el estudio de las interacciones planta $\times$ patógeno.

El análisis de las posiciones relativas de aislamientos y cultivares en el biplot permitió identificar las interacciones patogénicas. En referencia a los cultivares (los ambientes del biplot), la CP1 discriminó entre tres grupos: un primer grupo compuesto por CVS-6 y PI 417479, un segundo grupo formado sólo por PI 80837 (que se ubicó cerca del 0 de este eje) y un tercer grupo compuesto por PI 360841, PI 562694 y CVS-5. En relación a la CP2, los cultivares CVS-6 y PI 417479, incluidos en el grupo uno de la CP1, se separaron y cada uno formó un subgrupo, en tanto que PI 80837, neutro para la CP1, se posicionó en el lado positivo de la CP2. El tercer grupo definido por la CP1 se separó en dos subgrupos de acuerdo con la CP2: uno compuesto por PI 360841 y PI 562694 y otro formado solo por CVS-5.

El gradiente definido por CP1 y CP2 tuvo sentido biológico asociado al comportamiento patogénico promedio mostrado por los hongos sobre los diferentes cultivares. La CP1 definió un gradiente asociado a los valores de S% promedio de TTV (Cuadro 1 y Figura 1B), ubicándose a aquellos aislamientos que causaron una %S menor a 35% en los 6 cultivares evaluados en valores negativos de este eje y aquellos

indicates which are the sources of variation that were most important to explain the total variability found in the data set, it can be inferred that CP1, which corresponds to the environments or cultivars of soybeans and interactions, explained the highest proportion of variability (43.1%), while the CP2, corresponding to the interactions and entrances or isolates of *Phomopsis*, explained a lower proportion (29.3%). Based on the accumulated contribution (72.4%) of both components, CP1 and CP2, a CP3 (analysis not shown) was also added and the 92.4% of the total variability was explained; thus, achieving high analytical efficiency in the study of plant interactions $\times$ pathogen.

The analysis of the relative positions of isolates and cultivars in the biplot, allowed to identify the pathogenic interactions. In reference to cultivars (biplot environments), CP1 discriminated between three groups: a first group consisting of CVS-6 and PI 417479, a second group consisting only of PI 80837 (which was located near 0 of this axis) and a third group consisting of PI 360841, PI 562694 and CVS-5. In relation to CP2, cultivars CVS-6 and PI417479, included in group one of CP1, were separated and each formed a subgroup, while PI 80837, neutral for CP1, was positioned on the positive side of CP2. The third group, defined by CP1, was separated into two subgroups according to CP2: one consisting of PI 360841 and PI 562694, and another consisting only of CVS-5.

The gradient defined by CP1 and CP2 showed biological sense associated with the average pathogenic behaviour shown by fungi on different cultivars. CP1 defined a gradient associated with the values of S% average of TTV (Table 1 and Figure 1B), placing those isolates that caused a %S less than 35% in the 6 cultivars evaluated in negative values of this axis and those isolates that caused a %S greater than 35% of its positive values.

The position of each isolate in the polygon, defined by the isolates with extreme values for CP1 and CP2, explained their behaviour in specific associations/interactions with cultivars; the isolates 227-B2, Group 3.4, QCol7 and 8413 were the most discrepant. In the polygon plotted in the plane of CP1 and CP2, four quadrants are distinguished from the values 0 of each axis. As an example, the upper right quadrant, defined by 227-B2 isolate, which, on average, was the most virulent, will be interpreted

aislamientos que causaron una %S mayor a 35% sobre los valores positivos del mismo.

La posición de cada aislamiento en el polígono definido por los aislamientos con valores extremos para CP1 y CP2 explicó su comportamiento en las asociaciones específicas con los cultivares, siendo 227-B2, Grupo 3.4, QCol7 y 8413 los aislamientos más discrepantes. En el polígono graficado en el plano de CP1 y CP2 se distinguen cuatro cuadrantes a partir de los valores 0 de cada eje. A modo de ejemplo, se interpretará detalladamente el cuadrante superior derecho, definido por el aislamiento 227-B2 que, en promedio, fue el más virulento. En consecuencia, se ubica en los valores más altos de CP1 y de CP2. A este cuadrante están asociados los cultivares PI 360841, PI 80837 y PI 562694, sobre los que 227-B2 produjo mayor infección. Además, este aislamiento se distanció de CVS-6 y PI 417479, que mostraron menor S% frente a él. Aunque en este cuadrante también se ubicaron los aislamientos B5L16 y CaB, estos últimos se encuentran cercanos a su límite y próximos al cuadrante inferior derecho, definido por el aislamiento 8413. El aislamiento B5L16 se ubicó en el mismo cuadrante que 227-B2 por presentar valores similares de enfermedad para dos (PI 360841 y PI 80837) de los tres cultivares asociados a este último aislamiento, pero cercano al origen de coordenadas. Esta posición lo distanció del tercer cultivar asociado a este cuadrante (PI 562694), hecho que se explica porque sobre él, B5L16 presentó el menor S%. El aislamiento CaB se ubicó entre los cultivares con los que 227-B2 presentó mayor S% (PI 80837 y CVS-5) pero se alejó de los dos cultivares con quienes presentó interacción menos compatible (PI 417479 y CVS-6). Cabe destacar que si bien con PI 562694 también presentó baja compatibilidad (similar a la presentada con PI 417479), la aparente asociación mostrada por CP1 y CP2 entre ellos (PI 562694 - CaB) es discriminada en la CP3. Este componente, que como ya se mencionó explicó 20% de la variabilidad y acumuló junto a CP1 y CP2 un 92.4% del total, no se había considerado hasta ahora porque no aportaba significativamente a las interacciones ya analizadas (gráfico no mostrado).

La longitud de los vectores que unen a cada genotipo de soja con el punto de intersección entre los 0 de cada CP indica su capacidad para discriminar a los aislamientos de acuerdo con su S%. Una menor longitud de vector se corresponde con una menor

in detail. Consequently, it is at the highest values of both CP1 and CP2. The quadrants are associated with cultivars PI 360841, PI 80837 and PI 562694, on which 227-B2 produced greater infection. In addition, this isolate distanced itself from CVS-6 and PI 417479, which showed lower S% when interacting with it. Although B5L16 and CaB were also located in this quadrant, these isolates are close to their limit and closer to the lower right quadrant, defined by isolation 8413. The B5L16 isolate was located in the same quadrant as 227-B2 for presenting similar disease values for two (PI 360841 and PI 80837) of the three cultivars associated with it, but it is closer to the origin of coordinates. This position distanced him from the third cultivar associated with this quadrant (PI 562694), a fact that is explained because B5L16 caused the lowest value of S% over the latter cultivar. The CaB isolate was located between the cultivars (PI 80837 and CVS-5) with greater S% caused by 227-B2, but distanced itself from the two cultivars with whom it presented less compatible interaction (PI 417479 and CVS-6). It should be noted that while CaB showed also low compatibility with PI 562694 (similar to that presented with PI 417479), the apparent association shown by CP1 and CP2 between them (PI 562694 - CaB) was discriminated by the CP3. This component, which as mentioned above explained 20% of the variability and accumulated 92.4% of the total together with CP1 and CP2, had not been considered so far since it did not contribute significantly to the previously analyzed interactions (graph not shown).

The length of the vectors that link each soybean genotype with the point of intersection between the 0 of each CP indicates its ability to discriminate isolates according to its S%. A shorter vector length corresponds to a lower capacity of the cultivar to discriminate between isolates of different virulence. In this context and in particular, the shorter vectors corresponded to the cultivars PI 80837 and PI 360841 (15 and 24% of S, respectively), which presented the lowest range of variation against the pathogens.

The biplot analysis also allowed to identify that the cultivars of differential behaviour CVS-6 (R) and PI 80837 (S), even though it carries the *Rpsd* 2 gene), were the least discriminating environments for Plo and Pps isolates with whom they interacted, but they expressed opposite reactions. CVS-6 was

capacidad del cultivar para discriminar entre aislamientos de diferente virulencia. En este contexto y en particular, los vectores más cortos correspondieron a los cultivares PI 80837 y PI 360841 (15 y 24% de S, respectivamente), que presentaron el menor rango de variación frente a los patógenos.

El análisis biplot permitió identificar también que los cultivares de comportamiento diferencial CVS-6 (R) y PI 80837 (S), aun cuando porta el gen *Rpsd* 2), fueron los ambientes menos discriminantes para las cepas de Plo y Pps que interactuaron, pero expresaron reacciones opuestas. CVS-6 fue un ambiente resistente y PI 80837 susceptible donde los aislamientos actuaron como avirulentos y virulentos, respectivamente. En estas interacciones se destacó el comportamiento del Plo B4L17 que en el cultivar resistente CVS-6 fue el más virulento y en el cultivar susceptible PI 80837 resultó el menos virulento. Además, el cv. CVS-5 fue discriminante inter-específico para *Phomopsis*, ya que diferenció el comportamiento de Qcol7 (Pps) respecto a los aislamientos de Plo. El Análisis Biplot, validado por el método clásico de la regresión conjunta, permitió identificar comportamientos diferenciales tanto en los patógenos como en los hospedantes.

La aplicación del análisis biplot permitió identificar interacciones específicas que validaron el comportamiento de cultivares de soja portadores de genes de resistencia a TTV usados en los programas de mejoramiento genético de soja, y además detectaron nuevas fuentes de resistencia en relación a los aislamientos predominantes en la región agroecológica.

Asociación entre la diversidad molecular fúngica y la diversidad patogénica

OP1 generó bandas discriminantes entre los aislamientos ubicados diferencialmente en el polígono del biplot generado a partir de la presencia de los amplicones obtenidos, lo cual demostró que este análisis es también útil para visualizar asociaciones entre la diversidad molecular y la patogénica (Figura 2B). La Figura 2C muestra un amplicón cuya presencia determinó la distribución diferencial de los aislamientos en los valores positivos de CP1 (donde están los 1, que indican presencias) o en los valores negativos y cercanos al 0 u origen de coordenada (donde se ubican los 0, que indican ausencias). La Figura 2D muestra la distribución al azar de un amplicón de

a resistant environment and PI 80837 susceptible where the isolates behaved as avirulent and virulent, respectively. In these interactions, the behaviour of the Plo B4L17 was remarkable because in the resistant cultivar CVS-6 it was the most virulent and in the susceptible cultivar PI 80837 it was the least virulent. Besides, CVS-5 was discriminant inter-specific for *Phomopsis*, since it differentiated the behaviour of Qcol7 (Pps) with respect to Plo isolates. The Biplot Analysis, validated by the classic method of joint regression, allowed identifying differential behaviours in both pathogens and hosts.

The application of the biplot analysis allowed the identification of specific interactions that validated the behaviour of soybean cultivars carrying TTV resistance genes used in the genetic improvement programs of soybeans, and also detected new sources of resistance in relation to the predominant isolates in the agro-ecological region.

Association among fungal molecular diversity and pathogenic diversity

OP1 generated discriminating bands among isolates that were differentially positioned in the polygon of the biplot generated from the presence of the obtained amplicons, which showed that this analysis is also useful for visualizing associations among molecular and pathogenic diversities (Figure 2B). Figure 2C shows an amplicon which presence determined the differential distribution of isolates in PC1 positive values (where the 1, or the presence of this fragment, are grouped) in contrast to the negative or near to zero values (where the 0 or the absence of this fragment, are located). Figure 2D shows a random distribution of an amplicon with random distribution since the 1 and the 0 (presence and absences, respectively) are randomly distributed both on CP1 as well as on CP2. Based on these results, it was inferred that OP1 amplifies fungal genomic regions which show a potential statistical association with pathogenicity of seven *Phomopsis* isolates in specific interactions with six soybean cultivars. Then, a clustering of isolates based on the 49 polymorphic fragments amplified by OP1 was accomplished, and a dendrogram (Figure 1C) showing a similar distribution to that obtained by grouping the total amplified polymorphic fragments, was obtained (Figure 1A). This dendrogram

distribución independiente ya que los 1 y los 0 (presencias o ausencias, respectivamente) se distribuyen al azar tanto sobre CP1 como respecto a CP2. Con base a estos resultados se infirió que OP1 amplifica regiones genómicas fúngicas que muestran una asociación estadística potencial con la patogenicidad de siete aislamientos del género *Phomopsis* en las interacciones específicas con seis cultivares de soja. Luego se realizó un agrupamiento a partir de las 49 bandas polimórficas amplificadas por OP1, obteniéndose un dendrograma (Figura 1C) que mostró una distribución similar a la generada por el agrupamiento con el total de las bandas polimórficas (Figura 1A). Este dendrograma (Figura 1C) tuvo una correlación cofenética de 0.990 y demostró que a partir de los 49 amplicones generados por OP1 es posible validar la variabilidad interespecífica entre Pps y Plo de manera similar a lo observado con el total de los amplicones polimórficos (Figura 1A). Después, con la submuestra de 18 amplicones amplificadas por el OP1 que de acuerdo a su posición en el biplot demostraron asociación con la diversidad patogénica, se construyó un nuevo dendrograma (Figura 1D). Este dendrograma, cuya correlación cofenética fue 0.943, no mostró una separación de los aislamientos por su variabilidad molecular inter-específica (es decir, no diferenció Plo de Pps), sino que agrupó a los siete aislamientos con base a su comportamiento patogénico, lo que coincide con los resultados obtenidos en el análisis biplot sobre la CP1 (Figura 2B).

El análisis biplot permitió detectar marcadores moleculares potencialmente asociados a las interacciones planta $\times$ patógeno. De esta manera, la correlación diversidad patogénica - diversidad molecular que se logró al relacionar el biplot (y su respectivo análisis clásico como control: el gráfico de la regresión conjunta) con el dendrograma basado en 49 marcadores polimórficos OP1, reflejan las reacciones observadas en interacciones específicas entre cepas Plo y Pps y cultivares de soja, tomados como ambientes. Con la integración de la caracterización molecular y la patogénica, se destaca que el G2-sub2 formado por 8413, 227-B2 y CaB evidenció polimorfismo patogénico y molecular, lo cual permite separar a CaB de 8413 y 227-B2. Como ya se mencionó, estos tres

(Figure 1C) had a cophenetic correlation of 0.990 and demonstrated that, from the 49 polymorphic fragments amplified by OP1, it is possible to validate the inter-specific variability among Pps and Plo, which is similar to that observed with the total of polymorphic amplicons (Figure 1A). Then, with the subsample of 18 polymorphic fragments amplified by OP1 whose differential positions in the biplot evidenced an association with pathogenic diversity, a new dendrogram was constructed (Figure 1D). This dendrogram, whose cophenetic correlation was 0.943, did not show a clear separation of isolates according to the inter-specific molecular variability (that is, it was not able to differentiate among Plo and Pps), but it grouped the seven isolates according to their pathogenic performance, in agreement to results obtained on the PC1 of the biplot graphic (Figure 2B).

Biplot analysis allowed the detection of molecular markers potentially associated to plant $\times$ pathogens interactions. Hence, the correlation between pathogenic diversity - molecular diversity obtained by combining the biplot (and its respective classical analysis as control: joint regression graphic) with the dendrogram based on 49 polymorphic markers, reflects the reactions observed in specific interactions observed among Plo and Pps isolates and soybean cultivars, considered as environments. The integration of molecular and pathogenic characterization, a G2-sub2 group composed by 8413, 227-B2 and CaB isolate are noticeable for evidencing pathogenic and molecular polymorphism in respect to the other isolates, which allows the separation of CaB from 8413 and 227-B2. As previously mentioned, these three isolates were discrepant in their performance upon the soybean cultivar carrying known Rpsd genes, and present a common molecular profile that is associated to their virulence profile.

Results from the present study can be incorporated to breeding soybean programs with the aim of identifying and incorporate genes resistant to diseases; thus, it will become a tool that avoids the excessive application of phytosanitary, contribute to environment and natural resources preservation and achieve and safer and secure food.

aislamientos discreparon en su comportamiento frente a los cultivares que portan genes *Rpsd* conocido y presentan un perfil molecular común asociado al perfil de virulencia.

Los resultados de este estudio pueden ser agregados a programas de mejoramiento del cultivo con el fin de identificar e incorporar genes de resistencia a enfermedades, constituyendo una herramienta que, al evitar el uso excesivo de fitosanitarios, contribuye a la preservación del ambiente y los recursos naturales, logrando un alimento más sano y seguro para su consumo.

CONCLUSIONES

La variabilidad patogénica se detectó sobre el conjunto de cultivares de soja evaluados y la variabilidad molecular en el grupo de aislamientos del complejo *Diaporthe/Phomopsis*, lo cual permitió separar las dos especies bajo estudio (*P. longicolla* y *P. sojae*).

La variabilidad genética en el germoplasma fúngico y vegetal (cultivares de *G. max*) se correspondió con la diversidad de reacciones específicas durante el desarrollo de la enfermedad TTV de la soja.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Paolo Cacchiarelli, Carlos O Gosparini, Carlos A Cairo, Bibiana Ferrari y a las Instituciones: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Rosario (UNR), Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR, UNR-CONICET), GDM Seeds y a la Bolsa de Comercio de Rosario.

LITERATURA CITADA

- Alzugaray, C., N. Carnevale, A. Salinas, y R. Pioli. 2007. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Schinopsis balansae* Engl y *Aspidosperma* quebracho-blanco Schltdl. Rev. Iber. Micol. 24: 142-147.
- Chiesa, M. A., R. Pioli, and E. Morandi. 2009. Specific resistance to soybean stem canker conferred by the *Rdm4* locus. Plant Pathol. 58: 1032-1038.
- De Wit, P. J. G. 1992. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 30: 391-418.
- Dissanayake, A. J., A. J. L. Phillips, K. D. Hyde, J. Y. Yan, and X. H. Li. 2017. The current status of species in *Diaporthe*. Mycosphere 8: 1106-1156.
- Eberhart, S. A., and W. A. Russell. 1966. Stability parameters for comparing varieties. Crop Sci. 6: 36-40.

CONCLUSIONS

Pathogenic variability was detected in a set of evaluated soybean cultivars and the molecular variability in a group of isolates from the *Diaporthe/Phomopsis* complex, which allowed the separation of both fungal species (*P. longicolla* and *P. sojae*) under study.

Genetic variability in fungal and plant germplasms (*G. max* cultivars) was associated to diversity in specific reactions during the development of SB pathology in the soybean crop.

—End of the English version—



- Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Ann. Rev. Phytopath. 9: 275-95.
- Hernández, F., L. Faraco, C. Malik, G. Pratta, and R. Pioli. 2013. Resistance sources to stem and pod blight of soybean caused by two *Phomopsis* species in Argentina. Biocell 37: 81-159.
- Hernández, F. E., R. N. Pioli, A. M. Peruzzo, A. N. Formento, y G. R. Pratta. 2015. Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *P. longicolla* (teleomorfo desconocido: *Diaporthe*) de la región templada y subtropical de Argentina. Rev. Biol. Trop. 63: 871-884.
- Jackson, E. W., F. Chunda, F. Patrick, and C. Pengyin. 2009. Genetic mapping of resistance to *Phomopsis* seed decay in the soybean breeding line MO/PSD-0259 (PI562694) and Plant Introduction 80837. J. Hered. 100: 77-783.
- Pioli, R. N., R. Benavidez, y E. N. Morandi. 1997. Estudio preliminar sobre la incidencia de patógenos en semillas de soja fresca para consumo humano. Fitopatología 32: 106-120.
- Pioli, R. N., E. N. Morandi, C. O. Gosparini, and A. L. Borghi. 1999. First report on pathogenic variability of different isolates of *D. phaseolorum* var. *meridionalis* on soybean in Argentina. Ed. American Phytopathol Soc. Plant Dis. Note 83: 1071.
- Pioli, R. N., R. Benavidez, E. N. Morandi, and M. Bodrero. 2000. Epidemiological study of diseases associated to soybean carpels and seeds, Santa Fe, Argentina. Fitopatología 35: 111-118.
- Pioli, R. N., E. N. Morandi, M. C. Martínez, M. F. Lucca, A. Tozzini, V. Bisaro, and H. E. Hopp. 2003. Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the soybean producing area of Argentina. Phytopathology 93: 136-146.
- Smith, S., P. Fenn, P. Chen, and E. Jackson. 2008. Inheritance of resistance to *Phomopsis* seed decay in PI 360841 Soybean. American Genetic Association. J. Hered. 99: 588-592.

- Sun, S., V. Kyujung, K. Moon Young, L. Yeong-Ho, K. Jong-Min, B. In-Youl, L. Yin-Won, L. Weixian, and L. Suk-Ha. 2012. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Phomopsis* seed decay in Korea. J. Crop Sci. Biot.15: 85-91.
- Udayanga, D., L. A. Castlebury, A. Y. Rossman, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2014. The *Diaporthe sojae* species complex: phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. Fung. Biol. 119: 383-407.
- Vidic, M., S. Jasnic, and J. Miladinovic. 1995. The pathogenicity of *Phomopsis sojae* and *Phomopsis longicolla* isolates on soybeans. Zastita-Bilja 46: 197-205.
- Vidic, M., K. Petrovic, V. Đorđević, and L. Riccioni. 2013. Occurrence of *Phomopsis longicolla* conidia in naturally infected soybean. J. Phytopath.161: 470-477.
- Yan, W., and D. E. Falk. 2002. Biplot analysis of host-by-pathogen data. Plant Dis. 86: 1396-1401.
- Zimmerman, M. S., and Minor H. C. 1993. Inheritance of *Phomopsis* seed decay resistance in soybean PI 417479. Crop Sci. 32: 96-100.

PRINCIPALES MOTIVACIONES DEL CONSUMIDOR DE ALIMENTOS ECOLÓGICOS EN ITALIA. EL CASO DEL ACEITE DE OLIVA

MAIN MOTIVATIONS OF ORGANIC FOOD CONSUMERS IN ITALY. THE CASE OF OLIVE OIL

Manuela Vega-Zamora^{1*}, Simona Naspetti², Raffaele Zanolì³

¹Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén. España. (mvega@ujaen.es).

^{2 y 3}Università Politecnica delle Marche. Via Brecce Bianche, Monte Dago, 60131, Ancona. Italia. (s.naspetti@univpm.it), (zanoli@agrecon.univpm.it).

RESUMEN

A pesar del crecimiento generalizado de la agricultura ecológica en Europa, el comportamiento de los mercados de alimentos ecológicos es diferente entre países. Así, en algunos países como Italia hay un gran desequilibrio entre producción y consumo, y se provoca que parte de la producción se destine a mercados exteriores. Esta situación es evidente en el aceite de oliva, un producto emblemático en el sector agrícola italiano. En este contexto, el desarrollo de la demanda interna es una prioridad. Sin embargo, para diseñar estrategias de mercadotecnia efectivas que contribuyan a dicho desarrollo es necesario conocer el comportamiento del consumidor. Bajo la hipótesis de que el principal motivo de compra de los consumidores es de tipo altruista (relacionado con el medio ambiente, la ecología, el bienestar animal o el desarrollo rural y local), el objetivo de este estudio fue conocer las principales motivaciones del consumidor de aceite de oliva ecológico. La respuesta a este objetivo se basó en la Teoría Medios-Fin y para el análisis se utilizó la técnica de “*hard laddering*”, aplicada a una muestra de 25 sujetos. Los resultados mostraron que la salud es el fin último que motiva la compra del aceite de oliva ecológico, y que las motivaciones egoístas priman sobre las altruistas en la decisión de compra o consumo de este tipo de alimentos.

Palabras clave: alimentos ecológicos, aceite de oliva, comportamiento del consumidor, demanda, motivaciones de compra.

ABSTRACT

Despite the widespread growth of organic farming in Europe, the behavior of organic food markets differs among countries. Thus, in some countries such as Italy there is a great imbalance between production and consumption, causing part of the production to go to foreign markets. This situation is evident in olive oil, an emblematic product in the Italian agricultural sector. In this context, the development of internal demand is a priority. However, in order to design effective marketing strategies that contribute to such development, it is necessary to know the consumer's behavior. Under the hypothesis that the main reason for consumers to buy is altruistic (associated with the environment, ecology, animal welfare or rural and local development), the aim of this study was to know the main motivations of the organic olive oil consumer. The response to this objective was based on the Means-End Theory and for the analysis the “*Hard laddering*” technique was used, applied to a sample of 25 subjects. The results showed that health is the ultimate goal that motivates the purchase of organic olive oil, and that selfish motivations prevail over altruistic ones in the decision to buy or consume this type of food.

Key words: organic foods, olive oil, consumer's behavior, demand, reason to buy.

INTRODUCTION

Organic food market is one of the fastest growing sectors in most developed agricultural economies in the world, especially in the European Union (Chen, 2007). This market experienced an increase of approximately

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 327-336. 2020.

INTRODUCCIÓN

El mercado de los alimentos ecológicos es uno de los sectores de más rápido crecimiento en la mayoría de las economías agrícolas desarrolladas en el mundo, en especial en la Unión Europea (Chen, 2007). Este mercado experimentó un incremento aproximado del 145% de 2005 a 2015, alcanzando los 75 billones de euros, de los cuales el 39% corresponde al mercado europeo (Lernoud y Willer, 2017a).

Aunque se puede mencionar un escenario de “crecimiento estable” (Zanoli *et al.*, 2012), la expansión del mercado europeo de alimentos ecológicos no ha sido homogénea en todos los países. Así, Italia, a pesar de ocupar el sexto lugar dentro de la lista de los países con mayor superficie destinada a agricultura ecológica en el mundo, posee una cuota de mercado del 2.5% y un consumo *per capita* de 38 euros (Lernoud y Willer, 2017a). Por eso, aproximadamente el 70% de su producción se destina a los mercados exteriores.

En este contexto, la situación del aceite de oliva es aún más relevante. Italia es el segundo país con mayor superficie destinada a olivar ecológico, con el mayor porcentaje de superficie (casi el 16%) en ese tipo de producción (Lernoud y Willer, 2017b). Sin embargo, su consumo es aún menor que el de otros alimentos ecológicos. Este hecho llama en particular la atención porque el aceite de oliva es un producto importante y de carácter estratégico en la economía agraria italiana. De hecho, Italia es el segundo país productor de aceite de oliva en el mundo, el primer exportador a países no productores, el primer importador, y el primer consumidor (Consejo Oleícola Internacional, 2017).

A pesar de que la demanda exterior es una gran oportunidad de mercado para la producción ecológica italiana, también supone riesgos. Sobre todo, derivados de la dependencia del comercio exportador, de la mayor preocupación de los consumidores ecológicos por los productos de origen local, y de la competencia de terceros países. Ante esta situación y los nuevos desafíos ambientales y climáticos que apuntan hacia la concienciación para un consumo sostenible, el desarrollo de la demanda interna en general y del aceite de oliva ecológico, en particular, es una prioridad.

A dicho desarrollo se puede contribuir a través de diferentes estrategias de mercadotecnia; sin

145% from 2005 to 2015, reaching 75 billion euros, 39% of which correspond to the European market (Lernoud and Willer, 2017a).

Although a steady growth scenario can be mentioned (Zanoli *et al.*, 2012), the expansion of the European organic food market has not been homogeneous in all countries. Thus, Italy, despite being ranked sixth in the world among the countries with the largest area devoted to organic farming, has a market share of 2.5% and a *per capita* consumption expenditure of 38 euros (Lernoud and Willer, 2017a). Therefore, approximately 70% of its production goes to foreign markets.

In this context, the situation of olive oil is even more pronounced. Italy is the second country with the largest area of organic olive groves, with the highest percentage of area (almost 16%) in this type of production (Lernoud and Willer, 2017b). However, its consumption is even lower than that of other organic foods. This fact is particularly striking because olive oil is an important and strategic product in the Italian agricultural economy. Indeed, Italy is the second largest producer of olive oil in the world, the first exporter to non-producing countries, the first importer, and the first consumer (International Olive Oil Council, 2017).

Despite the fact that foreign demand is a great market opportunity for Italian organic production, it also entails risks. Above all, derived from the dependence on export trade, from the greater concern of organic consumers for products of local origin and, from competition from third-party countries. In the sight of this situation and the new environmental and climatic challenges that point to awareness for sustainable consumption, the development of internal demand in general and of organic olive oil in particular, is a priority.

Different marketing strategies can contribute to such development; however, it is necessary to know the consumer's behavior in order to be effective with those strategies. As a result of a thorough review of the literature (Vega-Zamora *et al.*, 2011), it is possible to distinguish two types of motivations (reasons to buy) towards the consumption of organic foods. First, we can refer to selfish motivations, focused on the health and food safety of the individual, on those attributes that can have a positive impact on achieving greater health and safety. Also, hedonistic reasons, for example, the quality of food, its nutritional content or taste.

embargo, para que éstas sean efectivas, es necesario conocer el comportamiento del consumidor. Como resultado de una revisión exhaustiva de la literatura (Vega-Zamora *et al.*, 2011), es posible distinguir dos tipos de motivaciones (motivos de compra) hacia el consumo de alimentos ecológicos. Primero, se puede hacer referencia a motivaciones egoístas, centradas en la salud y seguridad alimentaria del individuo, en aquellos atributos que pueden incidir positivamente en la consecución de una mayor salubridad y seguridad. También, motivos hedonistas, por ejemplo, la calidad de los alimentos, su contenido nutritivo o el sabor.

Después, la segunda referencia, las motivaciones altruistas se relacionan con la protección del ambiente, la ecología, el bienestar animal y el desarrollo rural y local. Las motivaciones altruistas suelen quedar en un segundo plano con respecto a las egoístas. Este hecho llama la atención, porque la producción ecológica surge como un sistema alternativo cuyo objetivo principal es la conservación del ambiente, además de derivar otros beneficios como el desarrollo económico del mundo rural (Alonso y Guzmán, 2004; González *et al.*, 2007).

En consecuencia, bajo la hipótesis de que el consumo de alimentos orgánicos debe asociarse con motivaciones altruistas más que egoístas, el objetivo principal de este estudio fue conocer las motivaciones primarias del consumidor de aceite de oliva ecológico en Italia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para dar respuesta al objetivo planteado se tomó como base la Teoría de los Medios-Fin (Gutman, 1982). La teoría se fundamenta en que la elección individual de un producto, caracterizado por una serie de atributos, deviene en unas consecuencias que permiten al consumidor alcanzar su estado deseado de bienestar final (valores). Por lo tanto, las interrelaciones atributos-consecuencias-valor (Means-End Chaining -MEC-) constituyen el centro de esta teoría.

Este encadenamiento MEC adquiere relevancia especial y se concibe como estructuras simples de conocimiento que relacionan los productos con los valores finales de los consumidores. Es decir, los “medios” son las características de los productos y los “fines” son los valores.

Para el análisis de estos encadenamientos se utiliza la técnica de “*laddering*”; una herramienta analítica cuyo objetivo fundamental es conocer los atributos, consecuencias y valores que los consumidores asocian con un producto (Grunert *et al.*, 2001).

Then, the second reference, altruistic motivations are related to environmental protection, animal welfare and local and rural development. Altruistic motivations often take the second place after selfish motivations. This fact is worth noticing since organic production emerges as an alternative system whose main objective is the conservation of the environment, which in turn leads to other benefits such as economic improvement of rural development (Alonso and Guzmán, 2004; González *et al.*, 2007).

Consequently, under the hypothesis that the consumption of organic food must be associated with more altruistic than selfish motivations, the main objective of this study was to know the primary motivations of the consumers of organic olive oil in Italy.

MATERIALS AND METHODS

The Theory of the Means-End (Gutman, 1982) is what we based on to respond to this objective. The theory is based on the fact that, the individual choice of a given product, characterized by a series of attributes, results in consequences that allow the consumer to reach their desired ending welfare state (values). Therefore, the interrelation attribute-consequence-value (Means-End Chaining or MEC) constitutes the center of this theory.

This MEC acquires special relevance and is conceived as simple knowledge structures that relate products with the ending values of consumers. In other words, the “means” are the characteristics of the products and the “ends” are the values.

For the analysis of these chaining, the Laddering technique is used; an analytical tool whose fundamental objective is to know the attributes, consequences, and values that consumers associate with a product (Grunert *et al.*, 2001).

Research design and information gathering

The population under study was defined as regular or habitual consumers of organic olive oil. For this study, regular consumers of organic olive oil were defined as those who consume it several times a week. Additionally, a 50% quota by sex was established. The participants were recruited at street level in a central area of the city of Ancona (Italy), where there were specialized organic food shops and restaurants offering organic food.

The sampling was intentional, and the researcher approached individuals when he understood that they might have characteristics that made them suitable for participation in the study. They were then asked a filter question to find out if they were consumers of organic olive oil and, if so, they were asked about their frequency of consumption.

Diseño de la investigación y acopio de información

La población objeto de estudio se definió como consumidores regulares o habituales de aceite de oliva ecológico. Para este estudio, se definieron consumidores regulares de aceite de oliva ecológico aquellos que lo consumen varias veces a la semana. Además, se estableció una cuota por sexo del 50%. Los participantes se reclutaron a pie de calle en una zona céntrica de la ciudad de Ancona (Italia), donde había tiendas especializadas de alimentos ecológicos y restaurantes que ofrecían comida ecológica.

El muestreo fue intencional y el investigador abordó a los individuos cuando entendía que podían tener características que les hacían idóneos para participar en el estudio. A continuación, se les formuló una pregunta filtro para saber si eran consumidores de aceite de oliva ecológico y, en caso afirmativo, se les preguntó por su frecuencia de consumo.

Si el individuo era consumidor regular de aceite de oliva ecológico se le invitó a participar en la investigación y, además del sexo, se recolectó la información relativa a la edad y el nivel de estudios. La muestra quedó compuesta por 25 personas: 13 mujeres y 12 hombres, con edades comprendidas entre los 22 y 59 años y el 64% con estudios universitarios. Al tratarse de una técnica cualitativa, la cantidad de participantes no es tan importante y solo se requiere un tamaño mínimo de muestra de 20 participantes para obtener información significativa (Reynolds *et al.*, 2001).

De los tipos de “*laddering*” existentes, se optó por la técnica de “*hard laddering*” con papel y lápiz, fundamentalmente por razones de tiempo. En una primera parte del cuestionario se mostró a los participantes una lista de atributos o características relacionadas con el aceite de oliva ecológico para facilitarles el comienzo de la entrevista y forzarles a dar respuestas. Esta lista estuvo constituida por los siguientes atributos o características: sabor, aroma, color, origen, precio, certificado, transparencia, sin productos químicos, natural, seguro, tradicional, sano, para regalo, para ocasiones especiales, alimento completo y grasa monoinsaturada. La elección de los atributos se determinó a partir de una revisión de la literatura centrada en las características valoradas por los consumidores de alimentos ecológicos y de aceites de oliva.

A continuación, se les pidió que identificaran aquellas características que consideraban más importantes en la decisión de compra y consumo del aceite de oliva ecológico, y que si consideraban que había alguna característica que era importante y no estaba en la lista, la añadieran (máximo tres). Para finalizar esta parte se les pidió que ordenaran las características que identificaron según la importancia en su propia decisión de compra de aceite de oliva ecológico.

If the individual was a regular consumer of organic olive oil, they were invited to participate in the research and, in addition to the sex, information regarding age and level of studies was collected. The sample was composed of 25 people: 13 women and 12 men, aged between 22 and 59 years and 64% with higher education. As this is a qualitative technique, the number of participants is not a determinant, so a minimum sample size of 20 participants is required to obtain meaningful information (Reynolds *et al.*, 2001). **NOTA:** Brenda, a menos que el autor indique, que en las hojas de preguntas hubo más opciones que Male or Female, gender/género no está justificado, porque es una construcción conceptual. Si se tomaron en cuenta categorizaciones no binarias, sólo entonces, se cambiará a género en ambos textos.

The technique of Hard laddering with paper sheet and pencil was chosen from the existing types of Laddering, mainly due to time constraints. In a first part of the questionnaire, participants were shown a list of attributes or characteristics related to organic olive oil to make it easier for them to start the interview and force them to give answers. This list was set up on the following attributes or features: flavor, scent, color, origin, price, certificated, transparency, free of chemical products, natural, safe, traditional, healthy, valued as a gift, used in special occasions, full nutrition food and monounsaturated fat. The choice of attributes was determined from a literature review focusing on the characteristics valued by consumers of organic food and olive oils.

Consumers were then asked to identify those features that they considered most important in the decision to purchase and consuming organic olive oil and, if they considered that there was any feature that was important and was not included in the list, they were asked to add it (in a maximum of three). In order to conclude this part, consumers were asked to rank those features, as they identified them according to their importance for individual decision to buy organic olive oil.

The next part of the questionnaire focused on the four features considered most relevant to the participants. Thus, for each one of these features and separately, the participants answered a series of chained questions (this is, questions based on their previous answers), which led sequentially to higher levels of abstraction. All the questionnaires were done on paper and in handwritten form (Hard laddering)

Data collection took place from June 1 to 19, 2015. Because of the length and nature of the questionnaire, as well as the need for an introductory explanation, the survey was conducted in a nearby cafeteria, in meetings of three to four people, as participants were recruited. These meetings lasted about an hour. During that time, the objective of the study, its purpose, and

La siguiente parte del cuestionario se centró en las cuatro características consideradas más relevantes para los participantes. Así, para cada una de esas características y por separado, los participantes respondieron a una serie de preguntas encadenadas (es decir, preguntas basadas en sus respuestas anteriores), lo que llevó de forma secuencial a niveles de abstracción mayores. Todos los cuestionarios se realizaron en papel y de forma manuscrita (*hard ladder*ing).

La colecta de información tuvo lugar del 1 al 19 de junio de 2015. Por la duración y naturaleza del cuestionario, así como la necesidad de hacer una explicación introductoria del mismo, la administración de éste se realizó en una cafetería cercana y en reuniones de tres o cuatro personas, a medida que se reclutaba a los participantes. Estas reuniones duraron alrededor de una hora y en ellas se explicó el objetivo del estudio, su finalidad, y cómo rellenar el cuestionario, y se dejó a los participantes el tiempo que necesitaran para rellenarlo.

Análisis de datos

Para el análisis de datos se siguió el procedimiento propuesto por Reynolds y Guttman (1988) y se utilizó el software MecAnalystPlus™. Primero se analizó el contenido de cada una de las cadenas escalonadas o “*ladders*”, bajo la consideración de que una contiene elementos encadenados que van de atributos, a consecuencias y, por último, a valores. Luego, todos los elementos que dentro de cada nivel de abstracción eran similares se agruparon bajo un código para resumirlos.

Con la finalidad de evitar posibles subjetividades, dos jueces diferentes (dos de los coautores) realizaron este análisis de contenido y codificación hasta llegar a un grado de acuerdo superior al 70%. Después se desarrolló la matriz de implicación que muestra el número de veces que cada elemento lleva a otro elemento, directa o indirectamente. Por último, se seleccionó un punto de corte para construir el mapa de valor jerárquico (hierarchical value map –HVM–), que representa las estructuras de motivación que la mayoría de los consumidores tienen.

Para esta elección se hizo un análisis de sensibilidad con diferentes puntos de corte: dos, tres, cuatro, cinco y seis. El punto tres se eligió, como punto de corte para representar los elementos que forman cada una de las escaleras o cadenas, por su capacidad explicativa. Esto es, como sugieren Reynolds y Guttman (1988), la solución que ofrece es significativa para su interpretación y uso posterior.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que los consumidores de aceite de oliva ecológico valoran especialmente el

how to fill out the questionnaire were explained; participants were provided enough time as they needed in order to complete the form.

Data analysis

The procedure proposed by Reynolds and Guttman (1988) was followed for data analysis and the software MecAnalystPlus™ was used. First, the content of each of the *ladders* was analyzed, under the consideration that a ladder contains chained elements that depart from attributes, to consequences and, finally, to values. Then, all the elements that were similar within each level of abstraction were grouped together under a code that summarized them.

In order to avoid possible subjectivities, two different judges (two of the co-authors) performed this content analysis and coding until a degree of agreement exceeding 70% was reached. The implication matrix was then developed, showing the number of times each element leads to another element, directly or indirectly. Finally, a cut-off point was selected to construct the hierarchical value map (HVM), which represents the motivational structures that most consumers sense.

For this choice, a sensitive analysis was made with different cut-off points: two, three, four, five and six. Point Three was chosen as the cut-off point to represent the elements that make up each of the ladders or chains, because of its explanatory capacity. That is, as Reynolds and Guttman (1988) suggest, the solution it offers is significant for interpretation and use later on.

RESULTS AND DISCUSSION

Results showed that consumers of organic olive oil particularly value the origin of the product. In particular, the place of its production and processing or transformation (Figure 1). Knowledge of the origin allows consumers to perceive themselves as informed about the product, and this is important because it allows them to know whether the product is local or not, and whether they are contributing to the development of their region. It also allows them to know the variety and, consequently, the taste, and the forms of production or transformation used.

The certification of the product as organic is another attribute that consumers value because it leads to important psychological consequences for them. In other words, the fact that the product is certified assures the consumer that it is indeed organic and is not a mere declaration by a seller. Certification guarantees that the product is not fake

origen del producto. En concreto, el lugar de su producción y elaboración o transformación (Figura 1). El conocimiento del origen permite a los consumidores sentirse informados acerca del producto, y esto es importante para ellos porque les permite saber si el producto es local o no, y si están contribuyendo al desarrollo de su región. Asimismo, les permite conocer la variedad y, en consecuencia, el sabor, y las formas de producción o transformación utilizadas.

La certificación del producto como ecológico es otro de los atributos que los consumidores valoran, porque les lleva a consecuencias psicológicas importantes para ellos. Es decir, el hecho de que el producto esté certificado garantiza al consumidor que efectivamente es ecológico, y no es una mera declaración de un vendedor. La certificación le garantiza que el producto no es falso y le permite confiar en él. Del

and allows the consumer to be confident in it. In the same way, certification gives the consumer security, it allows them to be sure that what they eat meets a series of quality and food safety requirements. In short, certification offers the consumer warranty, confidence, and security; factors that are increasingly valued by consumers due to the great food scandals that have arisen in recent decades (Onyango *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2007).

Price also emerges as another important attribute which motivates the purchase of organic olive oil. Consumers consider that the price is indicative of quality, therefore, a quality product should be paid at a “fair price”. In the case of organic olive oil, they understand that it is a quality product (environmental, organoleptic, certified, health related, etc.) and that it must be paid for.

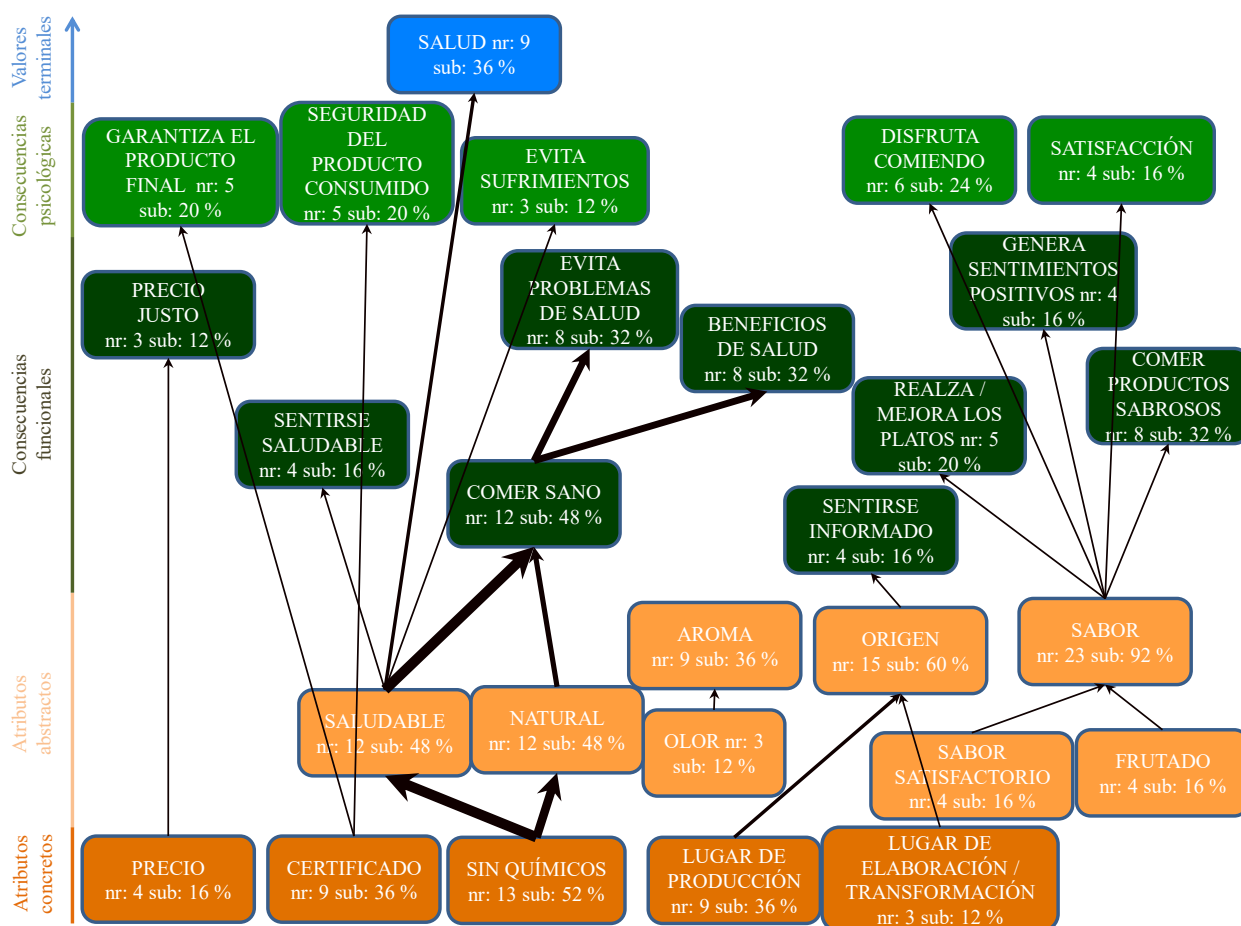


Figura 1. Mapa de valor jerárquico de las motivaciones de consumo de aceite de oliva ecológico en Italia. Punto de corte = 3.
Figure 1. Hierarchical value map of the motivations for consumption of organic olive oil in Italy. Cut-off point = 3.

mismo modo, la certificación da seguridad al consumidor, le permite estar seguro de que aquello que come cumple con una serie de requisitos de calidad y seguridad alimentarias. En definitiva, la certificación ofrece al consumidor garantías, confianza y seguridad; aspectos cada vez más valorados por los consumidores debido a los grandes escándalos alimentarios surgidos en décadas recientes (Onyango *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2007).

El precio también emerge como otro atributo importante que motiva la compra del aceite de oliva ecológico. Los consumidores consideran que el precio es indicativo de calidad y que, por lo tanto, un producto de calidad debe pagarse a un “precio justo”. En el caso del aceite de oliva ecológico, entienden que se trata de un producto de calidad (ambiental, organoléptica, certificada, de salud, etc.) y que debe pagarse por ello.

En esta línea, se debe notar que la importancia que se otorga al precio no ocurre en sentido negativo, tal y como hasta ahora se consigna en la literatura previa (Van Loo *et al.*, 2010; Adasme-Berrios *et al.*, 2011; Vega-Zamora *et al.*, 2011; Marian *et al.*, 2014; Petrescu *et al.*, 2017), donde se apunta al precio como uno de los principales factores inhibidores de la compra de alimentos orgánicos. De hecho, algunas investigaciones ponen de manifiesto que los consumidores no están dispuestos a pagar más por los alimentos ecológicos (Bernabeu *et al.*, 2007; Padilla-Bernal y Perez-Veyna, 2008).

El atributo específico que más valoran los consumidores, cual lleva a su máximo nivel de abstracción y llega a satisfacer un valor terminal, es la ausencia de sustancias químicas. El hecho de que el aceite de oliva ecológico se produzca sin el uso de productos de síntesis, hace pensar al consumidor en un producto sano o saludable y natural, los cuales son atributos algo más abstractos pero importantes para él. Esta importancia radica en que les permite tener una alimentación saludable (“comer sano”), lo cual tiene a su vez efectos importantes sobre la salud. De acuerdo con los consumidores, el comer este alimento natural y saludable contribuye al buen funcionamiento de su organismo y a evitar algunos problemas de salud, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares.

Más aun, el hecho de consumir este producto considerado saludable hace que los consumidores se sientan sanos. En un nivel de abstracción mayor los consumidores perciben que el consumo de este

In this line, it is worth noticing that the importance given to the price is not in a negative sense, as so far stated in the previous literature (Van Loo *et al.*, 2010; Adasme-Berrios *et al.*, 2011; Vega-Zamora *et al.*, 2011; Marian *et al.*, 2014; Petrescu *et al.*, 2017), where the price is pointed out as one of the main factors inhibiting the purchase of organic food. In fact, some research shows that consumers are not willing to pay more for environmentally friendly food (Bernabeu *et al.*, 2007; Padilla-Bernal and Perez-Veyna, 2008).

The specific attribute that consumers most value, which takes them to their highest level of abstraction, and it comes to satisfy an ending value, is the absence of chemicals. The fact that organic olive oil is produced without the use of synthetic products, makes the consumer think of a healthy product or safe and natural. These attributes are somewhat more abstract but important to consumers. This importance lies in the fact that it allows the buyer to have a healthy diet (“eat healthy”), which, in turn, allows important effects on health. According to consumers, this natural and healthy food is contributing to the proper functioning of their body and avoiding some health problems, for example, cardiovascular disease.

Furthermore, the fact that this product is considered healthy makes consumers feel healthy. At an even higher level of abstraction, consumers sense that the consumption of this product avoids suffering from possible diseases. Likewise, consumers value the fact that the product is safe or healthy because it is consistent with how they value their own health. That is, for consumers health is an ending value and the fact of consuming healthy products contributes to the satisfaction of that value.

This perception is consistent with the previous literature, as a significant part of the research on consumer behavior of organic foods shows that health is the main reason for buying this type of food (Roitner-Schobesberger *et al.*, 2008; Chen, 2009; Justin and Jyoti, 2012; Thøgersen *et al.*, 2015; Petrescu *et al.*, 2017; Baudry *et al.*, 2017). However, this result is not consistent with our null hypothesis. Because based on the purpose and features why organic farming was created for, it was expected that among the main motivations of consumers as reasons to buy organic olive oil were those we named altruistic, such as environmental protection, animal welfare or rural development.

producto evita sufrimiento derivado de posibles enfermedades. Asimismo, los consumidores valoran que el producto sea sano o saludable porque es coherente con el valor que ellos otorgan a la salud. Esto es, para los consumidores la salud es un valor final y el hecho de consumir productos saludables contribuye a la satisfacción de dicho valor.

Tal percepción es coherente con la literatura previa, pues una parte importante de las investigaciones sobre el comportamiento del consumidor de alimentos ecológicos pone de manifiesto que la salud es el principal motivo de compra de estos alimentos (Roitner-Schobesberger *et al.*, 2008; Chen, 2009; Justin y Jyoti, 2012; Thøgersen *et al.*, 2015; Petrescu *et al.*, 2017; Baudry *et al.*, 2017). Sin embargo, este resultado no es coherente con nuestra hipótesis de partida. Pues de acuerdo con el fin por el cual surge la agricultura ecológica y las características de ésta, se esperaba que entre las principales motivaciones de los consumidores para la compra de aceite de oliva ecológico estuvieran aquellas que denominamos altruistas, como son la protección medioambiental, el bienestar animal o el desarrollo rural.

Una posible explicación a esta diferencia entre nuestra hipótesis y los resultados obtenidos es el desconocimiento de los consumidores acerca de lo que es la agricultura ecológica y, también de lo que son los alimentos ecológicos (Roitner-Schobesberger *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2008; Vega-Zamora *et al.*, 2014). Si los consumidores no saben exactamente qué son los alimentos ecológicos, en qué se diferencian de los convencionales; esto es, cuál es su valor añadido, sobre todo el relativo a su contribución en la conservación del medio ambiente, es difícil que ellos los valoren y tengan en cuenta en sus decisiones de compra.

Entre los atributos que podemos considerar abstractos, la relación entre el olor (sensación producida al estimular el sentido del olfato) y el aroma (fragancia del alimento que estimula el sentido del olfato) también juega un papel primario a la hora de comer y, en el caso del aceite de oliva ecológico, esto se considera fundamental. De hecho, es otro de los factores que motivan el consumo, otra razón de compra.

El sabor también es clave en la decisión de compra del aceite de oliva ecológico; al igual que en la de otros alimentos ecológicos (Schmid *et al.*, 2007; Thøgersen *et al.*, 2015; Baudry *et al.*, 2017; Petrescu

A possible explanation for this difference between our hypothesis and the results obtained is the lack of knowledge of consumers about what organic farming is and also what organic food means (Roitner-Schobesberger *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2008; Vega-Zamora *et al.*, 2014). If consumers do not know exactly what organic food is and how it differs from conventional food, what its added value is, especially in terms of its contribution to environmental conservation, then it is difficult for them to value it and weigh it in their purchasing decisions.

Among those attributes that we can consider abstract, the relationship between smell (sensation produced by stimulating the sense of smell) and scent (fragrance of the food which stimulates the sense of smell) also plays a primary role while eating and, in the case of organic olive oil, this is considered a key. It is in fact another of the factors that motivate purchase or consumption, another reason to buy.

Taste is also key in the purchase decision for organic olive oil; likewise for other organic foods (Schmid *et al.*, 2007; Thøgersen *et al.*, 2015; Baudry *et al.*, 2017; Petrescu *et al.*, 2017). Taste is important because, through consumption of a food product, it is able to generate positive and pleasant sensations in the consumer. Their purchase allows them to eat a tasty product, enhance their meals and dishes. Likewise, taste is consistent with other more abstract levels in the motivational structure and it allows consumers to enjoy eating (eating is a pleasure) and feel satisfied with what they eat.

CONCLUSIONS

Health is the main motivation in the purchase of organic olive oil, and it is the only purpose sought by the purchase and consumption. Health is the ending value, but consumption allows to obtain health, security, warranties and other selfish consequences such as nice taste and smell, and overall quality.

The environment or other altruistic motivations are not in the mental structure of consumers. Although origin appears an important attribute and it could be associated with more altruistic motivations, this is not the case. That is, the consumer through the origin seeks to know variety, taste, degree of transformation, etc.; factors that are related to selfish motivations.

et al., 2017). El sabor es importante porque, a través del consumo de un alimento, es capaz de generar en el consumidor sensaciones positivas y agradables. Su compra les permite comer un producto sabroso, realzar sus comidas y sus platos. Asimismo, el sabor es coherente con otros niveles más abstractos de la estructura de motivaciones y permite a los consumidores disfrutar comiendo (comer es un placer) y sentirse satisfechos con aquello que comen.

CONCLUSIONES

La salud es la motivación principal en la compra de aceite de oliva ecológico y es la única finalidad buscada a través de la compra y el consumo. La salud es el valor terminal, pero el consumo permite obtener salud, seguridad, garantías y otras consecuencias de carácter egoísta como sabor y olor agradables, y en general, calidad.

El medio ambiente o las motivaciones altruistas no están en la estructura mental de los consumidores. Aunque el origen aparece como un atributo importante y podría asociarse a motivaciones más altruistas, no es el caso. Es decir, el consumidor a través del origen busca conocer la variedad, el sabor, el nivel de transformación, etc.; aspectos relacionados con motivaciones egoístas.

Para el consumidor, a partir de la estructura del mapa de valor jerárquico, las razones de compra del aceite de oliva ecológico son complejas. Los atributos incluidos son muchos y llevan a consecuencias funcionales y psicológicas diversas. De aquí se derivan implicaciones para la estrategia de comercialización del aceite de oliva ecológico que permitirán el fortalecimiento de su mercado interno.

En primer lugar, mensajes de comunicación centrados en beneficios saludables o en atributos que los evoquen, como natural o sin sustancias químicas. También, que la certificación ecológica esté clara en la etiqueta, así como el lugar de producción y elaboración o transformación. Por último, el precio debe ser justo; esto es, un indicador de la calidad global mayor del producto percibida por el consumidor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España la beca otorgada a la primera autora, dentro del programa "José Castillejo" para estancias de movilidad en el

For the consumer, based on the structure of the hierarchical value map, the reason to buy organic olive oil is a complex. There are many attributes that are included and leading to different functional and psychological consequences. Henceforth, some implications are derived to the marketing strategy of organic olive oil that will allow the strengthening of its internal market.

First, communication messages focused on health benefits or attributes that evoke them, such as natural or chemical-free. Also, that the certification of organic is clear on the label, as well as the place of production and processing. Finally, the price should be fair; that is, an indicator of the high overall quality of the product as it is perceived by the consumer.

—End of the English version—



extranjero de jóvenes doctores. Así como al Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali de la Università Politecnica Delle Marche por su colaboración fructífera en el desarrollo de la investigación.

LITERATURA CITADA

- Adasme-Berrios, C., M. Rodríguez, R. Jara-Rojas, y B. Díaz-Tobar. 2011. Dimensiones que caracterizan el consumo potencial de alimentos orgánicos en la Región del Maule, Chile. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* 43: 59-69.
- Alonso M., A. M., y G. I. Guzmán C. 2004. Sostenibilidad y agroecología: Oportunidades para el sector agrario andaluz. *In: Informe Anual del Sector Agrario en Andalucía, 2003. Analistas Económicos de Andalucía, Unicaja-Fundación, Málaga, España.* pp: 471-541.
- Baudry, J., S. Péneau, B. Allès, M. Touvier, S. Hercberg, P. Galan, M. J. Amiot, D. Lairon, C. Méjean, and E. Kesse-Guyot. 2017. Food choice motives when purchasing in organic and conventional consumer clusters: Focus on sustainable concerns (The NutriNet-Santé Cohort study). *Nutrients* 9: 1-17.
- Bernabeu C., R., L. Matinez-Carrasco, M. Brugarolas M.-B., and M. Diaz D. 2007. Differentiation strategies of quality red wine in Castilla-La Mancha (Spain). *Agrociencia* 41:583-595.
- Chen, M. F. 2007. Consumer attitudes and purchase intentions in relation to organic foods in Taiwan: moderating effects of food-related personality traits. *Food Qual. Prefer.* 18: 1008-1021.
- Chen, M. F. 2009. Attitude toward organic foods among Taiwanese as related to health consciousness, environmental at-

- titudes, and the mediating effects of a healthy lifestyle. *Brit. Food J.* 111: 165-178.
- Consejo Oleícola Internacional. 2017. Cifras aceites de oliva. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures> (Consulta: octubre 2017).
- González de M., M., A. M. Alonso M., y G. I. Guzmán C. 2007. La agricultura ecológica en España desde una perspectiva agroecológica. *Rev. Esp. Estud. Agrosoc. Pesq.* 21: 47-73.
- Grunert, K. G., S. C. Beckmann, and E. Sørensen. 2001. Means-end chains and laddering: An inventory of problems and an agenda for research. In: Olson, J. C. and T. J. Reynolds (eds). *Understanding Consumer Decision Making: The Means-End Approach to Marketing and Advertising Strategy*. Erlbaum, Mahwah, NJ. pp: 63-90.
- Gutman, J. 1982. A means-end chain model based on consumer categorization processes. *J. Mark.* 46: 60-72.
- Justin, P., and R. Jyoti. 2012. Consumer behavior and purchase intention for organic food. *J. Consum. Mark.* 29: 412-422.
- Lernoud, J., and H. Willer. 2017a. Current statistics on organic agriculture worldwide: Area, operators, and market. In: Willer H. and Lernoud J. (eds). *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2017*. FiBL-IFOAM, Frick and Bonn. pp: 36-75.
- Lernoud, J., and H. Willer. 2017b. Land use and commodities in organic agriculture. In: Willer H. and Lernoud J. (eds). *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2017*. FiBL-IFOAM, Frick and Bonn. pp: 77-128.
- Marian, L., P. Chrysoschou, A. Krystallis, and J. Thøgersen. 2014. The role of price as a product attribute in organic food context: An exploration based on actual purchase data. *Food Qual. Prefer.* 37: 52-60.
- Onyango, B. M., W. K. Hallman, and A. C. Bellows. 2007. Purchasing organic food in US food systems. A study of attitudes and practice. *Brit. Food J.* 109: 399-411.
- Padilla-Bernal L. E., and O. Perez-Veyna. 2008. The potential consumer of organic peach (*Prunus persica*) in Zacatecas, Aguascalientes and San Luis Potosi. *Agrociencia* 42:379-389.
- Petrescu, D. C., R. M. Petrescu-Mag, P. Burny, and H. Azadi. 2017. A new wave in Romania: Organic food. Consumers' motivations, perceptions, and habits. *Agroecol. Sust. Food* 41: 46-75.
- Reynolds, T. J., C. Dethloff, and S. J. Westberg. 2001. Advancements in laddering. In: Olson J. C. and Reynolds T. J. (eds). *Understanding Consumer Decision Making: The Means-End Approach to Marketing and Advertising Strategy*. Erlbaum, Mahwah, NJ. pp: 91-118.
- Reynolds, T. J., and J. Guttman. 1988. Laddering theory, method, analysis, and interpretation. *J. Advertising Res.* 28: 11-31.
- Roitner-Schobesberger, B., I. Darnhofer, S. Somsook, and C. R. Vogl. 2008. Consumer perceptions of organic foods in Bangkok, Thailand. *Food Policy* 33: 112-121.
- Schmid, O., G. de Fontguyon, y P. Sans. 2007. Desarrollo del mercado de productos de la agricultura ecológica en Europa: un análisis de sus condiciones y del papel de las iniciativas comerciales. *Rev. Esp. Estud. Agrosoc. Pesq.* 214: 15-44.
- Soares, L. L. S., R. Deliza, and S. P. Oliveira. 2008. The Brazilian consumer's understanding and perceptions of organic vegetables: A focus group approach. *Ciencia Tecnol. Alime.* 28: 241-246.
- Thøgersen, J., M. D. de Barcellos, M. G. Perin, and Y. F. Zhou. 2015. Consumer buying motives and attitudes towards organic food in two emerging markets China and Brazil. *Int. Market. Rev.* 32: 389-413.
- Van Loo, E., V. Caputo, R. M. Nayga, J. F. Meullenet, P. G. Crandall, and S. C. Ricke. 2010. Effect of organic poultry purchase frequency on consumer attitudes toward organic poultry meat. *J. Food Sci.* 75: 384-397.
- Vega-Zamora, M., M. Parras-Rosa, F. J. Torres-Ruiz, y E. M. Murgado-Armenteros. 2011. Los factores impulsores e inhibidores del consumo de alimentos ecológicos en España. El caso del aceite de oliva. *Interciencia* 36: 178-184.
- Vega-Zamora, M., F. J. Torres-Ruiz, E. M. Murgado-Armenteros, y M. Parras-Rosa. 2014. Organic as a heuristic cue: What Spanish consumers mean by organic foods. *Psychol. Market.* 31: 349-359.
- Zanoli, R., D. Gambelli, and D. Vairo. 2012. Scenarios of the organic food market in Europe. *Food Policy* 37: 41-57.

ADICIÓN DE GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) Y TOMATE (*Solanum lycopersicum*) DESHIDRATADO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y VIDA DE ANAQUEL DE SALCHICHA TIPO FRANKFURT

ADDITION OF CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) AND DEHYDRATED TOMATO (*Solanum lycopersicum*) ON ANTIOXIDANT CAPACITY AND SHELF-LIFE OF FRANKFURTER SAUSAGE

Nora E. Ponce-Fernández*, Gregorio Polloreña-López, Cindy Rosas-Domínguez,
Vida M. López-Peñuelas, Sandra C. Osuna-Izaguirre¹

Instituto Tecnológico Superior de Guasave. Carretera Internacional Entronque a Brecha s/n,
Ejido El Burrioncito, Guasave, Sinaloa, México. 81149. (nponcef.itsg@gmail.com)

RESUMEN

La combinación de frutas y leguminosas con productos cárnicos demostraron efectos benéficos en la calidad del alimento y en los consumidores. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum*) deshidratado en la calidad nutricional, capacidad antioxidante y vida de anaquel de salchicha tipo Frankfurt, y se espera que a mayor contenido de tomate y garbanzo se mejore la capacidad antioxidante y estabilidad del producto. En cuatro formulaciones de salchicha, con dos niveles de harina de garbanzo y polvo de tomate se evaluaron características fisicoquímicas, capacidad antioxidante, recuento microbiano y características sensoriales. El diseño experimental para el análisis fisicoquímico y microbiológico fue factorial (5×4), con formulación y tiempo de almacenamiento como factores; el diseño para actividad antioxidante y análisis sensorial fue completamente al azar y se analizó con ANDEVA de una vía y comparación de medias con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). El tomate y el garbanzo no modificaron significativamente el contenido de proteína y carbohidratos, en contraste con la fibra y la humedad. La vida de anaquel, A_w , disminuyó con el tiempo por la interacción de los factores. El tomate redujo los niveles de oxidación e incrementó el color interno y externo de la salchicha. El contenido de fenoles totales mostró que el tomate y el garbanzo son fuente de antioxidantes. La capacidad antioxidante del tomate y el garbanzo en la salchicha podrían disminuir el uso de aditivos sintéticos. El contenido mayor de tomate en la formulación funcionó como antimicrobiano, mientras que el contenido mayor de tomate y el menor de garbanzo produjeron mayor aceptabilidad. Por lo anterior se concluye que la adición de garbanzo y tomate redujo el crecimiento

ABSTRACT

The combination of fruits and pulses with meat products proved to have beneficial effects on food quality and consumers. The objective of this experiment was to evaluate the effect of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and dehydrated tomato (*Solanum lycopersicum*) on the nutritional quality, antioxidant capacity, and shelf life of Frankfurter sausages. A higher content of tomato and chickpea are expected to improve the antioxidant capacity and stability of the product. The physicochemical characteristics, the antioxidant capacity, the microbial count, and the sensory characteristic of four sausage formulations —containing two levels of chickpea flour and tomato powder— were evaluated. The experimental design for the physicochemical and microbial analysis was factorial (5×4) with formulation and storage time as factors; the design for antioxidant activity and sensory evaluation was completely random and it was analyzed with a one-way ANOVA and the means were compared with Tukey test ($p \leq 0.05$). Chickpea and tomato did not significantly modify the protein and carbohydrate content, unlike fiber and moist. Shelf life (A_w) decreased in time as a result of the interaction of the factors. Tomato reduced the oxidation levels and increased the internal and external color of the sausages. The total phenolic content showed that tomato and chickpea are sources of antioxidants. The antioxidant capacity of tomato and chickpea could reduce the use of synthetic additives in sausages. The higher tomato content in the formulation had an antimicrobial function, whereas a higher tomato and a lower chickpea content resulted in a greater acceptability. Therefore, the conclusion is that the addition of chickpea and tomato reduced microbial growth and improved nutritional and sensory characteristics, as well as antioxidant capacity, proving that this alternative can reduce the inclusion of chemical additives.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 337-351. 2020.

microbiano y mejoró las características nutricionales, sensoriales y capacidad antioxidante, por lo cual es una alternativa para reducir la inclusión de aditivos químicos.

Palabras clave: garbanzo, tomate, salchicha, calidad nutrimental, capacidad antioxidante, vida de anaquel.

INTRODUCCIÓN

La combinación de frutas y leguminosas con productos cárnicos mejora la calidad del alimento y preferencia por los consumidores (Eyiler y Oztan, 2011). Las leguminosas son ricas en proteínas, carbohidratos, vitaminas hidrosolubles como las del complejo B, y minerales como el calcio y el hierro (Sreerama *et al.*, 2012; Thongram *et al.*, 2016). El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) tiene aminoácidos esenciales, ácidos grasos insaturados nutricionalmente, como los ácidos linoleico y oleico, y esteroides como b-sitosterol, campesterol y estigmasterol (Jukanti *et al.*, 2012).

El tomate (*Solanum lycopersicum*) aporta carotenoides, ácido L-ascórbico y licopeno a la dieta humana (Beecher, 1998; Liu *et al.*, 2010) y el aumento en su consumo disminuye el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares y de cáncer de próstata, pulmón y sistema digestivo (Østerlie y Lerfall, 2005; Eyiler y Oztan, 2011). Por su alta producción Sinaloa es líder nacional en México; sin embargo, de 50 hasta 98% se exporta y lo demás se utiliza para la elaboración de productos como puré y salsa de tomate, y se generan subproductos con propiedades bioactivas que se pueden aprovechar por la industria alimentaria, como antioxidantes y colorantes naturales (Eyiler y Oztan, 2011; SIAP-SAGARPA, 2016; FIRA, 2017a). Toor y Savage (2005) demostraron la importancia de consumir tomates incluyendo piel y semillas para obtener beneficios máximos a la salud. La participación de México en la producción de carne bovina y porcina es 3.1% y 1.3% del total mundial, respectivamente (FIRA, 2017b; FIRA, 2017c), la mayor parte se comercializa como carne en canal. Por lo tanto, se desea contribuir al desarrollo económico mediante el aprovechamiento de las bondades de la carne de res y cerdo para producir productos ricos en proteínas con la elaboración de salchichas, que tienen el primer lugar en volumen de producción de alimentos cárnicos procesados por su demanda (COMECARNE, 2016). La diferencia es el valor agregado que aporta el garbanzo y el tomate en la

Key words: chickpea, tomato, sausage, nutritional quality, antioxidant capacity, shelf life.

INTRODUCTION

The combination of fruits and legumes with meat products improve food quality and consumer preference (Eyiler and Oztan, 2011). Legumes have a high content of proteins, carbohydrates, water-soluble vitamins (such as the vitamin B complex), and minerals (such as calcium and iron) (Sreerama *et al.*, 2012; Thongram *et al.*, 2016). Chickpea (*Cicer arietinum* L.) has essential amino acids, nutritional unsaturated fatty acids (such as linoleic and oleic acids) and sterols (such as b-sitosterol, campesterol, and stigmasterol) (Jukanti *et al.*, 2012).

Tomato (*Solanum lycopersicum*) provides carotenoids, L-ascorbic acid, and lycopene to the human diet (Beecher, 1998; Liu *et al.*, 2010) and its increased consumption diminishes the risk of cardiovascular diseases and prostate, lung, and gastro-intestinal cancer (Østerlie and Lerfall, 2005; Eyiler and Oztan, 2011). As a consequence of its high production, the Mexican state of Sinaloa leads the domestic production. However, Sinaloa exports 50-98% of its production and the rest is used to make products such as tomato purée and sauce, which generates by-products with bioactive properties that can be used in the food industry as antioxidant and natural colorings (Eyiler and Oztan, 2011; SIAP-SAGARPA, 2016; FIRA, 2017a). Toor and Savage (2005) proved the importance of consuming the whole tomato (including its skin and seeds) to obtain maximum health benefits. The Mexican share accounts for 3.1 and 1.3% of the global beef and pork production (FIRA, 2017b; FIRA, 2017c) and most of the meat is commercialized as dressed carcass. Therefore, the aim of this research is to make a contribution to economic development, through the favorable use of beef and pork, in order to manufacture protein-rich products such as sausages—which, as a consequence of its demand, has the highest production volume for processed meat products (COMECARNE, 2016). The difference is the added value that chickpea and tomato bring to the product, in terms of nutritional quality and antioxidant content, because there are few results about the use of by-products in the production of meat products (Deda *et al.*, 2007).

calidad nutricional y contenido de antioxidantes en el producto, porque hay pocos resultados sobre la utilización de subproductos de tomate en la elaboración de productos cárnicos (Deda *et al.*, 2007).

En consecuencia, es necesario combinar los sectores agrícola y pecuario para diseñar y elaborar productos nuevos con propiedades funcionales y de alto valor agregado. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de garbanzo y tomate deshidratado sobre la calidad nutricional, capacidad antioxidante y vida de anaquel de una salchicha tipo Frankfurt. La hipótesis fue que a mayor contenido de tomate y garbanzo se mejora la capacidad antioxidante y estabilidad del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

La harina de garbanzo Blanco Sinaloa 92 (HCO) usada se obtuvo con el proceso de secado hidrotérmico propuesto por Praderes *et al.* (2009) para quinchoncho, con ligeras modificaciones en la cocción (95 °C, 50 min) y secado (93 °C, 70 min). Los tomates se compraron en el mercado local de la ciudad de Guasave, se lavaron y cortaron en rebanadas delgadas de 7 mm, que se secaron con una corriente de aire en un secador ventilado a 40 °C durante 24 h, y se pulverizó hasta obtener un polvo fino (TO) que se almacenó en bolsa aluminizada hasta su uso (Rizk *et al.*, 2014).

Formulación del producto

Las materias primas e ingredientes usados se muestran en el Cuadro 1 para cada tratamiento. Con estos ingredientes se prepararon y evaluaron cinco formulaciones de salchicha con dos niveles de tomate en polvo (0.5 y 1.0 g 100 g⁻¹ de mezcla) y dos niveles de harina de garbanzo (1.8 y 3.5 g 100 g⁻¹ de mezcla). Primero se adicionaron al cutter (MAINCA CM1-4) la carne (-5 °C) y la mitad de la grasa y el hielo. El resto de los ingredientes se adicionaron a una velocidad baja. Una vez mezclados, se aumentó la velocidad del cutter y se mantuvo la temperatura de la pasta entre 12-15 °C. Las mezclas se embutieron en fundas de celulosa de 2.5 cm de diámetro y se ataron a intervalos de 13 cm, luego se cocinaron hasta una temperatura interna de 72 °C y se almacenaron en refrigeración (5 °C) en bolsas de polietileno hasta su análisis. Los análisis de calidad se realizaron al día 1, 7, 14 y

Consequently, combining the agricultural and livestock sector is necessary to design and make new products with functional properties and high added value. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of adding chickpea and dehydrated tomato on the nutritional quality, antioxidant capacity, and shelf life of a Frankfurt-type sausage. The hypothesis was that a higher content of tomato and chickpea will improve the antioxidant capacity and the stability of the product.

MATERIALS AND METHODS

The Sinaloa 92 white chickpea flour (HCO) used in this experiment was obtained through the hydrothermal drying process proposed by Praderes *et al.* (2009) for *Cajun cajan*, with slight modifications in cooking (95 °C, 70 minutes) and drying (93 °C, 70 minutes). The tomatoes were bought at the local market of the city of Guasave. They were washed and cut in 7-mm thin slices that were dried using an air stream in a dryer which was ventilated at 40 °C, during 24 h, it was converted into a thin powder (TO) which was stored in an aluminized bag until it was used (Risk *et al.*, 2014).

Formulation of the product

Table 1 includes the raw materials and ingredients used for each treatment. Five formulations of sausages were prepared and evaluated with these ingredients, using two levels of tomato powder (0.5 and 1.0 g 100 g⁻¹ of the mixture) and two levels of chickpea flour (1.8 and 3.5 g 100 g⁻¹ of the mixture). First, the meat (-5 °C) and half of the fat and the ice were placed into the cutter (MAINCA CM1-4). Then, the rest of the ingredients were added at a slow speed. Once all these ingredients were mixed, the speed of the cutter was increased and the temperature of the paste was kept at 12-15 °C. The mixture was stuffed into 2.5-cm diameter cellulose sausage casings which were tied at 13-cm intervals; then, the sausages were cooked until they reached an internal temperature of 72 °C, they were placed inside polyethylene bags and stored in a refrigerator (5 °C) until their analysis. The quality analysis was carried out 1, 7, 14, and 28 d after the sausages were stored in the refrigerator. The results were compared with those of the sausages manufactured for a commercial brand, which were bought at a local store.

Cuadro 1. Ingredientes utilizados para la elaboración de las salchichas.
Table 1. Ingredients used to manufacture the sausages.

Ingrediente (g)	F1	F2	F3	F4	FT
Carne magra	51	51	51	51	51
Tejido graso	12	12	12	12	12
Agua (como hielo)	25	25	24.5	24.5	25
Cloruro de sodio	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
Sales de curado	0.6	0.6	0.6	0.6	1.6
Harina de trigo	5.2	3.5	5.2	3.5	7.5
Harina de garbanzo	1.8	3.5	1.8	3.5	0
Polvo de tomate	0.5	0.5	1.0	1.0	0
Mezcla de especias	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

F1: formulación 1; F2: formulación 2; F3: formulación 3; F4: formulación 4; FT: formulación testigo ♦ F1: formulation 1; F2: formulation 2; F3: formulation 3; F4: formulation 4; FT: formulation control.

28 de almacenamiento en refrigeración. Los resultados se compararon con los de salchichas elaboradas por una marca comercial, las cuales se adquirieron en un comercio local.

Determinaciones fisicoquímicas

El pH se midió con la homogenización por triplicado de 3 g de cada muestra de HCO y TO con 27 mL de agua destilada utilizando un potenciómetro HANNA modelo 211 (AOAC, 2000), y la actividad de agua (A_w) se midió de acuerdo al procedimiento del manual del equipo (Rotronic GROPALM). La salchicha se trituro y se repitió el procedimiento para pH y A_w .

El contenido de humedad, cenizas, grasa, proteína y fibra de HCO, TO y producto terminado se evaluaron por triplicado con los métodos estandarizados de la AOAC (2000). Humedad (4.1.03) en una estufa (Yamato DNE400) a 100 °C. La grasa se cuantificó (4.1.05 método 920.39) con un equipo de extracción soxhlet. La proteína (12.1.07 método 960.52) con el equipo de digestión y destilación (Scorpion). Las cenizas (método 942.05) con una mufla a 550 °C por lo menos 4 h. La fibra por el método 985.29 en un digestor (Scorpion Scientific).

El color se midió en la superficie de la salchicha y en su interior con un colorímetro (KONIKA MINOLTA CR-400, Japón). La medición del color incluyó la determinación de los valores L^* , a^* , b^* . El parámetro L^* representa la luminosidad o palidez de la salchicha y tiene una escala que va desde 0 que es negro total, hasta 100 que representa un blanco perfecto. El valor a^* va de la escala positiva a negativa (de rojo a verde). El valor b^* determina el color amarillo si los valores son positivos y azul cuando es

Physicochemical determinations

The pH was measured using a homogenization in triplicate of 3 g of each HCO and TO samples with 27 mL of distilled water, in a 211 HANNA potentiometer (AOAC, 2000); meanwhile, water activity (A_w) was measured according to the procedures described in the equipment handbook (Rotronic GROPALM). The sausage was ground and the procedure was repeated for pH and A_w .

The moist, ashes, fat, protein, and fiber content of HCO, TO, and the final product was evaluated in triplicate using the AOAC's standardized methods (2000). Moist (4.1.03) was measured with a Yamato DNE400 stove at 100 °C. Fat was quantified using a Soxhlet extraction apparatus (4.1.05, method No. 920.39). Protein was measured with a Scorpion Scientific digestion and distillation apparatus (12.1.07, method No. 960.52). Ashes were measured using a muffle furnace, at 550 °C for at least 4 h (method No. 942.05). Fiber was measured with a Scorpion Scientific digestor (method No. 985.29).

The external and internal colors of the sausage were measured with a colorimeter (KONIKA MINOLTA CR-400, Japan). Color measurement included the determination of the L^* , a^* , and b^* values. The L^* parameter represents the brightness or paleness of the sausage and its scale ranges from 0 (total black) to 100 (perfect white). The a^* value ranges from a positive (red) to a negative (green) scale. The b^* value uses yellow to determine positive values and blue for negative values (Eyler and Oztan, 2011). Chroma (C^*) was calculated with the abovementioned parameters.

negativo (Eyiler y Oztan, 2011). Chroma (C*) se calculó con los parámetros anteriores.

Capacidad antioxidante

Preparación de extractos hidrofílicos

La preparación de extractos hidrofílicos se realizó por triplicado a TO, HCO y al producto terminado. Un g de HCO y TO (balanza analítica PR 2003 Deltarange) se homogenizó (Homogenizador IKA, ultra Turrax) en 20 mL de metanol al 80% (J. T. Baker); el homogenizado se colocó en un sonicador (Branson 2510) por 30 min y se centrifugó (SIGMA 3-30KS) a 14 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Dos lavados adicionales se realizaron con 10 mL de metanol 80% y se recolectó el sobrenadante para filtrarlo en papel Whatman No. 1. Los extractos obtenidos (EHCO y ETO) se llevaron a un volumen de 30 mL con metanol 80% y se almacenaron a -20 °C hasta su uso en las determinaciones de fenoles totales y capacidad antioxidante (Shivashankara *et al.*, 2004). Para elaborar el extracto del producto terminado se utilizaron 10 g de producto fresco y se usó el método ya descrito y se obtuvo ESA (Extracto de Salchicha).

Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales en los extractos se determinó con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi Jr., 1965) y algunas modificaciones. Los extractos (50 mL) se mezclaron con 3 mL de H₂O (desionizada) y 250 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. Después de 8 min de agitación se adicionaron 750 mL de Na₂CO₃ (20%) y 950 mL de H₂O, se agitaron de nuevo y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Después de la incubación se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (UV-VIS HACH DR 6000). Los resultados se registraron como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) g⁻¹ de peso seco.

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracil)

La capacidad de los extractos para inactivar al radical estable DPPH se evaluó según el método de Brand-Williams *et al.* (1995). Para la solución stock se mezcló 2.5 mg de radical DPPH con 100 mL de metanol puro. La solución se ajustó a 0.7±0.02 (515 nm). La reacción se efectuó con 3.9 mL de radical DPPH y 100 mL de cada extracto. Las mezclas se agitaron y reposaron 30 min en la oscuridad. La reducción del radical se determinó a 515 nm en un espectrofotómetro (UV-VIS HACH DR 6000). La actividad se expresó como % de inhibición del radical DPPH.

Antioxidant capacity

Preparation of hydrophilic extracts

The preparation of hydrophilic extracts was carried out in triplicate with TO, HCO, and the final product. One g of HCO and TO (Deltarange PR 2003 analytical balance) was homogenized (IKA Ultra Turrax® Homogenizer) in 20 mL of 80% methanol (J. T. Baker); the homogenized product was placed in a sonicator (Branson 2510) for 30 min and then it was centrifuged (SIGMA 3-30KS) at 14 000 rpm for 15 min at 4 °C. Two additional washes were carried out, using 10 mL of 80% methanol, gathering the supernatant and filtering it in Whatman filter paper No. 1. Eighty percent methanol was added to the extracts obtained (EHCO and ETO) until reaching a 30 mL volume, they were stored at -20 °C and then were used to determine total phenols and antioxidant capacity (Shivashankara *et al.*, 2004). Ten g of the fresh product was used to obtain the extract from the final product; ESA (sausage extract) was obtained following the aforementioned method.

Total phenols content

The total phenols content of the extracts was determined with the Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi Jr., 1965), and some modifications. The extracts (50 mL) were mixed with 3 mL of H₂O (deionized) and 250 mL of the 1 N Folin-Ciocalteu reagent. After 8 min of agitation, 750 mL of Na₂CO₃ (20%) and 950 mL of H₂O were added; the mixture was agitated again and it was incubated 30 min at room temperature. After the incubation, a 765 nm absorbance was reported in a spectrophotometer (UV-VIS HACH DR 6000). The results were recorded as mg of gallic acid equivalents (EAG) g⁻¹ of dry weight.

DPPH (2,2-dyphenil-1-picril-hidracil)

The extracts' capacity to render inactive the DPPH stable radical was evaluated with the method developed by Brand-Williams *et al.* (1995). For the stock solution, 2.5 mg of the DPPH radical was mixed with 100 mL of pure methanol. The solution was adjusted at 0.7±0.02 (515 nm). The reaction was carried out using 3.9 mL of the DPPH radical and 100 mL of each extract. The mixtures were agitated and were left in the dark for 30 min. The reduction of the radical was determined at 515 nm in a spectrometer (UV-VIS HACH DR 6000). The activity was reported as % of the inhibition of the DPPH radical.

TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox)

El valor de TEAC se determinó según la técnica de Pellegrini *et al.* (1999), que se basa en la habilidad de los extractos para inactivar el radical ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). El radical catión se generó con 19.2 mg de ABTS⁺ disueltos en 5 mL de agua desionizada y 88 mL de K₂S₂O₈ (0.0378 g mL⁻¹). La solución madre se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente por 16 h. Después se tomó 1 mL de radical ABTS⁺ activado, se agregó a 88 mL de metanol y se ajustó a 0.7±0.02 (734 nm), se adicionaron 2970 mL de ABTS⁺ a 30 mL de cada extracto, se monitoreó la absorbancia a 734 nm al minuto 1 y 5 después del mezclado inicial. Los resultados se reportaron como mmoles de equivalentes Trolox (ET) g⁻¹ de peso seco.

Microbiológicos

Las evaluaciones se realizaron los días 1, 7, 14 y 28. Las técnicas son las descritas en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y los protocolos fueron cuenta estándar en placa de bacterias aerobias mesófilas (PCA, 37±1 °C) y psicrófilas (PCA, 4±2 °C), (NOM-092-SSA1-1994). Las muestras se procesaron por triplicado para cada repetición.

Sensorial

Los análisis sensoriales se realizaron con 10 panelistas (5 varones y 5 mujeres), miembros del instituto, de 30 a 35 años. Los atributos evaluados fueron color, sabor y aceptabilidad general en la salchicha tipo Frankfurt a través de una escala hedónica de 5 puntos, donde 1=disgusta extremadamente y 5=gusta extremadamente. Las evaluaciones se realizaron al séptimo día de almacenamiento y antes de ellas se reunió a los panelistas para que se familiarizaran con las características a evaluar. Durante la evaluación se les ofrecieron galletas sin sal y agua entre cada muestra como diluyentes. Una pieza entera se sirvió para evaluar color externo y después en trozos, para evaluar sabor y aceptabilidad general (Eyler y Oztan, 2011).

Análisis estadístico

Para evaluar los datos de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de la salchicha se aplicó un ANDEVA con un diseño factorial (5×4) donde el primer factor son las formulaciones de salchicha (F1, F2, F3, F4 y FT) y el segundo factor fue el tiempo de almacenamiento (1, 7, 14 y 28 d). Los datos de la actividad antioxidante y análisis sensorial de la salchicha se evaluaron con un ANDEVA, un diseño completamente al azar de una sola vía y

TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

The value of TEAC was determined according to the technique developed by Pellegrini *et al.* (1999), which is based on the ability of the extracts to render inactive the ABTS⁺ radical (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). The radical cation was generated dissolving 19.2 mg of ABTS⁺ in 5 mL of dionized water and 88 mL of K₂S₂O₈ (0.0378 g mL⁻¹). The stock solution was incubated in the dark, at room temperature, for 16 h. Afterwards, 88 mL of methanol were added to 1 mL of the ABTS⁺ activated radical and the mixture was adjusted to 0.7±0.02 (734 nm); 2970 mL of ABTS⁺ were added to 30 mL of each extract; and absorbance was monitored at 734 nm, 1 and 5 min after the components were initially mixed. The results were recorded as μmols of Trolox equivalents (ET) g⁻¹ of dry weight.

Microbiologicals

The evaluations were carried out on the 1, 7, 14, and 28 days. The techniques are those described in the Mexican Official Standards (NOM); the protocols were standard count of mesophilic (PCA, 37±1° C) and psychophilic (PCA, 4±2 °C) aerobic bacteria (NOM-092-SSA1-1994). The samples were processed in triplicate per replicate.

Sensory

Ten panelists (5 men and 5 women) —all members of the institute, and 30 to 35 years old— participated in the sensory evaluations. The attributes evaluated were color, taste, and general acceptability of the Frankfurt-type sausage, using a 5-points hedonic scale, where 1 means “does not like at all” and 5 means “likes a lot”. The evaluations were carried out on the 7th day of storage. Before the actual evaluation started, the panelists were familiarized with the characteristics that would be evaluated. During the evaluation, they were offered crackers and water between samples to eliminate the flavor of the previous sample. A whole sausage was served to evaluate external color and it was afterwards served in bits to evaluate taste and general acceptability (Eyler and Oztan, 2001).

Statistical analysis

An ANOVA was used to evaluate the data obtained from the physicochemical and microbiological analysis of the sausages, with a factorial design (5×4) and the first factor corresponds to sausage formulations storage time (1, 7, 14, and 18 d) as the first factor. The data obtained from the antioxidant activity and the sensory evaluation of the sausage were evaluated using

MINITAB 16. Las diferencias entre las medias se evaluaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fisicoquímicos

Los resultados de la composición química de las formulaciones realizadas y de la marca comercial (FT) mostraron diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) para cada formulación (Cuadro 2). Respecto a humedad, F3 presentó el valor más elevado, el cual fue diferente ($p \leq 0.05$) solo respecto a F1. Según Savadkoohi *et al.* (2014), el contenido de humedad para una salchicha elaborada con carne de res y adicionada con pasta de tomate puede variar entre 61.01-64.91%, mientras que El-Nashi *et al.* (2015) prepararon salchichas adicionadas con cáscara de granada y reportan valores de 58.82 a 61.89%. La formulación también afectó el porcentaje de grasa (9.39 a 10.05%) que fue más elevado en el testigo ($p \leq 0.05$) respecto a los demás tratamientos. Los porcentajes de grasa en salchichas van de 16.23% a 20.07% según Hayes *et al.* (2013), Savadkoohi *et al.* (2014) y El-Nashi *et al.* (2015); estos valores son mayores a los encontrados en nuestra investigación, debido a la formulación utilizada. Los tratamientos no afectaron el contenido de proteína y carbohidratos ($p > 0.05$); en las proteínas se atribuyó al uso de la misma proporción de carne en las formulaciones, y en los carbohidratos a que la harina de trigo y de garbanzo tienen contenidos similares de estos compuestos (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013). Por el contrario, los tratamientos afectaron el porcentaje de fibra y la humedad ($p \leq 0.05$) y los valores más elevados se presentaron en el F4 y F3 y

an ANOVA, a one-way completely randomized design, and MINITAB 16. The differences between the means were evaluated using Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Physical-Chemical

The results of the chemical composition of the formulations developed for this study and the commercial brand (Table 2) showed statistical differences ($p \leq 0.05$) between each formulation. The highest moisture value was found in F3, which was different ($p \leq 0.05$) only compared to F1. According to Savadkoohi *et al.* (2014), the moisture content of a beef sausage to which tomato paste was added can range from 61.01 to 64.91%, whereas El-Nashi *et al.* (2015) added pomegranate peel to the sausages they prepared and reported 58.82-61.89% values. The formulation also affected fat percentage (9.39 to 10.05%), which was higher in the control ($p \leq 0.05$) than in the other treatments. According to Hayes *et al.* (2013), Savadkoohi *et al.* (2014) and El-Nashi *et al.* (2015), fat percentages in sausages range from 16.23 to 20.07%. As a consequence of the formulation used, those values were higher than those obtained in this research. The treatments did not affect the protein and carbohydrate content ($p > 0.05$), probably because the same meat proportion was used in the formulations (in the case of proteins) and because wheat and chickpea flour have similar contents to these compounds (in the case of carbohydrates) (Aguilar-Raymundo and Vélez-Ruiz, 2013). On the contrary, the treatments did affect the fiber and moisture percentage ($p \leq 0.05$) and the highest

Cuadro 2. Composición química de salchichas adicionadas con harina de garbanzo y polvo de tomate.
Table 2. Chemical composition of sausages to which chickpea flour and tomato powder was added.

	Humedad	Grasa	Proteína	Fibra	Carbohidratos	Cenizas
F1	62.92±0.16b	10.05±0.51b	11.99±0.39	2.44±0.27c	8.04±0.40	4.54±0.29a
F2	65.41±1.04ab	9.73±0.73b	12.35±0.67	2.65±0.23bc	6.41±1.73	3.41±0.09b
F3	66.51±1.23a	9.39±0.66b	11.99±0.37	3.01±0.03ab	5.61±1.84	3.45±0.05b
F4	64.54±1.12ab	9.93±0.16b	12.13±0.25	3.27±0.23a	6.21±1.00	3.89±0.20b
FT	64.11±0.93ab	11.55±0.51a	12.99±0.43	0.33±0.22d	7.31±1.42	3.68±0.34b

abcd, letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). F1: formulación 1; F2: formulación 2; F3: formulación 3; F4: formulación 4; FT: formulación testigo ♦ abcd, different letters in each column indicate significant differences ($p \leq 0.05$). F1: formulation 1; F2: formulation 2; F3: formulation 3; F4: formulation 4; and FT: control formulation.

el más bajo en el FT. La variabilidad en el contenido de fibra se atribuyó a la incorporación de polvo de tomate porque el orujo de tomate puede tener hasta 39.11% de fibra (Savadkoohi *et al.*, 2014), y la harina de garbanzo puede contener hasta 3% de fibra (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013). Además, los tratamientos cambiaron el contenido de ceniza y F1 fue diferente ($p \leq 0.05$) a los demás tratamientos. Savadkoohi *et al.* (2014) encontraron 2.18 a 2.45% de cenizas en salchichas adicionadas con orujo de tomate.

La interacción de los factores (tiempo $\times$ formulación) afectó el pH ($p \leq 0.05$), con valores iniciales más cercanos a la neutralidad en todas las formulaciones, después descendió hasta el día 14 y presentó un ligero aumento en el último día de muestreo (Cuadro 3). De todas las formulaciones, F2 en el primer día de muestreo, presentó valores más elevados que los demás tratamientos en el mismo día. El pH descendió hasta el día 14 y presentó valores más bajos y no diferentes entre FT y F4, respecto a las demás formulaciones el mismo día. El-Nashi *et al.* (2015) reportan un comportamiento similar, ya que el pH se redujo durante el tiempo de almacenamiento. Según, Eyiler y Oztan (2011) el pH de salchichas adicionadas con polvo de tomate se reduce cuando se aumenta su concentración. Otra variable importante para evaluar la vida de anaquel es la A_w , la cual disminuyó en todas las formulaciones con respecto al tiempo y con un efecto por la interacción de los factores ($p \leq 0.05$). Los valores más elevados para este parámetro se presentaron en el primer día; la FT tuvo

values were found in F4 and F3, while the lowest value was shown by FC. Fiber content variability was attributed to the incorporation of tomato powder, because tomato pomace can include up to 39.11% fiber (Savadkoohi *et al.*, 2014), and chickpea flour can contain up to 3% fiber (Aguilar-Raymundo and Vélez-Ruiz, 2013). Besides, the treatments changed the ash content and F1 was different ($p \leq 0.05$) to other treatments. Savadkoohi *et al.* (2014) found out that sausages to which tomato pomace was added had 2.18-2.45% of ash.

The interaction of the factors (time $\times$ formulation) affected the pH ($p \leq 0.05$) with initial values closer to the neutrality in all formulations; afterwards, it decreased until day 14 and showed a slight increase in the last sampling day (Table 3). Out of all the formulations, during the first sampling day, F2 had higher values than other treatments on the same day. pH descended until day 14 and showed lower and non-different values between FT and F4, with regard to the other formulations during the same day. El-Nashi *et al.* (2015) report a similar behavior: the pH was reduced during the storage period. According to Eyiler and Oztan (2011), the pH of the sausages to which tomato powder was added is reduced as its concentration increases. A_w is another major variable that helps to evaluate the shelf-life, which diminished in all formulations with regard to time and which was affected by factors interaction ($p \leq 0.05$). This parameter had the highest values during the first day; thus, FT had the highest value on that day and it was different ($p \leq 0.05$) to the other formulations. At day

Cuadro 3. Evaluación del pH y A_w del producto terminado durante su almacenamiento.
Table 3. Evaluation of the pH and A_w of the finished product during storage.

	pH				A_w			
	Tiempo (d)				Tiempo (d)			
	1	7	14	28	1	7	14	28
F1	6.61 c	6.31 e	6.28 f	6.46 d	0.90 b	0.86 e	0.84 f	0.79 i
F2	6.71 b	6.35 e	6.16 h	6.88 a	0.90 b	0.88 d	0.86 e	0.79 i
F3	6.63 c	6.28 f	6.07 ij	6.47 d	0.91 b	0.88 d	0.79 i	0.74 j
F4	6.65 c	6.07 ij	6.02 j	6.26 fg	0.90 b	0.88 d	0.86 e	0.83 g
FT	6.22 gh	6.15 h	6.02 j	6.22 g	0.92 a	0.89 c	0.82 gh	0.81 h

abcdefghij, letras diferentes en cada hilera y columna para cada variable indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). F1: formulación 1; F2: formulación 2; F3: formulación 3; F4: formulación 4; FT: formulación testigo ♦ abcdefghij, different letters in each row and column for each variable indicate significant differences ($p \leq 0.05$). F1: formulation 1; F2: formulation 2; F3: formulation 3; F4: formulation 4; FT: control formulation.

el valor más elevado ese día y fue diferente ($p \leq 0.05$) a las demás formulaciones. En el día 28 del periodo de muestreo la A_w disminuyó hasta 0.74 en F3 y fue diferente a los demás tratamientos que variaron de 0.79 a 0.83. En otras investigaciones se elaboraron diversos tipos de salchichas y los valores de A_w al día cero varían de 0.89 a 0.99, y tiende a disminuir durante el almacenamiento (Campagnol *et al.*, 2012; Menegas *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2016).

Otro parámetro de calidad evaluado fue el color (L^* , a^* , b^* y C^*), que se midió en la superficie del producto y en el interior del mismo (Cuadro 4). La luminosidad (L^*) y el color rojo (a^*) son los parámetros que muestran más información sobre los cambios de color (Savadkoohi *et al.*, 2014). Respecto a color externo, la interacción entre los factores principales afectó el parámetro L^* ($p \leq 0.05$) que disminuyó

28, A_w diminished to 0.74 in F3, a value different to the other treatments which varied between 0.79 and 0.83. In other researches, various types of sausages were prepared and a 0.89-0.99 range was obtained for the A_w values on day zero and they have a diminishing trend during their storage (Campagnol *et al.*, 2012; Menegas *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2016).

Color (L^* , a^* , b^* , and C^*) was another of the quality parameters that was evaluated; both the external and internal color of the product were measured (Table 4). Brightness (L^*) and the red color (a^*) are the parameters that provide more information about color changes (Savadkoohi *et al.*, 2014). In relation to external color, the interaction between the main factors affected the L^* parameter ($p \leq 0.05$) which diminished up to day 14; afterwards, a slight increase occurred during the last sampling

Cuadro 4. Evaluación del color del producto terminado durante su almacenamiento.
Table 4. Evaluation of the color of the finished product during its storage.

	Tiempo (d)	Color externo				Color interno			
		L^*	a^*	b^*	C^*	L^*	a^*	b^*	C^*
F1	1	62.83 b	11.67 de	19.72 a	22.91 b	62.00 ab	11.54 e	20.02 a	23.11 bc
	7	59.40 c	13.09 cd	17.87 bc	22.15 bc	60.22 bc	13.17 d	17.57 de	21.96 c
	14	61.26 bc	13.79c	16.12 c	21.22 cd	59.25 c	15.78 bc	16.25 e	22.65 bc
	28	61.30 bc	13.67 c	16.63 c	21.53 c	60.72 b	16.00 b	16.75 e	23.17 bc
F2	1	60.23 c	14.14 c	17.85 bc	22.77 bc	60.08 b	13.26 cd	17.81 cd	22.20 c
	7	62.09 bc	12.32 d	18.80 ab	22.48 bc	61.06 b	12.52 de	18.67 bc	22.49 c
	14	63.26 ab	11.60 de	16.38 c	20.07 d	59.49 c	13.91 cd	16.89 de	21.88 c
	28	62.34 b	11.85 de	16.50 c	20.33 d	59.67 c	13.42 cd	17.11 de	21.75 c
F3	1	63.32 ab	10.89 e	18.04 bc	21.08 cd	62.58 a	11.54 e	19.80 a	22.92 bc
	7	61.72 bc	11.18 de	19.77 a	22.71 b	62.50 a	10.98 e	19.36 ab	22.26 c
	14	63.27 ab	11.11 e	18.54 b	21.61 c	61.73 ab	12.13 de	18.28 c	21.94 c
	28	64.19 ab	10.60 e	18.64 ab	21.45 cd	62.17 ab	12.30 de	18.64 bc	22.34 c
F4	1	61.36 bc	10.89 e	17.96 bc	21.01 cd	60.50 b	13.71 cd	19.38 ab	23.74 b
	7	62.84 b	12.36 d	18.75 ab	22.47 bc	60.82 bc	14.55 c	19.95 a	24.70 ab
	14	61.17 bc	13.77 c	16.74 bc	21.68 c	60.63 b	16.05 b	17.65 cd	23.87 b
	28	60.58 bc	14.09 c	17.55 c	22.52 bc	60.54 bc	16.15 b	17.70 cd	23.96 b
FT	1	65.35 a	19.60 a	17.84 bc	26.51 a	61.58 ab	18.04 a	18.12 cd	25.56 a
	7	65.12 a	18.63 a	17.12 bc	25.30 a	59.75 c	17.64 a	18.00 cd	25.20 a
	14	62.15 bc	16.54 b	16.84 bc	23.60 b	61.85 ab	17.02 ab	17.95 c	24.74 ab
	28	61.96 bc	15.64 b	16.23 c	22.54 bc	62.01 ab	16.97ab	17.85 cd	24.63 ab

abcdef, letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). F1: formulación 1, F2: formulación 2, F3: formulación 3, F4: formulación 4, FT: formulación testigo. $C^* = \text{Chroma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$. ♦ abcdef, different letters in each column indicate significant differences ($p \leq 0.05$). F1: formulation 1; F2: formulation 2; F3: formulation 3; F4: formulation 4; and FC: control formulation. $C^* = \text{Chroma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$.

conforme avanzó el tiempo hasta el día 14, para seguir con un pequeño incremento en el último día de muestreo. Los valores más elevados se registraron en el día 1 de muestreo y fueron más altos en FT y F3, comparados con los demás tratamientos. Los valores decrecieron hasta el día 14, pero aumentaron en el día 28. Hayes *et al.* (2013) aplicaron polvo de tomate en carne de cerdo y obtuvieron valores de L^* desde 55.3 a 63.1 en los primeros días de muestreo, para después tener un aumento ligero. El valor a^* externo es muy importante porque representa la saturación del color rosado en este tipo de productos y, por lo tanto, el primer contacto con el consumidor (Savadkoohi *et al.*, 2014) y este parámetro también fue afectado por la interacción de los factores principales ($p \leq 0.05$). El valor de a^* decreció con el tiempo de almacenamiento, y fue más elevado en FT al día uno. Respecto a las formulaciones, la F2 presentó el valor más alto el primer día de muestreo, y no fue diferente ($p > 0.05$) a F4 en el día 28 de muestreo. La adición de tomate en productos cárnicos aumenta el valor de a^* que tiende a decrecer durante el almacenamiento del producto (Eyiler y Oztan, 2011; Hayes *et al.*, 2013; Savadkoohi *et al.*, 2014). El valor de b^* se asocia con la saturación de colores amarillos, que se atribuye a las grasas en este tipo de productos (Kim *et al.*, 2015). En F1 se registró el valor más elevado el día 1 de muestreo y fue diferente ($p \leq 0.05$) a las demás formulaciones ese día, las cuales oscilaron de 17.84 a 18.04. Savadkoohi *et al.* (2014) reportaron valores inferiores (7.34 a 9.12) a los de nuestra investigación en salchichas de res adicionadas con orujo de tomate. El C^* representa la combinación y saturación de los colores (Deda *et al.*, 2007), por lo cual es importante evaluar su comportamiento; así, este parámetro también decreció durante el tiempo de almacenamiento (Cuadro 4). En el día 1 de almacenamiento fue 26.51 en la FT, y en los demás tratamientos 21.01 y 22.91. Al día 28 de almacenamiento, los valores oscilaron de 20.33 a 22.54. Según Savadkoohi *et al.* (2014), los valores van desde 19.74 a 21.62. Al igual que el color externo, se evaluó el color interno del producto porque se relaciona con la homogeneidad del color en la masa cárnica al momento de procesarla, y hubo un comportamiento similar al del color externo. La interacción de los factores principales (tiempo $\times$ formulación) afectaron a L^* , a^* , b^* y C^* ($p \leq 0.05$). Los valores de L^* disminuyeron al aumentar los días de almacenamiento, entre 59.25 y 62.58 para todas las

day. The highest values were recorded on the first sampling day and they were higher in FC and F3 than in the other treatments. The values diminished up to day 14, but they increased on day 28. Hayes *et al.* (2013) applied tomato powder to pork meat and recorded L^* values ranging from 55.3 to 63.1 during the first days of sampling and a slight increase afterwards. The external a^* value is very important because it represents the saturation of pink in this kind of products and, therefore, it is the first point of contact with the consumer (Savadkoohi *et al.*, 2014); this parameter was also affected by the interaction between the main factors ($p \leq 0.05$). The value of a^* decreased as storage time passed and it was highest for FC on day one. With regard to formulations, F2 had the highest value on the first sampling day and it had no differences ($p > 0.05$) with F4 on sampling day 28. Adding tomato to meat products increases the value of a^* which has a diminishing trend while the product is stored (Eyiler and Oztan, 2011; Hayes *et al.*, 2013; Savadkoohi *et al.*, 2014). The value of b^* is associated with the saturation of yellow, which is attributed to fats in this kind of products (Kim *et al.*, 2015). The highest value for F1 was recorded on the first day of sampling and it was different ($p \leq 0.05$) to the other formulations on that day, which ranged from 17.84 to 18.04. Savadkoohi *et al.* (2014) recorded lower values (7.34 to 9.12) for beef sausages to which tomato marc was added than those found out on this research. C^* represents color combination and saturation (Deda *et al.*, 2007) and its behavior should be evaluated; this parameter also decreased during storage time (Table 4). On the first day of storage, it had a value of 26.51 for FT and 21.01 and 22.91 for the other treatments. On the 28th day of storage, the values fluctuated between 20.33 and 22.54. According to Savadkoohi *et al.* (2014) the values ranged from 19.74 to 21.62. Like external color, the product's internal color was evaluated, as a consequence of its connection with the homogeneity of the color of the meat when its processed; it behaved similarly to the external color. The interaction of the main factors (time $\times$ formulation) affected L^* , a^* , b^* , and C^* ($p \leq 0.05$). The values of L^* diminished as the storage days increased, from 59.25 to 62.58 (for all formulation and sampling times). In the case of sausages to which tomato powder were added, the values of this parameter ranged from 67.62 to 63.37, which decrease as storage time increased according

formulaciones y tiempos de muestreo. Para este parámetro en salchichas adicionadas con polvo de tomate los valores van de 67.62 a 63.37, los cuales disminuyen con el tiempo de almacenamiento según Eyiler y Oztan (2011). El valor a^* varió de 10.98 a 18.04 durante el tiempo de muestreo y para todas las formulaciones. Este parámetro aumenta con el tiempo de almacenamiento (Eyiler y Oztan, 2011). El parámetro b^* varió de 16.25 a 20.02 y los valores de C^* fueron mayores que para el color externo y diferentes durante el experimento.

Capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos son bioactivos y se relacionan con el decremento de varios procesos deteriorativos en el cuerpo humano, por lo cual se han desarrollado estudios para evaluar la concentración de este tipo de compuestos en los alimentos. En el Cuadro 5 se muestran diferencias ($p \leq 0.05$) en el contenido de fenoles totales entre tratamientos. El ETO presentó una concentración superior a la observada por Toor y Savage (2005), quienes reportan 29.1, 22.0 y 12.2 mg AG100 g⁻¹ pf, en la evaluación del contenido de compuestos fenólicos en piel, semilla y pulpa de tomate, respectivamente. Los cambios en el contenido de estos compuestos se atribuyen a las variaciones genéticas de los cultivares o bien al estado de madurez del fruto, prácticas agronómicas, el manejo y los tratamientos poscosecha. Los resultados de HCO fueron similares a los mostrados por Aguilera *et al.* (2009), quienes evaluaron el contenido de fenoles totales en las variedades Castellano y Sinaloa de garbanzo; la variedad Sinaloa presentó una alta estabilidad térmica en el contenido de compuestos fenólicos después de diferentes procesos térmicos, contrario a lo observado en la variedad Castellano.

to Eyiler and Oztan (2011). For all formulations, the value of a^* ranged from 10.98 to 18.04 during the sampling period. This parameter increases along with storage time (Eyiler and Oztan, 2011). The b^* parameter varied from 16.25 to 20.02 and the values of C^* were greater than those of the external color and they were different throughout the experiment.

Antioxidant capacity

Phenolic compounds are bioactive and they are connected with the decrease in several deteriorating processes in the human body and, consequently, several evaluations of the concentration of this kind of compounds in food have been carried out. Table 5 shows the differences ($p \leq 0.05$) in the total phenol content between treatments. The concentration of ETO was higher than that reported by Toor and Savage (2005) who recorded 29.1, 22.0, and 12.2 mg AG100 g⁻¹ pf for the phenolic compound content of tomato peel, seed, and pulp, respectively. The changes in the content of these compounds are attributed to the genetic variations of the cultivars or to the ripeness stage of the fruit, agricultural practices, handling, and post-harvest treatments. The results for HCO were similar to the findings of Aguilera *et al.* (2009) who evaluated the total phenol content of the Castellano and Sinaloa chickpea varieties; after several thermal processes, the phenolic compound content of the Sinaloa variety had a high thermal stability, while the Castellano variety had the opposite result. Nowadays, consumers tend to prefer healthy, natural, and nutritional food; therefore, artificial additives are being replaced with natural additives.

The addition of tomato powder to sausage production caused a high total phenolic content in

Cuadro 5. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.
Table 5. Phenolic compound content and antioxidant capacity.

Tratamiento	Fenoles (mg AG g ⁻¹ ps)	DPPH (% inhibición)	TEAC (μ M ET g ⁻¹ ps)
ETO	104.61 a	59.76 a	34.43 a
EHCO	51.00 b	2.71 b	4.09 b
ESA	25.65 c	2.70 b	2.48 b

abc, letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). ETO: extracto de tomate, EHCO: extracto de harina de garbanzo cocido, ESA: extracto de salchicha, ps: peso seco ♦ abc, different letters in each column indicate significant difference ($p \leq 0.05$). ETO: tomato extract; EHCO: cooked chickpea flour extract; ESA: sausage extract; ps: dry weight.

La tendencia de los consumidores está orientada al consumo de alimentos sanos, naturales y nutritivos, por lo que los aditivos artificiales se sustituyen por aditivos naturales.

La adición de polvo de tomate en la elaboración de salchicha causó un alto contenido de fenoles totales en el extracto ESA. Eyiler y Oztan (2011) evaluaron las propiedades químicas y sensoriales de salchichas Frankfurt adicionadas con polvo de tomate como aditivo natural y hubo una disminución en la concentración de nitritos utilizados en el proceso de elaboración, se redujeron los niveles de oxidación, la aceptabilidad del producto por los consumidores fue buena y aumentó la intensidad del color interno y externo de la salchicha.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a que, por su estructura, tiene facilidad para captar radicales libres. Los valores de capacidad antioxidante evaluada mediante las técnicas de DPPH y TEAC mostraron diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, con la misma tendencia en las dos técnicas. El ETO presentó la mayor capacidad antioxidante en inhibición del radical DPPH y de ABTS⁺. Toor y Savage (2005) reportaron concentraciones de 212.6, 114.0 y 81.8 mM ET 100 g⁻¹ pf cuando evaluaron la capacidad antioxidante en piel, semilla y pulpa de tomate, respectivamente, y 408.4 mM ET 100 g⁻¹ pf en total, lo cual es menor a lo encontrado en nuestro estudio. Lo anterior se atribuye al tipo de cultivar, el estado de madurez del fruto, el clima, la estación del año, y la utilización y duración de tratamientos térmicos. Aguilera *et al.* (2009) evaluaron la capacidad antioxidante de garbanzo Castellano y Sinaloa y reportaron concentraciones de 16.0 y 16.5 mM ET g⁻¹ ps, respectivamente, valores superiores a EHCO. La adición de harina de garbanzo y polvo de tomate a la salchicha mostró inhibición elevada de los radicales DPPH y ABTS⁺. Estos resultados son alentadores, pues al utilizar este tipo de materias primas en el proceso de elaboración de las salchichas no solo disminuiría la utilización de aditivos sintéticos, considerados como potencialmente dañinos, sino que además se incluiría fibra y capacidad antioxidante aportada por los compuestos bioactivos.

Microbiológicos

La Figura 1 muestra los resultados de crecimiento microbiano obtenidos durante el experimento y

the ESA extract. Eyiler and Oztan (2011) evaluated the chemical and sensory properties of Frankfurt sausages to which tomato powder had been added as a natural additive; the concentration of the nitrites used during the production process diminished; oxidation levels decreased; consumers acceptance was good; and the intensity of the internal and external color of the sausage increased.

As a result of their structure, phenolic compounds can easily capture free radicals, as part of their antioxidant activity. The values of the antioxidant capacity that was evaluated using the DPPH and TEACH techniques showed differences ($p \leq 0.05$) between treatments; both techniques showed the same trend. ETO's antioxidant capacity had the highest inhibition values for DPPH and ABTS⁺. When they evaluated the antioxidant capacity of tomato peel, seed, and pulp, Toor and Savage (2005) reported 212.6, 114.0, and 81.8 mM ET 100 g⁻¹ pf concentrations, respectively; the overall concentration was 408.4 mM ET 100 g⁻¹, which is lower than the value found out in our study. This result is attributed to the type of cultivar, the ripeness stage of the fruit, the weather, the season, and the use and length of the thermal treatments. Aguilera *et al.* (2009) evaluated the antioxidant capacity of Castellano and Sinaloa chickpea and reported 16.0 and 16.5 mM ET 100 g⁻¹ ps concentrations, respectively; these results are higher than in EHCO. The addition of chickpea flour and tomato powder to the sausages highly increased the inhibition of the DPPH and ABTS⁺ radicals. These are encouraging results, because using this kind of raw materials in sausage production process would not only diminish the use of synthetic additives—which are considered to be potentially harmful—but would also include the fiber and the antioxidant capacity provided by bioactive compounds.

Microbiological

Figure 1 shows the microbial growth results obtained during the experiment: the time $\times$ formulation interaction affected the mesophylls, while only storage time impacted the psychrophiles ($p \leq 0.05$). The growth of mesophylls naturally increased along with storage time and FT showed a greater growth on the first sampling day. For all formulations, the maximum increase of the microbial

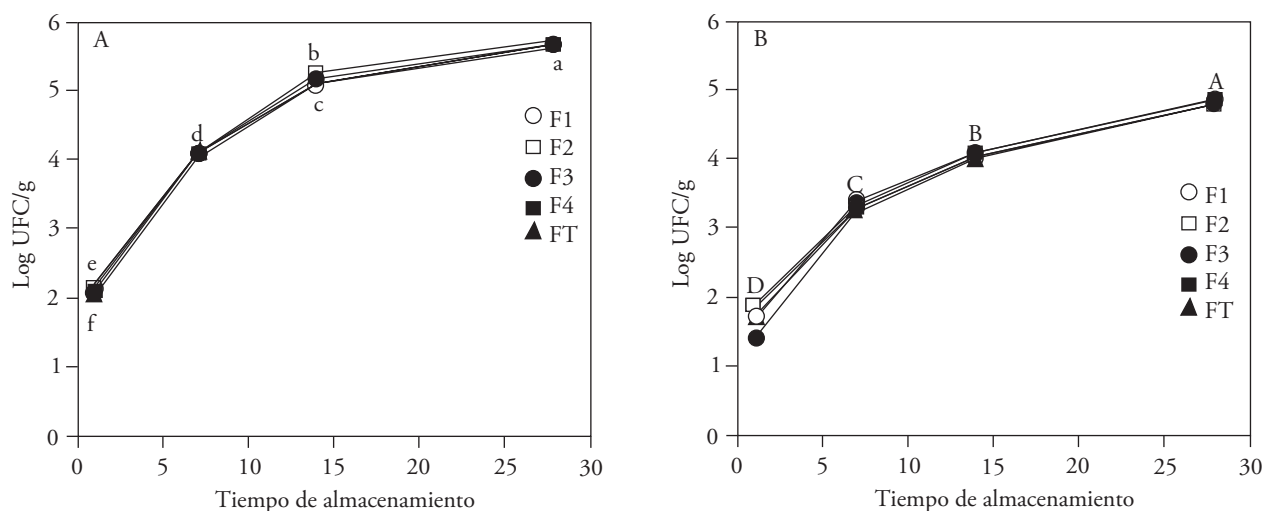


Figura 1. Crecimiento microbiano. A: Mesófilos; B: Psicrófilos.

abcde, letras diferentes en Mesófilos indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). ABCD, letras diferentes en Psicrófilos indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). F1: formulación 1; F2: formulación 2; F3: formulación 3; F4: formulación 4; FT: formulación testigo.

Figure 1. Microbial growth. A: Mesophylls, B: Psychrophiles.

abcde, a different letter in Mesophylls indicates a significant difference ($p \leq 0.05$). ABCD, a different letter in Psychrophiles indicates a significant difference ($p \leq 0.05$). F1: formulation 1; F2: formulation 2; F3: formulation 3; F4: formulation 4; FT: control formulation.

la interacción tiempo por formulación afectó a los mesófilos, mientras que solo el tiempo de almacenamiento cambió a los psicrófilos ($p \leq 0.05$). El crecimiento de los mesófilos aumentó, de manera natural, con el tiempo de almacenamiento y FT tuvo mayor crecimiento el día 1 de muestreo. El máximo incremento en la carga microbiana se observó en los primeros 7 d de almacenamiento para todas las formulaciones. El-Nashi *et al.* (2015) adicionaron polvo de granada, que actúa como antimicrobiano, en salchichas almacenadas en refrigeración durante 12 d y reportaron 2.93 a 3.36 log UFCg⁻¹. Esos resultados son similares a los de nuestra investigación en la cual se usó una cantidad mayor de polvo de tomate y el crecimiento fue menor. Hasta el día 28 las muestras presentaron el crecimiento máximo permitido, por lo cual no son aptas para el consumo humano (NMX-F-065-1984). Respecto a los psicrófilos, el crecimiento fue menor del observado para mesófilos, pero aumentó con respecto al tiempo. El crecimiento de estos microorganismos al inicio del muestreo tuvo variaciones sin diferencias significativas para las cinco formulaciones. Asimismo, el crecimiento microbiano aumentó de manera paulatina, hasta el último día de muestreo. Este comportamiento es similar al observado por Riazi *et al.* (2016), quienes indicaron que el

load was recorded during the first seven days of storage. El-Nashi *et al.* (2015) added pomegranate powder — which acts as an antimicrobial agent — to sausages refrigerated for 12 d and reported 2.93 to 3.36 log UFCg⁻¹. These results are similar to the findings of this study, as part of which a higher quantity of tomato powder was used and less growth was recorded. Until day 28, the samples showed the maximum growth allowed and, therefore, they would not be adequate for human consumption (NMX-F-065-1984). Meanwhile, psychrophiles grew less than mesophylls, but their growth increased in relation to time. The growth of these microorganisms at the beginning of the sampling had non-significant variations with regard to the five formulations. Likewise, there was a gradual increase in microbial growth, until the last sampling day. This behavior is a similar to the one observed by Riazi *et al.* (2016) who pointed out that the growth of psychrophile bacteria increased during their storage in a meat emulsion to which grape marc had been added.

Sensory

Table 6 includes the results of the sensory evaluation. During the external color assessment,

Cuadro 6. El efecto de la adición de polvo de tomate y harina de garbanzo en las características sensoriales de la salchicha.**Table 6. Effect of adding tomato powder and chickpea flour on the sausage's sensory characteristics.**

Formulaciones	Color externo	Sabor	Aceptabilidad general
F1	2.7±0.26b	2.9±0.15a	3.0±0.22b
F2	2.6±0.08b	1.9±0.09b	2.2±0.15c
F3	3.1±0.39ab	3.2±0.87a	3.6±0.10a
F4	3.4±0.19a	1.8±0.07b	2.0±0.22c

abcd, letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). F1: formulación 1; F2: formulación 2; F3: formulación 3; F4: formulación 4 ♦ abcd, a different letter in each column indicates a significant difference ($p \leq 0.05$). F1: formulation 1; F2: formulation 2; F3: formulation 3; F4: formulation 4.

crecimiento de bacterias psicrófilas aumentó durante el almacenamiento en una emulsión cárnica adicionada con orujo de uva.

Sensoriales

En el Cuadro 6, los resultados de la evaluación sensorial mostraron que en la valoración del color externo, F3 y F4, las salchichas con mayor contenido de polvo de tomate tuvieron aceptación más alta, sin diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellas. F1 y F4 presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), lo cual es similar a lo reportado por Eyiler y Oztan (2011). Respecto al sabor, las salchichas con mayor cantidad de harina de trigo y menor de harina de garbanzo, F1 y F4, presentaron aceptación más alta pero no fue significativa ($p > 0.05$). La aceptabilidad general fue menor en F2 y F4, y el valor mayor que representaría la mejor aceptación por los panelistas fue F3, pero las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$).

CONCLUSIONES

La adición TO y HCO modificó la composición proximal y capacidad antioxidante, favoreciendo la reducción en los niveles de oxidación; además, el crecimiento microbiano se redujo y se mantuvieron las características sensoriales, lo cual mejora la aceptabilidad por los consumidores. La capacidad antioxidante de TO adicionado a la salchicha, junto con HCO, lograron resultados alentadores pues al utilizar este tipo de materias primas en el proceso de elaboración de las salchichas disminuiría la utilización de aditivos sintéticos considerados potencialmente dañinos

F3 and F4 —the sausages with the highest tomato powder content— were better accepted, without significant differences ($p > 0.05$) between them. F1 and F4 did have significant differences ($p \leq 0.05$), just like in the research of Eyiler and Oztan (2011). Regarding flavor, sausages with more wheat flour and less chickpea flour (F1 and F4) had a higher preference, but without significant difference ($p > 0.05$). The overall acceptability was lower for F2 and F4, while F3 had a higher value —since they were better accepted by the panelists—, although they did not show significant differences ($p > 0.05$).

CONCLUSIONS

Addition of TO and HCO modified the proximate composition and antioxidant capacity, favoring the reduction of oxidation levels; besides, microbial growth was reduced, while sensory characteristics were preserved, thus improving consumer acceptance. The antioxidant capacity of the TO that was added to the sausages, along with HCO, produced encouraging results since the use of this kind of raw materials in sausage production would diminish the use of synthetic additives —which are considered to be potentially harmful— and include the fiber and antioxidant capacity contributed by the bioactive compounds.

—End of the English version—

---*---

y, además se incluye fibra y capacidad antioxidante aportada por los compuestos bioactivos.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Raymundo, V. G., y J. F. Vélez-Ruiz. 2013. Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). TSIA. 7: 25-34.
- Aguilera, Y., R. M. Esteban, V. Benitez, E. Mollá, and M. A. Martín-Cabrejas. 2009. Starch, functional properties, and microstructural characteristics in chickpea and lentil as affected by thermal processing. J. Agric. Food Chem. 57: 10682-10688.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official Methods of Analysis. International 17th edition. Gaithersburg, MD. USA.
- Beecher, G. R. 1998. Nutrient content of tomatoes and tomato products. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 218: 98-100.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Sci. Technol. 28: 25-30.
- Campagnol, P. C. B., B. A. Dos-Santos, N. N. Terra, and M. A. R. Pollonio. 2012. Lysine, disodium guanylate and disodium inosinate as flavor enhancers in low-sodium fermented sausages. Meat Sci. 91: 334-338.
- COMECARNE (Consejo Mexicano de la Carne). 2016. Compendio Estadístico: Contenidos de Información para la Integración del Sector Cárnico y la Toma de Decisiones de sus Participantes. FONDO PYME, México.
- Deda, M. S., J. G. Bloukas, and G. A. Fista. 2007. Effect of tomato paste and nitrite level on processing and quality characteristics of frankfurters. Meat Sci. 76: 501-508.
- El-Nashi, H. B., A. F. A. K. A. Fattah, N. R. A. Karim, A. Fattah, N. R. A. Rahman, and M. M. A. El-Razik. 2015. Quality characteristics of beef sausage containing pomegranate peels during refrigerated storage. Ann. Agric. Sci. 60: 403-412.
- Eyiler, E., and A. Oztan. 2011. Production of frankfurters with tomato powder as a natural additive. LWT - Food Sci. Technol. 44: 307-311.
- FIRA. 2017a. Panorama Agroalimentario. Tomate Rojo. Dirección de Investigación y evaluación Económica y Sectorial. pp: 18.
- FIRA. 2017b. Panorama Agroalimentario. Carne de Bovino. Dirección de Investigación y evaluación Económica y Sectorial. pp: 03.
- FIRA. 2017c. Panorama Agroalimentario. Carne de Bovino. Dirección de Investigación y evaluación Económica y Sectorial. pp: 02.
- Hayes, J. E., I. Canonico, and P. Allen. 2013. Effects of organic tomato pulp powder and nitrite level on the physicochemical, textural and sensory properties of pork luncheon roll. Meat Sci. 95: 755-762.
- Jukanti, A. K., P. M. Gaur, C. L. L. Gowda, and R. N. Chibbar. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. Br. J. Nutr. 108 (S1): S11-S26.
- Kim, H. W., K. E. Hwang, D.H. Song, Y. J. Kim, Y.K. Ham, Y. B. Lim, T. J. Jeong, Y. S. Choi, and C. J. Kim. 2015. Wheat fiber colored with a safflower (*Carthamus tinctorius* L.) red pigment as a natural colorant and antioxidant in cooked sausages. LWT- Food Sci. Technol. 64: 350-355.
- Liu F., X. Cao, H. Wang, and X. Liao. 2010. Changes of tomato powder qualities during storage. Powder Technol. 204: 159-166.
- Menegas L. Z., T. C. Pimentel, S. Garcia, and S. H. Prudencio. 2013. Dry-fermented chicken sausage produced with inulin and corn oil: Physicochemical, microbiological, and textural characteristics and acceptability during storage. Meat Sci. 93: 501-506.
- NMX-F-065-1984. Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Fods. Sausage. Specifications. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Østerlie, M., and J. Lerfall. 2005. Lycopene from tomato products added minced meat: Effect on storage quality and colour. Food Res. Int. 38: 925-929.
- Pellegrini, N., R. Re, Y. Min, and C. Rice-Evans. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. Methods Enzymol. 299: 379-389.
- Praderes, G., A. García, y E. Pacheco. 2009. Caracterización físico-química y propiedades funcionales de harina de quinchocho (*Cajanus cajan*) obtenida por secado en doble tambor rotatorio. Rev. Fac. Agron. (UCV) 35: 79-84.
- Riazi, F., F. Zeynali, E. Hoseini, H. Behmadi, and S. Savadkoochi. 2016. Oxidation phenomena and color properties of grape pomace on nitrite-reduced meat emulsion systems. Meat Sci. 121: 350-358.
- Rizk, E. M., A. T. El-Kady, and A. R. El-Bialy. 2014. Characterization of carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. Ann. Agri. Sci. 59: 53-61.
- Savadkoochi, S., H. Hoogenkamp, K. Shamsi, and A. Farahnaky. 2014. Color, sensory and textural attributes of beef frankfurter, beef ham and meat-free sausage containing tomato pomace. Meat Sci. 97: 410-418.
- Shivashankara, K. S, S. Isobe, M. I. Al-Haq, M. Takenaka, and T. Shiina. 2004. Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment. J. Agric. Food Chem. 52: 1281-1286.
- SIAP-SAGARPA. 2016. Atlas Agroalimentario. Jitomate. México. pp: 92.
- Singleton, V. L., and J. A. Rossi Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 16: 144-158.
- Sousa, S. C., S. P. Frago, C. R. A. Penna, N. M. O. Arcanjo, F. A. P. Silva, V. C. S. Ferreira, M. D. S. Barreto, and I. B. S. Araújo. 2016. Quality parameters of frankfurter-type sausages with partial replacement of fat by hydrolyzed collagen. LWT-J. Food Sci. Technol. 76: 320-325.
- Sreerama, Y. N., V. B. Sashikala, V. M. Pratapa, and V. Singh. 2012. Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. Food Chem. 131: 462-468.
- Thongram, S., B. Tanwar, A. Chauhan, and V. Kumar. 2016. Physicochemical and organoleptic properties of cookies incorporated with legume flours. Cogent Food & Agric. 2:1, DOI: 10.1080/23311932.2016.1172389.
- Toor, R. K., and G. P. Savage. 2005. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. Food Res. Int. 38: 487-494.

DIFERENCIACIÓN DEL SEXO DEL GORRIÓN DE BAIRD (*Centronyx bairdii*) POR MEDIO DE REDES NEURONALES ARTIFICIALES Y DATOS MORFOMÉTRICOS

SEX DIFFERENTIATION OF THE BAIRD SPARROW (*Centronyx bairdii*) THROUGH ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS AND MORPHOMETRIC DATA

Martin E. **Pereda-Solís**¹, Francisco **García-Fernández**², Daniel **Sierra-Franco**¹,
José H. **Martínez-Guerrero**^{1*}, Irene **Ruvalcaba-Ortega**³, Erin **Hennegan-Strasser**⁴

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango. Km 11.5, Carretera Durango-Mezquital, 34000, Durango, Durango, México. (mepereda@ujed.mx), (dan_1015@hotmail.com), (che_hugo1@hotmail.com). ²E.T.S. de Ingeniería de Montes, Forestal y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid, España. (francisco.garcia@upm.es). ³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Avenida Universidad s/n, Ciudad Universitaria, 66455. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. (irene.ruvalcabart@uanl.edu.mx). ⁴Bird Conservancy of the Rockies, Fort Collins, Colorado, USA. (erin.strasser@birdconservancy.org)

RESUMEN

Las estimaciones indican que 148 especies de aves en Norteamérica enfrentan amenaza alta o severa, pues sus poblaciones están disminuyendo. El gorrión de Baird (*Centronyx bairdii*) es una de las especies con declive poblacional, presenta plumaje monomórfico y su sexo no se puede determinar a simple vista. La determinación del sexo de las aves permite conocer su comportamiento social y proporción en la dinámica de sus poblaciones. Un método de clasificación es el de redes neuronales artificiales y se ha utilizado en diversos campos, como la clasificación de plantas y semillas y la diferenciación de especies productoras de madera. En el ámbito de la ornitología se ha utilizado poco. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar una red neuronal artificial para diferenciar el sexo de los gorriónes de la especie *Centronyx bairdii*, con datos zoométricos obtenidos en campo. La hipótesis fue que las redes neuronales artificiales pueden predecir el sexo de las aves de la especie *Centronyx bairdii*. La red neuronal construida a partir de los datos de peso, cuerda alar, longitud de cola, culmen, ancho del pico y profundidad del pico de 111 aves, permitió diferenciar el sexo de la especie con grado de certeza de 92.3%.

Palabras clave: *Centronyx bairdii*, redes neuronales artificiales, zoometría, plumaje monomórfico, método de sexado.

ABSTRACT

Estimates indicate that 148 species of birds in North America face a high or severe threat, because their populations are decreasing. The Baird sparrow (*Centronyx bairdii*) is one of the species with population decline, it presents monomorphic plumage and sex cannot be determined at plain sight. Sex determination in birds allows understanding their social behavior and proportion regarding population dynamics. Artificial neural networks are used as a classification method which has been used in various fields, such as plant and seed classification, and species differentiation of timber species. In the scope of ornithology, it has been scarcely used. Therefore, the objective of this study was to develop an artificial neural network to differentiate the sex of sparrows of the species *Centronyx bairdii*, with zoometric data obtained in the field. The hypothesis was that artificial neural networks can predict the sex of the birds of the species *Centronyx bairdii*. The neural network built from the data of weight, wing chord, tail length, culmen, width of the beak and depth of the beak of 111 birds, allowed differentiating the sex of the species with a degree of certainty of 92.3%.

Key words: *Centronyx bairdii*, artificial neural networks, zoometry, monomorphic plumage, sex determination method.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 353-365. 2020.

INTRODUCCIÓN

Las estimaciones indican que en Norteamérica 148 especies de aves enfrentan amenaza alta o severa, ya que sus poblaciones están disminuyendo. Esta situación desde 1970 es grave en particular en el caso de las aves de pastizal, porque la disminución en sus poblaciones continentales se ha estimado en hasta 70% (ICOAN, 2016). El gorrión de Baird (*Centronyx bairdii*) es un ave de pastizal nativa del sur de Canadá y norte de EUA, que en invierno emigra a regiones del Desierto Chihuahuense, como Arizona, Nuevo México y Texas (EUA), y Chihuahua, Sonora, Durango y Coahuila (México) (CEC, 2013). Esta especie presenta declive poblacional de 2.8% (Sauer *et al.*, 2017).

Una característica física de esta especie es que posee plumaje monomórfico y su sexo no se puede determinar a través de su color u otras características observables a simple vista, fuera de la temporada reproductiva. Esta situación es importante porque la determinación del sexo de las aves permite conocer la proporción de machos y hembras (PMH) de una población la cual es una variable fundamental para estudios demográficos. Desde el punto de vista biológico la PMH representa una función importante para conocer la competencia durante el apareamiento, sistemas de apareamiento y cuidado parental de los pollos (McNamara *et al.*, 2000). Las variaciones de la PMH también proporcionan información de utilidad para comprender procesos evolutivos que afectan el comportamiento social de aves silvestres, así como sus implicaciones en la dinámica poblacional, salud y conservación de la biodiversidad (Székely *et al.*, 2014). Por lo tanto, la diferenciación del sexo en esta especie es un punto de suma importancia.

Entre las técnicas desarrolladas para determinar el sexo de especies de aves monomórficas, están la disección exploratoria (Risser, 1971), el uso de la bioacústica para el análisis del canto y llamados (Bourgeois *et al.*, 2007), estudios etológicos (Flux e Innes, 2001) y los modelos predictivos como funciones discriminantes (Dechaume-Moncharmont *et al.*, 2011); también se usan técnicas basadas en el análisis de ADN (Fridolfsson y Ellegren, 1999). Sin embargo, las técnicas moleculares requieren entrenamiento, permisos para la recolecta de sangre o tejidos y son más costosas que las técnicas de campo.

Las redes neuronales artificiales (RNA) son una herramienta matemática usada como elemento de

INTRODUCTION

Estimates indicate that in North America there are 148 species of birds facing a high or severe threat, since their populations are decreasing. This situation since 1970 is serious particularly in the case of grassland birds, since the decrease in their continental populations has been estimated in up to 70% (ICOAN, 2016). The Baird sparrow (*Centronyx bairdii*) is a grassland bird from southern Canada and northern USA, which migrates during Winter to regions of the Chihuahuan Desert, such as Arizona, New Mexico and Texas (USA), and Chihuahua, Sonora, Durango and Coahuila (Mexico) (CEC, 2013). This species presents a population decline of 2.8% (Sauer *et al.*, 2017).

A physical characteristic of this species is that it has monomorphic plumage and its sex cannot be determined through its color or other characteristics that are observable at plain sight, but on the reproductive season. This situation is important because sex determination of birds allows knowing the proportion of males and females (PMF) of a population which is a fundamental variable for demographic studies. From the biological point of view, the PMF represents an important function to understand competition during mating, mating systems and parental care of chicks (McNamara *et al.*, 2000). The variations in PMF also provide useful information to understand evolutionary processes that affect social behavior of wild birds, as well as their implications in the population dynamics, health and conservation of biodiversity (Székely *et al.*, 2014). Therefore, sex determination in this species is a very important point.

Among the techniques developed to determine the sex of monomorphic bird species there are: exploratory dissection (Risser, 1971), use of bioacoustics for the analysis of songs and calls (Bourgeois *et al.*, 2007), ethologic studies (Flux and Innes, 2001), and predictive models such as discriminant functions (Dechaume-Moncharmont *et al.*, 2011); techniques based on DNA analysis are also used (Fridolfsson and Ellegren, 1999). However, molecular techniques require training, permissions for the collection of blood or tissues, and they are more expensive than field techniques.

Artificial neural networks (ANNs) are a mathematical tool used as an element of modelling and classification that is characterized by its great

modelización y clasificación que se caracterizan por su gran capacidad para el tratamiento de grandes conjuntos de datos (Pérez y Martín, 2003). Ellas se basan en sistemas neuronales biológicos que imitan su capacidad de aprender y llegar a una solución a partir de una serie de ejemplos, para luego aplicar dicho conocimiento y producir un resultado coherente frente a datos de entrada desconocidos (Pérez y Martín, 2003). Como método de clasificación las RNA se usan de manera amplia en diversos campos con resultados satisfactorios. Tanto para clasificación de plantas y semillas, y diferenciación de especies leñosas (Burks *et al.*, 2005; por García-Esteban *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2017), como para la clasificación de defectos en la madera (Ramírez y Chacón, 2005).

Sin embargo, en el ámbito de la ornitología y disciplinas similares no se utilizan mucho y, cuando ocurre, ha sido para distinguir el canto entre especies (Juang y Chen, 2007), y en pocas ocasiones para diferenciar el sexo (Jennings *et al.*, 2008). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar una red neuronal artificial para la diferenciación del sexo de los gorriónes de la especie *C. bairdii*, migratoria de Norteamérica con plumaje monomórfico en ambos sexos, a partir de datos zoométricos tomados en campo. La hipótesis fue que las redes neuronales artificiales pueden predecir con precisión relativa el sexo de las aves de la especie *Centronyx bairdii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La recolecta de aves se realizó durante el invierno 2013-2014 en dos sitios del Desierto Chihuahuense. El primero en el Rancho “Santa Teresa” ubicado en el noroeste del estado de Durango en la región de Cuchillas de la Zarca, y el segundo en el Rancho “El Uno” localizado al noroeste del municipio de Janos, Chihuahua, México (Figura 1).

Las aves capturadas fueron 111 de la especie *C. bairdii* en ambas áreas de estudio; 82 en el Rancho “Santa Teresa” y 29 en “El Uno”. La captura de aves (permiso de recolecta de SEMARNAT SPGA/DGVS/13360/14) se realizó con el uso de cuatro redes de niebla fabricadas con poliéster negro modelo KTX de Avian Research Supplies, AFO, de 36 mm de malla, 2.6 m de alto por 12 m de largo, y con la participación de 6 a 25 personas se utilizó el método de arreo de las aves hacia las redes (Panjabi y Beyer, 2010).

En cada ave capturada se colocó un anillo metálico #1 del United States Geological Survey (USGS, Permiso Federal 22415)

capacity for the treatment of large sets of data (Pérez and Martín, 2003). They are based on biological neural systems that imitate their capacity to learn and reach a solution from a series of examples, applying this knowledge later to produce a coherent result facing unknown input data (Pérez and Martín, 2003). As a classification method, ANNs are used widely in different fields with satisfactory results. Both for plant and seed classification, and for differentiation of woody species (Burks *et al.*, 2005; García-Esteban *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2017), and defects classification in wood (Ramírez and Chacón, 2005).

However, in the sphere of ornithology and similar disciplines ANNs are not frequently used and, when it happens, it has been to distinguish the song among species (Juang and Chen, 2007), and sometimes to differentiate sex (Jennings *et al.*, 2008). Therefore, the objective of this study was to develop an artificial neural network for sex differentiation of sparrows of the species *C. bairdii*, migratory from North America with monomorphic plumage in both sexes, from zoometric data measured in the field. The hypothesis was that artificial neural networks can predict with relative accuracy the sex of birds of the species *Centronyx bairdii*.

MATERIALS AND METHODS

Bird collection was performed during winter 2013-2014 in two sites of the Chihuahuan Desert. The first in the Rancho “Santa Teresa” located in the northwest of the state of Durango, in the region of Cuchillas de la Zarca, and the second in Rancho “El Uno” located in the northwest of the municipality of Janos, Chihuahua, Mexico (Figure 1).

The birds captured were 111 of the species *C. bairdii* in both study areas: 82 in Rancho “Santa Teresa” and 29 in “El Uno”. Bird capture (collection permit from SEMARNAT SPGA/DGVS/13360/14) was performed with the use of four fog nets made with black polyester model KTX from Avian Research Supplies, AFO, of 36 mm mesh, 2.6 m high by 12 m long, and with the participation of 6 to 25 people the bird-driving method was used towards the nets (Panjabi and Beyer, 2010).

In each bird captured, a #1 metallic ring of the United States Geological Survey (USGS, Federal Permit 22415) was placed, and morphometric measures were taken (Figure 2) as follows: weight (g), wing chord (mm), tail length (mm), culmen (mm), beak width (mm) and beak depth (mm). A metallic ruler of 150 mm WING15ECO from AVINET® was used to measure the wing chord and the tail length, to measure the peak a Vernier

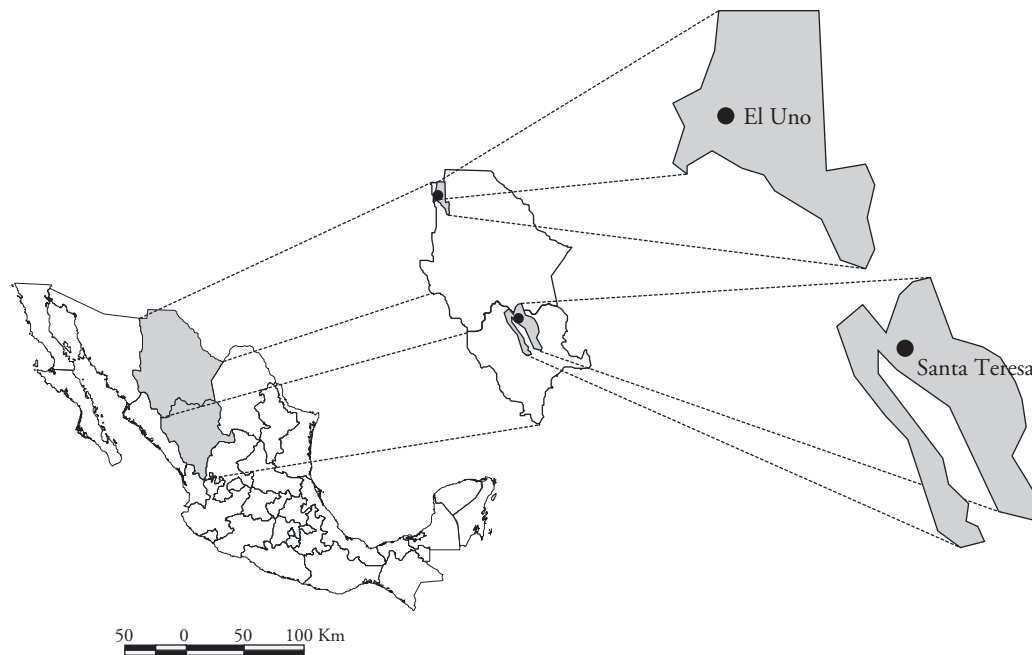


Figura 1. Localización de los sitios de colecta de las aves: Rancho “Santa Teresa” y Rancho “El Uno”.
Figure 1. Collection sites of birds: Rancho “Santa Teresa” and Rancho “El Uno”.

y se tomaron las medidas morfométricas (Figura 2) de peso (g), cuerda alar (mm), longitud de cola (mm), culmen (mm), ancho del pico (mm) y profundidad del pico (mm). Para medir la cuerda alar y longitud de cola se utilizó una regla metálica para ala de 150 mm WING15ECO de AVINET®, para las medidas del pico se usó un calibrador vernier modelo SPI 150 mm de AVINET® y para determinar el peso de las aves se utilizó una báscula OHAUS® (Mod. CS 2000, capacidad de 2000g y un 0.1g de precisión). Una vez registrados los datos, los individuos se liberaron en el mismo lugar de captura.

Las características morfométricas como la cuerda alar, longitud de la cola y medidas del pico son de mucha utilidad para identificar, estimar la edad y determinar el sexo de las aves (Pyle, 1997). La cuerda alar es la medida más simple de tomar, puede ser muy útil para representar el tamaño de un ave, y algunos autores recomiendan su inclusión en algunos modelos para estimar la condición corporal de las aves (Delong y Gessaman, 2001). El método usado en este estudio es el denominado cuerda alar sin aplastar que es la medida más utilizada y con resultados más consistentes (Pyle, 1997). Para su medición en un ave se usa una regla delgada con un tope perpendicular donde se marca el inicio de la escala. Esta regla se inserta bajo el ala (Figura 2A) y se hace la medición hasta donde termina la pluma primaria más externa (p9).

La longitud de la cola también es una característica de utilidad para la identificación, el sexado y la estimación de la edad

caliper model SPI 150 mm from AVINET®, and to determine the bird weight an OHAUS® scale (Mod. CS 2000 was used, with capacity of 2000g and 0.1g of accuracy). Once the data were recorded, the individuals were freed in the same place of capture.

The morphometric characteristics like wing chord, tail length and beak measurements are very useful to identify, estimate age, and determine the sex of birds (Pyle, 1997). The wing chord is the simplest measurement to take, it can be quite useful to represent the size of a bird, and some authors recommend its inclusion in some models to estimate the body condition of birds (Delong and Gessaman, 2001). The method used in this study is called wing chord without flattening, which is the most frequently used measurement and with more consistent results (Pyle, 1997). A thin ruler with a right-angled piece at the beginning of the scale was used to measure this length on each bird. This ruler was inserted under the wing (Figure 2A) and the measurement is taken to where it most external primary feather ends (p9).

The tail length is also a useful characteristic for the identification, sex determination and estimation of passerine birds. This measurement is defined as the distance between the tip of the longest flight feather to the point of insertion of the two central flight feathers (Figure 2B). A thin ruler is used for this measurement, which is placed perpendicularly to the tail and is inserted between the two central flight feathers, and this way the ruler must be touching the point of insertion of the feathers

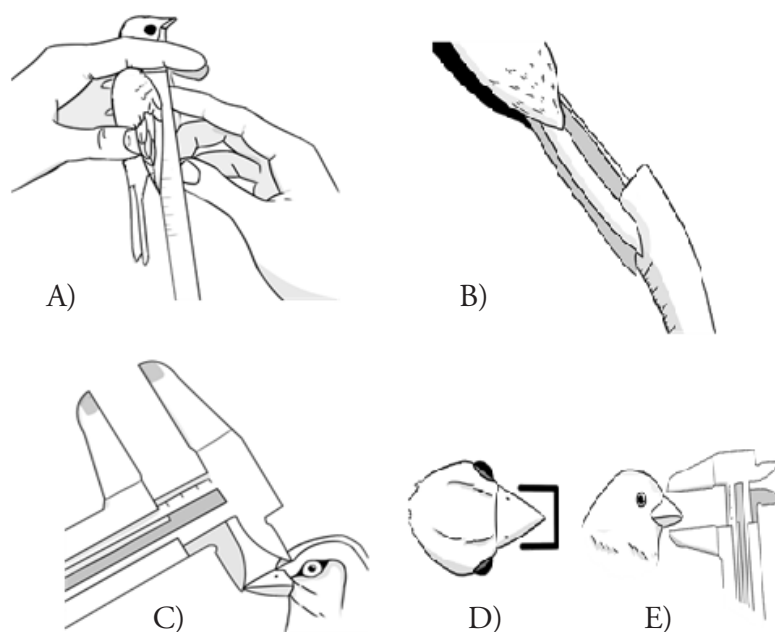


Figura 2. Proceso de medición de las características morfométricas de las aves. A) cuerda alar, B) longitud de la cola, C) culmen, D) ancho del pico y E) profundidad del pico.

Figure 2. Measuring process of morphometric characteristics of birds. A) wing chord, B) tail length, C) culmen, D) beak width and E) beak depth.

de las aves passeriformes. Esta medida se define como la distancia entre la punta de la pluma rectriz más larga hasta el punto de inserción de las dos plumas rectrices centrales (Figura 2B). Para esta medición se utiliza una regla delgada que se coloca de manera perpendicular a la cola y se inserta entre las dos plumas rectrices centrales, de esta forma la regla debe mantenerse tocando el punto de inserción de las plumas para tomar la lectura sobre la regla. También es importante asegurarse que las plumas rectrices más largas no estén ausentes, rotas o en periodo de muda. Existen diferentes métodos para medir las características del pico de las aves.

El culmen se define como la distancia entre la base donde nace el pico hasta su punta. Debido a la curvatura de la mandíbula superior en algunas especies, para esta medición se recomienda usar un calibrador Vernier (Figura 2C). También es importante asegurarse que la punta del pico no esté rota o deforme. Las mediciones de la profundidad y ancho del pico se toman en el extremo anterior de las fosas nasales, también se usa un calibrador Vernier. Para la profundidad del pico se coloca la punta externa del vernier sobre el culmen en la parte anterior de las fosas nasales y la punta interna del vernier debajo de la mandíbula inferior de tal manera que el vernier quede orientando en un ángulo de 90°

to take the reading on the ruler. It is also important to make sure that the longest flight feathers are not missing, broken or in molting period. There are different methods to measure the characteristics of the bird beaks.

The culmen is defined as the distance from the base where the beak starts up to its tip. Because of the curvature in the superior jaw in some species, a caliper is recommended for this measurement (Figure 2C). It is also important to make sure that the tip of the beak is not broken or deformed. The measurements of the depth and width of the beak are taken in the anterior end of the nasal cavities, a caliper is also used. For the beak depth the external point of the caliper is placed on the culmen on the anterior part of the nasal cavities and the internal point of the caliper under the inferior jaw so that the caliper is placed at an angle of 90° in relation to the axis of the beak (Figure 2E); for this measurement it is important that the beak is completely closed. Beak must be opened to measure beak width; the caliper is also opened until the point where it touches the anterior part of the nasal cavities (Figure 2D).

Bird weight is a characteristic variable due to the condition of individuals, stomach contents, season or stage of the life cycle for each species in particular. Therefore, Pyle (1997) suggested

en relación con el eje del pico (Figura 2E), para esta medición es importante que el pico esté completamente cerrado. Para medir el ancho del pico se abre y desplaza el vernier hasta el punto donde se detiene con la parte anterior de las fosas nasales (Figura 2D).

El peso de las aves es una característica variable debido a la condición de los individuos, contenidos estomacales, temporada o etapa del ciclo de vida de cada especie en particular. Por esta razón Pyle (1997) sugirió que esta medida no es relevante para determinar la edad, y sexo de las aves. Sin embargo, Sierra-Franco (2018)⁵ la usó en funciones discriminantes y análisis multivariados para predecir con cierto grado de precisión (80-90%) el sexo en las especies *C. bairdii* y *A. savanarum*.

Para realizar el sexado molecular se recolectó una pluma por individuo (cuarta rectriz derecha), la cual se almacenó en un sobre de papel a temperatura ambiente, y después las plumas se enviaron a la Universidad Autónoma de Nuevo León para su análisis. El ADN genómico se obtuvo utilizando el KIT “DNAeasyTissue Kit” con el protocolo de la casa comercial (Qiagen, Valencia, CA, USA). Para el sexado molecular se utilizaron los iniciadores 2550F/2718R (Fridolfsson y Ellegren, 1999).

Redes neuronales artificiales

Las redes neuronales se definen como un sistema computacional que imita las capacidades computacionales de los sistemas biológicos y utiliza un gran número de elementos (funciones matemáticas) interconectados y dispuestos en diferentes capas. El tipo de red se determina por el tipo de función que se utiliza, así como su disposición en las diferentes capas. Para este estudio se eligió una red neuronal tipo perceptrón multicapa. Su carácter como “aproximador de funciones” universal (Hornik, *et al.*, 1989) le permite modelar relaciones no lineales complejas y extraer conocimiento a partir de una serie de ejemplos, para luego aplicarlo a situaciones desconocidas.

El perceptrón multicapa se compone de tres capas conectadas hacia adelante, una capa de entrada, una capa oculta y una capa de salida. Durante el proceso de desarrollo (entrenamiento), la capa de entrada recibe los valores iniciales de las variables, la capa de salida muestra los resultados de la red, y la capa oculta realiza las operaciones destinadas a obtener la salida (Figura 3). Dichas capas se forman por *funciones de transferencia* interconectadas entre sí, las cuales son capaces de autoajustar la ponderación de sus conexiones a partir de unos datos de entrada y salida conocidos.

La capa de entrada tiene tantas neuronas como variables de entrada existen y la de salida tantas como salidas produce la red. Sin embargo, no hay una regla definida para conocer cuántas

that this measurement is not relevant to determine age and sex of the birds. However, Sierra-Franco (2018)⁵ used it in discriminant functions and multivariate analyses to predict with a certain degree of accuracy (80-90%) the sex of species *C. bairdii* and *A. savanarum*.

Molecular sex determination was performed with one feather collected per individual (fourth right flight feather), which was stored in a paper envelope at room temperature, and then the feathers were sent to the Universidad Autónoma de Nuevo León for their analysis. Genomic DNA was obtained using the “DNAeasyTissue Kit” with the protocol of the commercial house (Qiagen, Valencia, CA, USA). For the molecular sex determination, the primers 2550F/2718R were used (Fridolfsson and Ellegren, 1999).

Artificial neural networks

Neural networks are defined as a computational system that imitates the computational capacities of biological systems using a large number of interconnected elements (mathematical functions) and arranged in different layers. The type of network is determined by the type of function that it uses, as well as its layout in the different layers. For this study, a neural network of multilayer perceptron type was used. Its character as a universal function approximator (Hornik, *et al.*, 1989) allows it to model complex non-linear relationships, extracting knowledge from a series of examples to later apply it to unknown situations.

The multilayer perceptron is made up of three layers connected straightforward, an input layer, a hidden layer, and an output layer. During the process of development (training), the input layer receives the initial values of the variables, the output layer shows the results from the network, and the hidden layer performs the operations destined to obtain the output (Figure 3). These layers are formed by interconnected *transference functions*, which are capable of self-adjusting the weight of their connections from some known input and output data.

The input layer has as many neurons as there are input variables, and the output layer as many as the outputs produced by the network. However, there is no defined rule to understand how many sublayers should be in the hidden layer or how many neurons should compose it, and therefore the only way of obtaining it is through a trial-and-error process (Isasi and Galván, 2004). Even as there is a series of rules focused on optimizing ANN architecture, it should be always borne in mind, that an excessive number of neurons and layers can originate no extreme improvement in the generalization process but do slow down the training (Sha, 2007).

⁵Sierra-Franco, D. FMVZ UJED (dan_1015@hotmail.com).

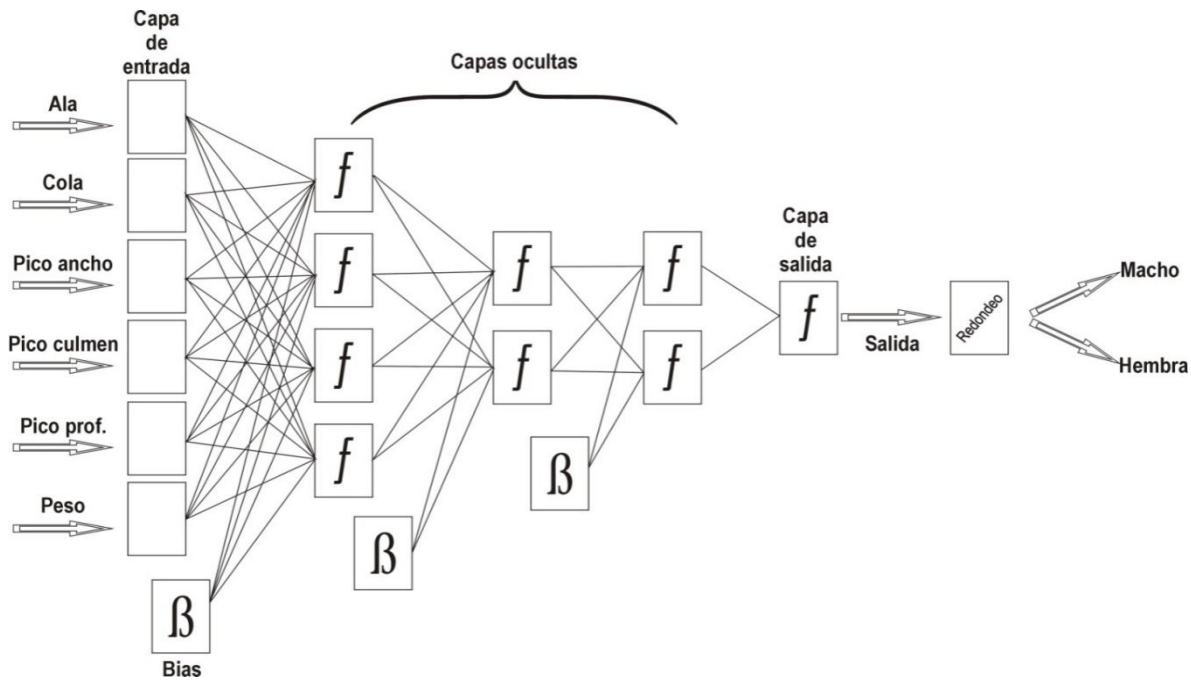


Figura 3. Esquema de la red neuronal obtenida para determinar el sexo del gorrión de Baird, mediante sus datos morfométricos.
Figure 3. Scheme of the neural network obtained to determine the sex of Baird sparrows, through their morphometric data.

subcapas debe haber en la capa oculta ni cuantas neuronas la deben componer, por ello la única forma de obtenerla es por medio de un proceso de ensayo y-error (Isasi y Galván, 2004). Aunque sí existen una serie de reglas enfocadas en optimizar la arquitectura de la RNA, siempre se debe tener en cuenta que un número excesivo de neuronas y capas puede no mejorar en exceso el proceso de generalización y sí ralentizar mucho el entrenamiento (Sha, 2007).

Antes del diseño de la red se realizó un análisis de componentes principales del vector de entrada, seguido de una transformación factorial para un nivel de explicación del 98% de la variabilidad, con el fin de determinar si existe algún tipo de correlación entre las variables de entrada, para reducir el tiempo de entrenamiento y mejorar los resultados de la red (Demuth *et al.*, 2002). Como criterio para la selección de las variables se tomó que su contribución a la variabilidad de la muestra fuera superior al 2% (Demuth *et al.*, 2002). Después se realizó un procesamiento preliminar de los datos con el fin de adecuarlos a la función de transferencia utilizada y mejorar la eficiencia de la red (Demuth *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2007).

$$X' = \frac{X - X_m}{s}$$

Before the network's design, a principal components analysis of the input vector was performed, followed by a factorial transformation in order to explain the 98% of variability, with the aim to determine whether there was any type of correlation among the input variables, to reduce the training time and improving network results (Demuth *et al.*, 2002). As a criterion for the selection of variables, it was considered that their contribution to the variability of the sample was higher than 2% (Demuth *et al.*, 2002). Then, a preliminary data processing was carried out with the aim of adapting them to the chosen transference function and to improve the efficiency of the network (Demuth *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2007).

$$X' = \frac{X - X_m}{s}$$

where X' : value after vector X normalization; X_m : vector X mean, S : vector X typical deviation.

The hyperbolic sigmoid tangent (*tansig*) was used as transference function, which is a variant of the hyperbolic tangent to obtain a faster output which is mathematically equivalent (Demuth *et al.*, 2002).

donde X' : valor después de la normalización del vector X ; X_m : media del vector X ; S : desviación típica del vector X .

Como función de transferencia se utilizó la tangente hiperbólica sigmoidea (*tansig*), la cual es una variante de la tangente hiperbólica por la cual se obtiene una salida más rápida y es matemáticamente equivalente (Demuth *et al.*, 2002).

$$f(x) = \frac{2}{1 + e^{(-2x)}} - 1$$

donde (x) : valor de salida de la neurona; x : valor de entrada de la neurona.

La salida de esta función es un número real comprendido en el intervalo (0,1), el cual se redondeó a cero para el caso de las hembras, y a uno para los machos. El algoritmo de retropropagación resiliente se utilizó en la etapa de entrenamiento (Demuth *et al.*, 2002), el cual mejora los resultados del aprendizaje en el caso de funciones de transferencia sigmoidea (Demuth *et al.*, 2002). Como método de entrenamiento de la red se utilizó el aprendizaje supervisado (Pérez y Martín, 2003; Isasi y Galván, 2004). En este método se presentan a la red tanto el vector de entrada como su solución y, por medio de ciclos sucesivos de aprendizaje, la red va obteniendo los valores de las conexiones internas.

Uno de los problemas principales que se presenta durante el proceso de entrenamiento es el sobreentrenamiento, el cual es un síntoma claro de que la red ha perdido capacidad de generalización y, por lo tanto, de confiabilidad (Isasi y Galván, 2004). Para evitarlo, el conjunto total de datos se dividió de manera aleatoria y sin repetición en tres subconjuntos: el subconjunto de entrenamiento (60% de los datos), el de validación (20% de los datos) y el de comprobación (20% de los datos).

El sobreentrenamiento se manifiesta en el momento en que el error en el conjunto de validación comienza a aumentar mientras que en el conjunto de entrenamiento sigue descendiendo. Por eso, durante el proceso de entrenamiento se comprobó cada 50 ciclos la evolución del error tanto en el conjunto de entrenamiento, como en el de validación.

El tercer subconjunto se utilizó para evaluar el grado de confiabilidad de la red, porque se presentan a la red solo los valores de entrada del conjunto y la salida se compara con el valor real (Isasi y Galván, 2004). Para evaluar los resultados finales se utilizó la fórmula del grado de confianza o porcentaje de precisión (García-Esteban *et al.*, 2009).

$$GC(\%) = 100 \cdot \frac{n_{corr}}{n_{tot}}$$

$$f(x) = \frac{2}{1 + e^{(-2x)}} - 1$$

where (x) : output value of the neuron; x : input value of the neuron.

The output of this function is a real number comprised in the interval (0,1), which was rounded to zero for the case of females, and one for males. The algorithm of resilient retro-propagation was used in the training stage (Demuth *et al.*, 2002), which improves the learning results for the case of functions of sigmoid transference (Demuth *et al.*, 2002). Supervised learning was used as training method of the network (Pérez and Martín, 2003; Isasi and Galván, 2004). In this method both the input vector and its solution are presented to the network and, through successive learning cycles, the network gradually obtains the values of internal connections.

One of the main problems that comes up during the training process is over-training, which is a clear symptom that the network has lost the capacity of generalization and, therefore, of reliability (Isasi and Galván, 2004). In order to avoid it, the total set of data was divided randomly and without repetition in three subsets: the training subset (60% of data), the validation subset (20% of data), and the verification subset (20% of data).

Overtraining is manifested in the moment when the error in the validation subset begins to increase while in the training subset it continues to descend. Therefore, during the training process, the evolution of the error was tested every 50 cycles both in the training subset and in the validation subset.

The third subset was used to evaluate the degree of reliability of the network, because only the input values of the set are presented to the network and the output is compared with the real value (Isasi and Galván, 2004). In order to evaluate the final results, the formula of the degree of confidence or percentage of accuracy was used (García-Esteban *et al.*, 2009).

$$GC(\%) = 100 \cdot \frac{n_{corr}}{n_{tot}}$$

where GC : degree of confidence; n_{corr} : number of successes; n_{tot} : total number of data.

A specific software was developed for the construction of the neural network in the language of MATLAB® Ver. 7.5.0. (R2007b), with the Neural Network Toolbox® ver. 5.1., and for all the statistical calculations the application Statistics Toolbox® ver. 6.1 was used.

donde GC : grado de confianza; n_{corr} : número de aciertos; n_{tot} : número total de datos.

Para la construcción de la red neuronal se desarrolló un programa específico en el lenguaje de MATLAB® Ver. 7.5.0. (R2007b), con la Neural Network Toolbox® ver. 5.1. y para todos los cálculos estadísticos se utilizó la aplicación Statistics Toolbox® ver. 6.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Zoometría

En los 111 individuos del gorrión de Baird a los cuales se tomaron variables zoométricas, por medio del sexado molecular se identificaron 52 hembras y 59 machos (Cuadro 1). Al agrupar los datos morfométricos por sexo de los individuos, los promedios de las mediciones de ala, cola, profundidad del pico y peso fueron mayores ($p \leq 0.05$) en los machos que en las hembras.

Los promedios de los datos morfométricos obtenidos de ambos sexos son consistentes con las medidas publicadas por Green y colaboradores (2002) cuyos valores para la cuerda alar de las hembras fue de 65-72 mm ($n=30$) y en machos 67-75 mm ($n=30$), la longitud de la cola en las hembras fue de 45-54 mm ($n=20$) y en machos 49-57 mm ($n=20$). En relación con la medida del culmen, esta es ligeramente menor

RESULTS AND DISCUSSION

Zoometry

In 111 Baird sparrow individuals which were used to take zoometric variables, through the molecular sex determination, 52 females and 59 males were identified (Table 1). When grouping the morphometric data per sex of the individuals, the average of the measurements of wing, tail, beak depth, and weight were higher ($p \leq 0.05$) in males than in females.

The averages of morphometric data obtained from both sexes are consistent with the measurements published by Green *et al.* (2002), whose values for wing chord of the females were 65-72 mm ($n=30$) and males 67-75 mm ($n=30$), the tail length for females was 45-54 mm ($n=20$) and males 49-57 mm ($n=20$). Regarding the measurement of the culmen, it is slightly lower than what was reported by Ridgway (1904) who considered in the case of females a mean value of 10.4 mm (in the interval 10.2-10.7, $n=5$) and in males 10.7 mm (in the interval 10.4-10.9, $n=8$). A single and concrete reference was not found for the weight of females and males of this species; however, the values obtained in this study were found within the general amplitude of the interval (average 17.5 g, interval 15.0 - 20.3 g) considered by Ridgway (1904).

Cuadro 1. Variables zoométricas (Media $\pm$ DE) de hembras y machos de gorriónes de Baird colectadas durante dos temporadas invernales (2013-2014 y 2014-2015) en dos sitios del Desierto Chihuahuense.

Table 1. Zoometric variables (Mean $\pm$ SD) of females and males of Baird sparrow collected during two winter seasons (2013-2014 and 2014-2015) in two sites of the Chihuahuan Desert.

Variable	Hembras n=52	Machos n=59	P
Ala (mm)	67.2 $\pm$ 1.90	70.1 $\pm$ 2.14	< 0.0001
Cola (mm)	48.2 $\pm$ 1.94	50.0 $\pm$ 2.09	< 0.0001
Culmen (mm)	9.3 $\pm$ 0.90	9.5 $\pm$ 0.91	0.250
Ancho del pico (mm)	5.5 $\pm$ 0.42	5.6 $\pm$ 0.42	0.251
Profundidad del pico (mm)	5.5 $\pm$ 0.38	5.7 $\pm$ 0.34	0.012
Peso (g)	16.7 $\pm$ 0.72	18.1 $\pm$ 0.98	< 0.0001

Variabes zoométricas con $p \leq 0.05$ significa que hembras y machos son estadísticamente diferentes en esa característica ♦ Zoometric variable with $p \leq 0.05$ means that females and males are statistically different in that characteristic.

a la reportada por Ridgway (1904) quien consideró para el caso de las hembras un valor medio de 10.4 mm (en el intervalo 10.2-10.7, n=5) y en machos 10.7 mm (en el intervalo 10.4-10.9, n=8). No se encontró disponible una referencia única y concreta para el peso de hembras y machos de esta especie; sin embargo, los valores obtenidos en este estudio se encuentran dentro de la amplitud general del intervalo (promedio 17.5 g, intervalo 15.0 - 20.3 g) considerado por Ridgway (1904).

Red neuronal artificial

A partir del análisis de componentes principales, se observó que todas las variables zoométricas contribuyeron con más del 2% de la variabilidad de la muestra (Cuadro 2).

La red óptima desarrollada es un perceptrón multicapa con 4, 2 y 2 neuronas en las capas ocultas (Figura 3). Esto implica que la red desarrollada está matemáticamente definida ya que se dispone de 67 datos en el conjunto de entrenamiento frente a los 46 necesarios para tener definida matemáticamente la red (Sha, 2007). El proceso de entrenamiento fue de 1250 ciclos, a partir de los cuales el grado de confianza empezó a descender, en lo que se conoce como un sobreentrenamiento de la red (Isasi y Galván, 2004).

El grado de confianza obtenido en la fase de comprobación es 92.3% lo cual indica que el modelo puede distinguir entre macho y hembra con un nivel de aciertos mayor al 92% (Cuadro 3). Este porcentaje está por encima del límite de 85% que Guallar *et al.* (2010) consideraron aceptable en la diferenciación del sexo de passeriformes en la región del mediterráneo occidental.

Los resultados anteriores son similares a los obtenidos por otros autores que han usado redes neuronales artificiales para distinguir especies de plantas. Como, Moshou *et al.* (2001) obtuvieron porcentajes entre 70 y 95%, dependiendo del tipo de red neuronal utilizada, al distinguir entre plántulas de maíz y arvenses. También, Burks *et al.* (2005) documentaron 85 y 95% en la clasificación de arvenses, y Esteban *et al.* (2017) obtuvieron un 81% de aciertos al diferenciar *Pinus sylvestris* L. de *Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii* a partir de datos anatómicos.

Aunque no en el ámbito de la ornitología, Jennings *et al.* (2008) compararon la capacidad humana de un grupo de 32 expertos con la capacidad de una

Cuadro 2. Varianza explicada por cada variable zoométrica.
Table 2. Variance explained by each zoometric variable.

Variable	Varianza explicada (%)
Ala	44.50
Cola	20.24
Culmen	12.76
Ancho del pico	11.02
Profundidad del pico	6.81
Peso	4.67

Artificial neural network

With the principal component analysis, it was observed that all zoometric variables contributed with a value higher than 2% of sample variability (Table 2).

The optimal network developed is a multilayer perceptron with 4, 2 and 2 neurons in the hidden layers (Figure 3). This implies that the network developed is mathematically defined since there are 67 data in the training set of the 46 which are necessary to mathematically define the network (Sha, 2007). The training process was 1250 cycles, from which the degree of confidence began to decrease, in what is known as network overtraining (Isasi and Galván, 2004).

The degree of confidence obtained in the verification phase is 92.3% which indicates that the model can distinguish between male and female with a level of successes higher than 92% (Table 3). This percentage is above the limit of 85% that Guallar *et al.* (2010) considered as acceptable in sex differentiation of passerines in the western Mediterranean region.

These previous results are similar to those obtained by other authors who have used artificial neural networks to differentiate plant species. For example, Moshou *et al.* (2001) who obtained

Cuadro 3. Resultados del proceso de entrenamiento de la red.
Table 3. Results in the training process of the network.

Fase	Grado de confianza (%)
Entrenamiento	90.6
Validación	76.2
Comprobación	92.3
Total	88.3

red neuronal para diferenciar el género y la especie de diferentes murciélagos del Reino Unido a partir de sus sonidos de ecolocalización. En su estudio concluyeron que la capacidad de la red neuronal era superior a la humana, con 92% de aciertos en el género y 62% de aciertos en especie, frente a los 86 y 56% de aciertos obtenidos por los expertos.

En los pocos casos de aplicación de redes neuronales en el ámbito de la ornitología, los resultados han sido muy similares a los obtenidos en este estudio. Por ejemplo, McIlraith y Card (1997) registraron 82% aciertos en la distinción de seis especies de aves, y Juang y Chen (2007) alcanzaron 95% de aciertos en la distinción del canto de diez especies de aves. Además, Cai *et al.* (2007) utilizaron un clasificador basado en una red neuronal para diferenciar el canto de 14 especies de aves y obtuvieron entre 76 y 85% de aciertos.

De manera similar, Raghuram *et al.* (2016) clasificaron el canto de 37 especies de aves mediante distintos métodos, obtuvieron con una red neuronal 94% de aciertos, superior a los otros métodos utilizados en su estudio, excepto el de los árboles de decisión. Mientras que Sierra-Franco (2018)⁵ aplicó una función discriminante para gorriónes del género *Ammodramus*, y para *C. bairdii* (n=111) y encontraron 81.1% de eficiencia en la predicción del género; las variables morfométricas utilizadas en la función fueron peso, culmen y longitud del ala. Para *A. savanarum* (n=196) la eficiencia fue 70.9% con las variables peso, longitud del ala y cola.

Counsilman *et al.* (1994) desarrollaron una función discriminante a partir de datos morfológicos para la diferenciación entre machos y hembras de las especies *Acridotheres tristis* y *A. javanicus*. En su estudio encontraron 89% de aciertos en machos y 76% en hembras de *A. tristis* y 81% en machos y 59% en hembras de *A. javanicus*.

Jakubas y Wojczulanis (2007) encontraron 65 y 70% al clasificar el sexo del mérgulo atlántico (*Alle alle*) de la colonia de anidamiento de Hornsund (South Spitsbergen). Y Guallar *et al.* (2010) obtuvieron entre 60 y 90% al clasificar el sexo de 25 especies de passeriformes en la región del mediterráneo occidental. Los porcentajes en su gran mayoría oscilan entre el 70 y el 80%, y sólo en el caso del *Cettia cetti* superaron el 90%. La precisión de nuestras estimaciones también es superior al resultado hallado por Bourgeois *et al.* (2007) al identificar el sexo de la pardela mediterránea (*Puffinus yelkouan*), el cual fue

percentajes between 70 and 95%, depending on the type of neural network used, by distinguishing between maize seedlings and weeds. Also, Burks *et al.* (2005) documented 85 and 95% in the classification of weeds, and Esteban *et al.* (2017) obtained 81% of success when differentiated *Pinus sylvestris* L. from *Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii* by using anatomical data.

Although not in the field of ornithology, Jennings *et al.* (2008) compared the human capacity of a group of 32 experts with the capacity of a neural network to differentiate the genus and species of different bats from their echolocation sounds in the United Kingdom. In their study those authors concluded that the capacity of the neural network was higher than the human capacity, showing 92% success in the gender and 62% success in the species, against the 86 and 56% success obtained by the experts.

In the few cases of application of neural networks in the field of ornithology, results have been very similar to those obtained in this study. For example, McIlraith and Card (1997) recorded 82% of success in the distinction of six bird species, and Juang and Chen (2007) reached 95% success in the distinction of the song of ten bird species. In addition, Cai *et al.* (2007) used a classifier based on a neural network to differentiate the song of 14 bird species and obtained between 76 and 85% of success.

Similarly, Raghuram *et al.* (2016) classified the song of 37 bird species through different methods; they obtained with a neural network 94% success, higher than other methods used in their study, except the decision trees. Whereas Sierra-Franco (2018)⁵ applied a discriminant function for sparrows of the genus *Ammodramus*, and for *C. bairdii* (n=111), and found 81.1% of efficiency in gender prediction, and the morphometric variables used in the function were weight, culmen and wing length. For *A. savanarum* (n=196) the efficiency was 70.9% with the variables weight, wing and tail length.

Counsilman *et al.* (1994) developed a discriminant function from morphologic data to differentiate between males and females of the species *Acridotheres tristis* and *A. javanicus*. In their study authors found 89% of success in males and 76% in females of *A. tristis*; and 81% success in males and 59% in females of *A. javanicus*.

Jakubas and Wojczulanis (2007) found 65 and 70% when classifying the sex of the Atlantic little auk (*Alle alle*) at the nesting colony of Hornsund

87% de aciertos con el uso de una función discriminante a partir de datos zoométricos.

CONCLUSIONES

Por medio del desarrollo de una red neuronal artificial se logró determinar el sexo de *Centronyx bairdii* con un grado de certeza aceptable. Las medidas morfométricas peso, cuerda alar, longitud de cola, culmen, anchura del pico y profundidad del pico son adecuadas para la diferenciación del sexo en individuos de esta especie.

El resultado obtenido con la técnica diseñada en este estudio es superior al encontrado por otros autores que han usado el método de la función discriminante para diferenciar el sexo de individuos en *C. bairdii* y en otras especies monomórficas.

LITERATURA CITADA

- Bourgeois, K., C. Curé, J. Legrand, E. Gómez-Díaz, E. Vidal, T. Aubin, and N. Mathevon. 2007. Morphological *versus* acoustic analysis: what is the most efficient method for sexing yelkouan shearwaters *Puffinus yelkouan*? J. Ornithol. 148: 261-269.
- Burks, T. F., S. A. Shearer, J. R. Heath, and K. D. Donohue. 2005. Evaluation of neural network classifiers for weed species discrimination. Biosystems Eng. 91: 293-304.
- Cai, J., D. Ee, B. Pham, P. Roe, and J. Zhang. 2007. Sensor network for the monitoring of ecosystem: Bird species recognition. Proc. 3rd IEEE International Conference on Intelligent Sensors Sensor Networks and Information. Melbourne, Australia, IEEE. pp: 293-298.
- CEC (Commission for Environmental Cooperation). 2013. Where do grassland birds winter? Density, abundance and distribution of wintering grassland passerines in the Chihuahuan Desert. Commission for Environmental Cooperation. Montreal, Canada. 30 p.
- Counsilman, J. J., K. Nee, A. K. Jalil, and W. L. Keng. 1994. Discriminant analysis of morphometric characters as a means of sexing mynas. J. Field Ornithol. 65: 1-7.
- Dechaume-Moncharmont, F.C., K. Monceau and F. Cezilly. 2011. Sexing birds using discriminant function analysis: A critical appraisal. Auk 128: 78-86.
- Delong, J. P., and J. A. Gessaman. 2001. A comparison of non-invasive techniques for estimating total body fat in sharp shinned and cooper's hawks. J. Field Ornithol. 72: 349-364.
- Demuth, H., M. Beale, and M. Hagan. 2002. Neural Network Toolbox User's guide, Version 4. The Mathworks Inc. Natic, MA. 450 p.
- Esteban, L. G., P. Palacios de, M. Conde, F. G. Fernández, A. García-Iruela, and M. González-Alonso. 2017. Application of artificial neural networks as a predictive method to differentiate the wood of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco. Wood Sci. Technol. 51: 1249-1285.
- Flux, I., and J. Innes. 2001. A field technique for gender determination in North Island kokako (*Callaeas cinerea wilsoni*). Notornis 48: 217-223.
- Fridolfsson, A., and H. Ellegren. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of nonratite birds. J. Avian Biol. 30: 116-121.
- García-Esteban, L., F. García-Fernández, P. de Palacios, R. Moreno Romero, N. Navarro Cano. 2009. Artificial neural networks in wood identification: the case of two Juniperus species from the Canary Islands. IAWA Journal 30: 87-94.
- Guallar, S., J. Quesada, G. Gargallo, S. Herrando, and J. M. Romero. 2010. Use of discriminant analysis in the sex determination of passerines breeding in the western Mediterranean. Rev. Catalana d'Ornitol. 26: 38-50.
- Green, M. T., P. E. Lowther, S. K. Jones, S. K. Davis, and B. C. Dale. 2002. Baird's Sparrow (*Centronyx bairdii*). The Birds of North America Online, Ithaca, NY, USA: Cornell Lab of Ornithology. <https://birdsna.org/Species-Account/bna/species/baispa/introduction> (Consulta: agosto 2018).
- Hernández-Pérez, J. A., M. A. García-Alvarado, G. Trystam, and

CONCLUSIONS

Through the development of an artificial neural network, it was possible to determine the sex of *Centronyx bairdii* with an acceptable degree of confidence. The morphometric measurements weight, wing chord, tail length, culmen, beak width and beak depth are adequate for the sex differentiation in individuals of this species.

The result obtained with the technique designed in this study is superior than the one found by other authors that have used the method of discriminant function to differentiate the sex of individuals in *C. bairdii* and other monomorphic species.

—End of the English version—



- B. Heyd. 2004. Neural networks for the heat and mass transfer prediction during drying of cassava and mango. *Innovate Food Sci. Eng. Technol.* 5: 57-64.
- Hornik, K., M. Stinchcombe, and H. White. 1989. Multilayer feedforward networks are universal approximators. *Neural Networks* 2: 359-366.
- ICOAN (Iniciativa para la Conservación de las Aves de América del Norte). 2016. El Estado de las Aves de Norteamérica 2016. Ontario, Canada: Environment and Climate Change Canada: <http://www.es.stateofthebirds.org> (Consulta: mayo 2018).
- Isasi, P., e I. M. Galván. 2004. Redes Neuronales Artificiales, un Enfoque Práctico. Pearson Educación S.A., Madrid. 240 p.
- Jakubas, D., and K. Wojczulanis. 2007. Predicting the sex of doves by discriminant analysis. *Waterbirds* 30: 92-96.
- Jennings, N., S. Parson, and M. J. O. Pocock. 2008. Human vs. machine: Identification of bat species from their echolocation calls by humans and by artificial neural networks. *Can. J. Zool.* 86: 371-377.
- Juang, C. F., and T. M. Chen. 2007. Bird song recognition using prediction-based recurrent neural fuzzy networks. *Neurocomputing* 71: 121-130.
- McIlraith, A. L., and H. C. Card. 1997. Bird song identification using artificial neural networks and statistical analysis. IEEE Canadian Conference on Electrical and Computer Engineering, Engineering Innovation. Saint Johns, Newfoundland, Canada. pp: 63-66.
- McNamara, J. M., T. Székely, J. N. Webb, and A. Houston. 2000. A dynamic game-theoretic model of parental care. *J. Theor. Biol.* 205: 605-623.
- Moshou, D., E. Vrindts, B. De Ketelaere, J. De Baerdemaeker, and H. Ramon. 2001. A neural-network-based plant classifier. *Comput. Electronics Agric.* 31: 5-16.
- Panjabi, A., and L. Beyer. 2010. Desert Grassland Bird Conservation: Is low winter survival driving population declines? Phase I. Final report I-MXPLAT-NPS-08-02. Brighton, CO, EUA, Rocky Mountain Bird Observatory. 13 p.
- Peng, G., X. Chen, W. Wu, and X. Jiang, X. 2007. Modelling of water sorption isotherm for corn starch. *J. Food Eng.* 80: 562-567.
- Pérez, M. L., y Q. Martín. 2003. Aplicaciones de las redes neuronales a la estadística. Cuadernos de Estadística. La Muralla S.A. Madrid. 140 p.
- Pyle, P. 1997. Identification Guide to North American Birds. Braun-Brumfield Inc. Bolinas, California. 732 p.
- Raghuram, M. A., N. R. Chavan, R. Belur, and S. G. Koolagudi. 2016. Bird classification based on their sound pattern. *Int. J. Speech Technol.* 19: 791-804.
- Ramírez, G., y M. I. Chacón. 2005. Clasificación de defectos en madera utilizando redes neuronales artificiales. *Comput. Sistemas* 9: 17-27.
- Ridgway, R. 1904. The Birds of North and Middle America: A Descriptive Catalogue of the Higher Groups, Genera, Species, and Subspecies of Birds Known to Occur in North America, from the Arctic Lands to the Isthmus of Panama, the West Indies and Other Islands of the Caribbean Sea, and the Galapagos Archipelago. US Government Printing Office. Washington D. C. 796 p.
- Risser, A. C. 1971. A technique for performing laparotomy on small birds. *Condor* 73: 376-79.
- Sauer, J. R., D. K. Niven, J. E. Hines, D. J. Ziolkowski, Jr, K. L. Pardieck, J. E. Fallon, and W. A. Link. 2017. The North American Breeding Bird Survey, Results and Analysis 1966 - 2015. USGS Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, MD Version 2.07.2017.
- Sha, W. 2007. Comment on the issues of statistical modelling with particular reference to the use of artificial neural networks. *Applied Catalysis A General* 324: 87-89.
- Székely, T., A. Liker, R. P. Freckleton, C. Fichtel, and P. M. Kappeler. 2014. Sex-biased survival predicts adult sex ratio variation in wild birds. *Proc. Royal Society B* 281: 20140342.
- The MathWorks, Inc. 2007. MATLAB(r) Ver. 7.5.0. (R2007b). <https://es.mathworks.com/products/matlab.html> (Consulta: octubre, 2018)

SEED YIELD AND FATTY ACID COMPOSITION IN SESAME (*Sesamum indicum* L.) AS AFFECTED BY SILICON APPLICATION UNDER A SEMI-ARID CLIMATE

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE SILICIO EN EL RENDIMIENTO DE SEMILLAS Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN AJONJOLÍ (*Sesamum indicum* L.) EN UN CLIMA SEMIÁRIDO

Abdul Manaf¹, Mehreen Shoukat¹, Ahmad Sher^{2*}, Abdul Qayyum³, Ahmad Nawaz^{2*}

¹Department of Agronomy, PMAS- Arid Agriculture University Rawalpindi, 46000, Pakistan.

²College of Agriculture, Bahauddin Zakariya University, Bahadur Sub-Campus Layyah, 31200, Pakistan. (ahmadnawaz2006@gmail.com), (ahmad.sher@bzu.edu.pk). ³Department of Agricultural Sciences, University of Haripur, 22620, Pakistan.

ABSTRACT

Sesame (*Sesamum indicum* L.) is a short duration, low input and highly drought tolerant conventional oilseed crop with high edible seed oil contents. This study was aimed to evaluate the response of four sesame genotypes to silicon (Si) application under a semi-arid climate. For this study, we hypothesized that Si application may improve seed yield, oil contents and fatty acid composition in sesame. The experimental design was a two factor-factorial randomized complete block, replicated four times, and the treatments were four sesame genotypes (TS-3, SG-120, SG-169 and SG-170) and three Si levels (0, 22 and 44 kg ha⁻¹). The data was analyzed statistically with the 'Statistics 8.1' software. The genotype TS-3 had the highest ($p \leq 0.05$) seed yield (479.1 kg ha⁻¹), oil content (40.2%), oleic acid (41.8%), and the lowest content of palmitic acid (6.37%) and linoleic acid (38.5%). Silicon application significantly enhanced the seed yield, oil and unsaturated fatty acids (oleic and linoleic acid) contents and reduced the saturated fatty acid (palmitic and stearic acid) over control. The highest seed yield (487.8 kg ha⁻¹), oil contents (38%), oleic acid (40.9%), linoleic acid (41.7%), as well as the lowest palmitic acid (6.49%) and stearic acid (3.66%) were recorded with the application of 44 kg Si ha⁻¹. The seed yield of sesame genotypes followed the order TS-3>SG-120>SG-169>SG-170.

Key words: Oilseed crops, crop nutrition, rainfed areas, oil contents, oil quality.

RESUMEN

El ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) es un cultivo oleaginoso convencional de corta duración, bajo costo, con alta resistencia a la sequía y las semillas tienen un contenido alto de aceite comestible. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de cuatro genotipos de ajonjolí a la aplicación de silicio (Si), en un clima semiárido. La hipótesis de este estudio fue que la aplicación de Si pudiera mejorar el rendimiento, el contenido de aceite y la composición de ácidos grasos del ajonjolí. El diseño experimental fue un factorial con dos factores en bloques completos al azar, con cuatro repeticiones, y los tratamientos fueron cuatro genotipos de ajonjolí (TS-3, SG-120, SG-169 y SG-170) y tres niveles de Si (0, 22 y 44 kg ha⁻¹). Los datos se analizaron con el software Statistics 8.1. El genotipo TS-3 tuvo el mayor rendimiento ($p \leq 0.05$) de semilla (479.1 kg ha⁻¹), contenido de aceite (40.2%), ácido oleico (41.8%), y el menor contenido de ácido palmítico (6.37%) y de ácido linoleico (38.5%). La aplicación de Si aumentó significativamente el rendimiento de semilla y el contenido de aceite y de ácidos grasos insaturados (ácido oleico y linoleico), y redujo los ácidos grasos saturados (ácido palmítico y esteárico) con respecto al testigo. El rendimiento más alto de semillas (487.8 kg ha⁻¹) y de contenidos de aceite (38.6%), ácido oleico (40.9%) y ácido linoleico (41.7%), así como el porcentaje más bajo de ácido palmítico (6.49%) y de ácido esteárico (3.66%), se registraron al aplicar 44 kg ha⁻¹ de Si. El orden del rendimiento de la semilla de los genotipos de ajonjolí fue el siguiente: TS-3>SG-120>SG-169>SG-170.

Palabras clave: cultivos oleaginosos, nutrición del cultivo, áreas de secano, contenidos de aceite, calidad del aceite.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: June, 2018. Approved: January, 2019.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 367-376. 2020.

INTRODUCTION

Sesame (*Sesamum indicum* L.) is an important short duration, low input and highly drought tolerant conventional oilseed crop with high edible seed oil contents. The presence of natural antioxidants makes it one of the most stable vegetable oil of the world. Its seed contains ~50-60% oil and ~25% protein (Gharby *et al.*, 2015). Sesame oil contains palmitic acid, stearic acid (Orsavova *et al.*, 2015), linoleic acid (40.7-49.3%), and oleic acid (29.3-41.4%) (Uzun *et al.*, 2008). Sesamin, sesamol and sesamolins are natural anti-oxidants of sesame oil, which increase its stability and shelf life (Obiajunwa *et al.*, 2005).

Pakistan faces a constant shortage of edible oil and the production meets only 18% of the total edible oil consumption of the country; the remaining 82% is met through imports by spending US\$ 2.23 billion (Government of Pakistan, 2015). The oilseed crops, including the sesame, are grown in small areas on marginal lands with low inputs by the subsistence farmers, which results in lower yield, thus enhancing the burden of oil imports in Pakistan (Amjad, 2014).

There is a great potential in the Pothwar region for growing oilseed crops (*e.g.* sesame) due to unique environmental conditions, mainly the pattern/distribution/frequency of rainfall and temperature. Annual rainfall in the Northern parts of the region ranges between 1000 to 1500 mm, while Southern parts only receive 300-400 mm. The rainfall pattern in the Western and the Eastern areas (Jhelum and Attock) varies between 450-750 mm. Temperature also varies during the rainy season and afterward, which is the peak season of sesame crop growth and development. Water stress and the environment affect fatty acid contents in an oilseed genotype, in particular, oil and linoleic acid accumulation (Dwivedi *et al.*, 1993). The warmer climate favors the production of unsaturated fats in oilseeds more than the cooler climate (Bachlava and Cardinal, 2009).

After oxygen, silicon (Si) is the second most abundant element in soil, with 50-70 % of total soil mass. The roots of all the plants have some quantities of Si in their tissues. According to Ma (2004), the intensive crop production and constant use of heavy doses of synthetic fertilizer (*e.g.* nitrogen, phosphorous and potassium) has depleted the surplus quantities of

INTRODUCCIÓN

El ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) es un cultivo oleaginoso convencional de corta duración, bajo costo y con alta resistencia a la sequía; sus semillas tienen un alto contenido de aceite comestible. La presencia de antioxidantes naturales lo convierte en uno de los aceites vegetales más estables del mundo. Sus semillas contienen ~50-60% de aceite y ~25% de proteína (Gharby *et al.*, 2015). El aceite de ajonjolí contiene ácido palmítico, ácido esteárico (Orsavova *et al.*, 2015), ácido linoleico (40.7-49.3%) y ácido oleico (29.3-41.4%) (Uzun *et al.*, 2008). Sesamina, sesamol y sesamolinas son antioxidantes naturales del aceite de ajonjolí que aumentan su estabilidad y vida útil (Obiajunwa *et al.*, 2005).

Pakistán enfrenta una escasez constante de aceite comestible y la producción cubre sólo el 18% del total del consumo interno; las importaciones cubren el 82% restante de la demanda, lo cual representa un gasto de US\$2.23 mil millones (Gobierno de Pakistán, 2015). Los cultivos de semillas oleaginosas, incluyendo las de ajonjolí, se realizan en zonas pequeñas o en tierras marginales con pocos aportes de campesinos dedicados a la agricultura de subsistencia, lo cual resulta en rendimientos bajos y así aumenta la carga de las importaciones de aceite en Pakistán (Amjad, 2014).

En la región de Pothwar hay un gran potencial para el cultivo de oleaginosas (*v.gr.* ajonjolí), debido a las condiciones ambientales únicas de la región, principalmente el patrón/la distribución/la frecuencia de las precipitaciones y la temperatura. Las precipitaciones anuales en el norte de la región varían entre 1000 y 1500 mm, mientras que la zona sur sólo recibe entre 300 y 400 mm. El patrón de precipitaciones en las regiones occidental y oriental (Jhelum y Attock) varía entre 450 y 750 mm. La temperatura también varía durante y después de la temporada de lluvias, lo cual es la temporada alta para el crecimiento y desarrollo de los cultivos de ajonjolí. El estrés hídrico y el ambiente afectan el contenido de ácidos grasos en el genotipo de oleaginosas, en particular, en la acumulación de aceite y de ácido linoleico (Dwivedi *et al.*, 1993). El clima más cálido es más propicio para la producción de grasas insaturadas en las oleaginosas que un clima más frío (Bachlava y Cardinal, 2009).

Si from our crop soils. The characteristic function of Si is to help plants to overcome the multiple abiotic (Ma, 2004; Ma and Yamaji, 2006) and biotic stresses. Besides, application of Si improved nutrient uptake (Bacchus, 2010). The Si deposition in leaves reduces the transpiration rate thus enhancing the resistance against various abiotic stresses including drought, temperature, and radiation stress (Ma *et al.*, 2006). Moreover, Si is involved in many physiological, structural and metabolic processes in higher plants under abiotic and biotic stresses (Liang *et al.*, 2003). The beneficial effects of Si were found in a variety of plant species, which include an improvement in the quality of several oil seed crops. Liang *et al.* (2015) reported that Si enhances the growth, biomass, yield and quality of many field crops.

The impact of Si in the improvement of crop performance under optimal and sub optimal conditions was reported, but no studies were found about the influence of various Si levels on yield, oil quality and fatty acid composition of sesame seeds. The hypothesis of this study was that Si application may improve yield, oil contents and fatty acid composition in sesame seeds. The objective was to optimize the Si level for boosting seed yield and oil quality of various sesame genotypes under rainfed conditions of Pothwar, Punjab, Pakistan.

MATERIALS AND METHODS

Experimental site and soil

This field study was conducted at PMAS-Arid Agriculture University, Research Farm Chakwal Road, Rawalpindi (33° 06' N, 73° 00' E, and 502 m ASL) during Kharif 2015. In Pakistan, Kharif starts between March and July, and it finish at the end of autumn or beginning of winter. The soil physicochemical characteristics of the experimental site and the weather data are shown in [Tables 1 and 2](#), respectively.

Experimental design and treatments

The experimental design was a two factor-factorial randomized complete block, replicated four times, and the treatments were four sesame genotypes (TS-3, SG-120, SG-169 and SG-170) and three Si levels (0, 22 and 44 kg ha⁻¹). The size of the net plot was 2.7 m×5 m. In each plot there were six rows, 45 cm apart; plant to plant distance of 10 cm was maintained after thinning.

Después del oxígeno, el silicio (Si) es el segundo elemento más abundante en los suelos con 50-70% de su masa total. Los tejidos de las raíces de todas las plantas tienen alguna cantidad de Si en sus tejidos. De acuerdo con Ma (2004), la agricultura intensiva y el uso constante de altas dosis de fertilizantes sintéticos (*v.gr.*, nitrógeno, fósforo y potasio) han mermado el excedente de Si de los suelos de cultivo de Pakistán. La función característica de Si es ayudar a las plantas a superar los múltiples estreses abióticos y bióticos (Ma, 2004; Ma y Yamaji, 2006). Además, la aplicación de Si mejora la absorción de nutrientes (Bacchus, 2010). El depósito de Si en las hojas reduce la tasa de transpiración y mejora así la resistencia contra varios estreses abióticos incluyendo la sequía, la temperatura y el estrés por radiación (Ma *et al.*, 2006). Más aún, el Si forma parte de muchos procesos fisiológicos, estructurales y metabólicos en las plantas vasculares con estreses abióticos y bióticos (Liang *et al.*, 2003). Los efectos benéficos de Si se encontraron en una variedad de especies de plantas, que incluyen una mejora en la calidad de varios cultivos de oleaginosas. Liang *et al.* (2015) reportaron que el Si mejora el crecimiento, la biomasa, el rendimiento y la calidad de muchos cultivos en campo.

El impacto del Si en la mejora del rendimiento de los cultivos bajo óptimas y subóptimas condiciones se ha reportado, pero no se encontraron estudios acerca de la influencia de varios niveles de Si en el rendimiento, la calidad del aceite y la composición de los ácidos grasos de las semillas de ajonjolí. La hipótesis de este estudio fue que la aplicación de Si puede mejorar el rendimiento, el contenido del aceite y la composición de los ácidos grasos de la semilla de ajonjolí. El objetivo fue optimizar el nivel de Si para estimular el rendimiento de la semilla y la calidad del aceite de varios genotipos de ajonjolí, en condiciones de secano, en Pothwar, Punjab, Pakistán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental y suelo

El estudio de campo se efectuó en PMAS-Arid Agriculture University, Research Farm Chakwal Road, Rawalpindi (33° 06' N, 73° 00' E y 502 msnm) durante la temporada Kharif de 2015. En Pakistán, la temporada Kharif inicia entre marzo y julio y termina al final del otoño o principios del invierno. Las características físicoquímicas del suelo del sitio experimental y

Table 1. Physicochemical properties of the experimental site.
Cuadro 1. Propiedades físicoquímicas del sitio experimental.

Depth	0-15 cm	15-30 cm
Soil texture	Sandy clay loam	Sandy clay loam
Soil saturation (%)	32	33
Soil pH	7.48	7.61
EC (ds m ⁻¹)	0.78	0.69
Soil organic matter (%)	0.71	0.43
Bulk density (g cm ⁻³)	1.52	1.54
Available phosphorous (mg kg ⁻¹)	4.6	4.2
Available potassium (mg kg ⁻¹)	100	80

Table 2. Mean rainfall, temperature and relative humidity during the crop growth period.
Cuadro 2. Precipitación media, temperatura y humedad relativa durante el período de crecimiento del cultivo.

Month	Rainfall (mm)	Maximum temperature (°C)	Minimum temperature (°C)	Relative humidity (%)
July	151.1	33.7	23.3	75.3
August	105.9	32.2	22.8	80.4
September	38.0	32.7	20.3	73.5
October	34.4	29.9	14.9	53.9
November	9.20	22.9	7.4	64.7

Crop husbandry

The seedbed was prepared by three cultivations (up to 0.30 m) followed by two plantings. The sesame crop was seeded (5 kg ha⁻¹) with a manual hand drill. The dose of Si was applied as sodium silicate (Na₂SiO₃) solution, immediately after sowing of crop. All other agronomic and cultural operations were uniform during the whole crop period. Weeds were controlled through manual weeding. The fertilizer (N and P) was applied at the rate of 50-60 kg ha⁻¹ as urea and di-ammonium phosphate, respectively. No irrigation was applied to the crop during the full crop season.

Harvesting and data recording

At maturity, ten plants were randomly selected from each experimental plot to record the morphological and yield variables: plant height, number of branches, number of capsules, and number of seeds per capsule. The crop was harvested from two central rows of each plot and harvested plants were sun dried for two weeks. These dried samples were weighed on an electric balance to record the biological yield, they were manually threshed and well cleaned to remove the inert matter and to

la información climatológica se muestran en los cuadros 1 y 2, respectivamente.

Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue factorial con dos factores en bloques completos al azar con cuatro repeticiones, y los tratamientos fueron cuatro genotipos de ajonjolí (TS-3, SG-120, SG-169 y SG-170) y tres niveles de Si (0, 22 y 44 kg ha⁻¹). El tamaño neto de cada parcela fue 2.7 m × 5 m. En cada parcela había seis filas, con 45 cm de separación entre ellas; y entre las plantas de cada fila se mantuvo una distancia de 10 cm, después del aclareo.

Producción agrícola

El lecho de siembra se preparó con tres cultivos (hasta 0.30 m), seguido de dos siembras. El ajonjolí se sembró (5 kg ha⁻¹) con un taladro manual. Después de sembrar la parcela, de inmediato se aplicó la dosis de Si: una solución de silicato de sodio (Na₂SiO₃). Todas las otras operaciones agrícolas y de cultivo fueron uniformes durante todo el período de cultivo. Las hierbas se controlaron de manera manual. La aplicación de fertilizante fue 50 y 60 NP kg ha⁻¹ de fosfato de urea y fosfato diaónico,

record the seed yield. Three sub-samples of 1000 seeds were taken from each plot to record the 1000-seed weight. The seed samples were further transferred to the laboratory in polythene bags for the quality analysis.

Oil/protein contents and fatty acid composition of sesame seeds were determined at the laboratory by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) (Sato *et al.*, 2008) with a NIR Systems Model 6500 spectrophotometer (Foss-NIR Systems, Inc., Silver Spring, MD, USA) followed by recording of Spectra in reflectance mode (Font *et al.*, 2006).

Statistical analysis

The data was analyzed statistically with ANOVA and the treatment means were compared using LSD test ($p \leq 0.05$) (Steel *et al.*, 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological and yield variables

Sesame genotypes differed ($p \leq 0.05$) for plant height, branches per plant, capsules per plant, biological yield and seed yield, but results were non-significant for 1000-seed weight, seeds per capsule and harvest index. Application of Si affected ($p \leq 0.05$) the plant height, seeds per capsule, biological/seed yield and harvest index, but results were non-significant for branches per plant, 1000-seed weight and capsules per plant. The interaction of sesame genotypes with Si application was significant only for biological yield and harvest index (Table 3). Among the sesame genotypes, the highest plant height and number of branches per plant were found in genotype TS-3, which was statistically similar with genotype SG-120 for plant height. The genotypes SG-120, SG-169 and SG-170 showed the highest number of capsules per plant, and the lowest number was in genotype TS-3. The highest biological and seed yield was recorded in genotype TS-3 (Table 3), which might be attributed to more branches per plant and the highest plant height which resulted in the accumulation of more biomass and improved the biological yield in TS-3. Although the number of capsules was the lowest in TS-3, the highest 1000 seed weight stimulated the highest seed yield in this genotype. Sabiel *et al.* (2015) reported that seed yield in sesame showed a high positive correlation with the 1000-seed weight. Moreover, the differences in

respectivamente. No se regaron las parcelas durante todo el período de cultivo.

Cosecha y registro de información

Al alcanzar la madurez, diez plantas se escogieron al azar de cada parcela experimental para registrar las variables morfológicas y de rendimiento: altura de la planta, cantidad de ramas, cantidad de cápsulas y la cantidad de semillas por cápsula. El cultivo de las dos filas centrales de cada parcela se cosechó y las plantas cosechadas se secaron al sol por dos semanas. Estas muestras secas se pesaron en una balanza electrónica para registrar el rendimiento biológico, las muestras secas de las plantas se trillaron y limpiaron a mano para eliminar la materia inerte y registrar el rendimiento de la semilla. Tres submuestras de 1000 semillas se tomaron de cada parcela para registrar su peso por millar. Las muestras de semillas se transportaron en bolsas de polietileno al laboratorio para realizar el análisis de calidad.

El contenido de aceite/proteínas y la composición de los ácidos grasos de las semillas de ajonjolí se determinaron en el laboratorio por espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRs, por sus siglas en inglés) (Sato *et al.*, 2008), con un espectrofotómetro NIR Systems modelo 6500 (Foss-NIR Systems, Inc., Silver Spring, MD, USA). Luego se registró el espectro de reflectancia (Font *et al.*, 2006).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la información se realizó con ANDEVA y las medias del tratamiento se compararon con la prueba LSD ($p \leq 0.05$) (Steel *et al.*, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables morfológicas y de rendimiento

Los genotipos de ajonjolí difirieron ($p \leq 0.05$) en altura de las plantas, ramas por planta, cápsulas por plantas, rendimiento biológico y rendimiento de la semilla; los resultados no fueron significativos para peso por millar de semillas, semillas por cápsula e índice de cosecha. La aplicación de Si tuvo un efecto significativo en altura de las plantas, semillas por cápsula, rendimiento biológico y de semilla e índice de cosecha, pero los resultados no fueron significativos para cantidad de ramas por planta, peso por millar de semillas y cantidad de cápsulas por planta. La interacción de los genotipos de ajonjolí con aplicación de Si sólo fue significativa para rendimiento biológico

Table 3. Impact of silicon application at three levels on morphological and yield variables of four sesame genotypes.**Cuadro 3. Impacto de la aplicación de tres niveles de silicio sobre las variables morfológicas y de rendimiento de cuatro genotipos de ajonjolí.**

Treatments	PH (cm)	NB	NC	NS	TGW (g)	BY (kg ha ⁻¹)	SY (kg ha ⁻¹)	HI (%)
Genotypes (G)								
TS-3	87.88 a	5.90 a	14.4 b	47.57	3.58	1172.8 a	479.1 a	41.55
SG-120	86.88 ab	5.07 b	17.56 a	50.25	3.41	1055.6 b	449.8 b	44.07
SG-169	84.92 bc	3.90 c	17.01 a	49.22	3.40	999.9 b	434.5 b	44.71
SG-170	82.73 b	3.07 d	16.86 a	49.67	3.21	1000 b	432.8 b	46.22
LSD ($p \leq 0.05$)	2.69	0.61	1.32	Ns	ns	112.41	28.00	ns
Silicon level (Si) (kg ha ⁻¹)								
0	82.51 c	4.28	15.90	47.61 b	3.32	847.2 c	399.7 c	48.0 a
22	85.75 b	4.55	16.70	51.09 a	3.41	1092.6 b	459.6 b	44.0 b
44	88.55 a	4.64	16.78	48.80 b	3.47	1231.5 a	487.8 a	40.4 c
LSD ($p \leq 0.05$)	2.33	ns	ns	1.97	ns	97.28	24.25	3.60
G × Si	ns	ns	ns	ns	ns	194.58	ns	7.21

PH, plant height; NB, number of branches per plant; NC, number of capsules per plant; ns, number of seed per capsules; TGW, 1000-grain weight; BY, biological yield; SY, seed yield; HI, harvest index; Different letters indicate significant differences among the values in each column and individual factors (LSD test; $p \leq 0.05$); ns: non-significant ♦ PH, altura de la planta; NB, cantidad de ramas por plantas; NC, cantidad de cápsulas por planta; ns, cantidad de semillas por cápsula; TGW, peso por millar de granos; BY, rendimiento biológico; SY, rendimiento de semilla; HI, índice de cosecha. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los valores de cada columna y los factores individuales (prueba LSD; $p \leq 0.05$); ns: no significativo.

morphological (plant height, number of branches per plant) and yield variables (number of capsules per plant, number of seeds per capsule, 1000 seed weight) among the sesame genotypes analyzed might be attributed to the differences in the genetic makeup of these genotypes (Sabiell *et al.*, 2015). Other studies reported the differences in the morphological and yield variables of diverse sesame genotypes under different environmental conditions (Ogbonna and Ukaa, 2012; Revathi *et al.*, 2012; Ahmed and Ahmed, 2012, 2013; Chandramohan, 2014; Abate and Mekbib, 2015). Thus, the genotype TS-3 had the greatest yield due to the highest seed weight and it should be grown under rainfed conditions. This might be useful to enhance the oilseed production in Pakistan and lower the burden of oil imports, which have a high cost for our country annual budget.

The application of 44 kg Si ha⁻¹ was the most beneficial for the improvement of plant height, biological yield and seed yield. Number of seeds per capsule and the harvest index was the highest with Si application at 22 and 0 kg ha⁻¹, respectively (Table 3). Silicon has a vital role in plant growth and development under optimal and sub-optimal conditions (Ma, 2004; Ma and Yamaji, 2006) by

e índice de cosecha (Cuadro 3). Entre los genotipos de ajonjolí, la altura más grande en las plantas y la mayor cantidad de ramas por planta se encontraron en el genotipo TS-3, y en cantidad de ramas por planta fue estadísticamente similar con el genotipo SG-120. Los genotipos SG-120, SG-169 y SG-170 presentaron el mayor número de cápsulas por planta, y el menor número estuvo en el genotipo TS-3. El mayor rendimiento biológico y de semillas se registró en el genotipo TS-3 (Cuadro 3), que puede atribuirse al mayor número de ramas por planta y la mayor altura de planta, lo cual resultó en la acumulación de más biomasa que mejoró el rendimiento biológico de TS-3. Aunque la cantidad de cápsulas fue la más baja en TS-3, el mayor peso por millar de semillas estimuló el mayor rendimiento de las semillas de este genotipo. Sabiell *et al.* (2015) reportaron que el rendimiento de semilla en ajonjolí mostró una relación positiva alta con el peso por millar de semillas. Más aún, las diferencias entre las variables morfológicas (altura de la planta, cantidad de ramas por planta) y de rendimiento (cantidad de cápsulas por planta, cantidad de semillas por cápsula, peso por millar de semillas) entre los genotipos de ajonjolí examinados pueden atribuirse a las diferencias en la constitución

rising uptake of other macro and micronutrients (Bacchus, 2010), decreasing transpiration rate (Ma *et al.*, 2006), increasing photosynthesis (Agarie *et al.*, 1992), and with a role in the metabolic, physiological and structural activities of the plants (Liang *et al.*, 2003). As a result, there was an increase in growth, biomass, seed yield and quality of crops are improved (Liang *et al.*, 2015). That was also the result in our study. However, yield increment due to Si application might be indirectly attributed to indirect effects of Si on adjustment of soil pH and acquisition of macro and micro nutrients (Liang *et al.*, 2015).

Quality variables

Sesame genotypes significantly differed for oil contents, stearic acid, palmitic acid, oleic acid and linoleic acid, but results were not significant for protein contents. Silicon application significantly affected the oil contents, stearic acid, palmitic acid, oleic acid and linoleic acid, but results were not significant for protein contents. The interaction of sesame genotypes with Si application was non-significant for all the quality variables (Table 4). Among the sesame genotypes, the highest oil contents were recorded in genotype TS-3, which were statistically similar with genotype SG-170. The

genética de dichos genotipos (Sabiell *et al.*, 2015). Otros estudios reportaron diferencias entre las variables morfológicas y de rendimiento de los diversos genotipos de ajonjolí, bajo diferentes condiciones ambientales (Ogbonna y Ukaa, 2012; Revathi *et al.*, 2012; Ahmed y Ahmed, 2012, 2013; Chandramohan, 2014; Abate y Mekbib, 2015). Así, el genotipo TS-3 tuvo el rendimiento más alto debido al mayor peso de semillas y se debe cultivar en condiciones de secano. Esto puede ser útil para aumentar la producción de oleaginosas en Pakistán y reducir la carga de las importaciones de aceite, la cual tiene un alto costo para el presupuesto anual de dicho país.

La aplicación de 44 kg ha⁻¹ de Si aportó los mayores beneficios para mejorar la altura de las plantas, el rendimiento biológico y de semilla. La cantidad de semillas por cápsula y el índice de cosecha fue el más con la aplicación de 22 a 0 kg Si ha⁻¹, respectivamente (Cuadro 3). Silicio tiene una función vital en el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones óptimas y subóptimas (Ma, 2004; Ma y Yamaji, 2006) al mejorar el consumo de otros macro y micronutrientes (Bacchus, 2010), disminuir la tasa de transpiración (Ma *et al.*, 2006), mejorar la fotosíntesis (Agarie *et al.*, 1992) y participar en las actividades metabólicas, fisiológicas y estructurales de los cultivos (Liang *et al.*, 2003). Como resultado,

Table 4. Impact of silicon application at three levels on oil/protein contents and fatty acid composition of four sesame genotypes.
Cuadro 4. Impacto de la aplicación de tres niveles de silicio en los contenidos de aceite/proteínas y en la composición ácidos grasos de cuatro genotipos de ajonjolí.

	Oil content (%)	Protein content (%)	Stearic acid (%)	Palmitic acid (%)	Oleic acid (%)	Linoleic acid (%)
Genotypes (G)						
TS-3	40.2 a	19.0	4.26 a	6.37 b	41.8 a	38.5 b
SG-120	34.7 b	20.2	3.33 b	7.13 a	36.9 b	44.1 a
SG-169	35.9 b	19.8	3.87 ab	7.07 a	39.2 ab	43.2 a
SG-170	37.5 ab	19.4	3.98 a	6.83 ab	41.04 a	41.8 a
LSD (p≤0.05)	3.00	Ns	0.59	0.56	2.75	2.84
Silicon level (Si) (kg ha ⁻¹)						
0	35.4 b	19.4	4.07 a	7.23 a	38.6 b	39.8 b
22	37.3 a	19.6	3.84 ab	6.83 ab	39.7 ab	42.3 a
44	38.6 a	19.7	3.66 b	6.49 b	40.9 a	43.7 a
LSD (p≤0.05)	1.74	ns	0.30	0.51	1.38	1.93
G×Si	ns	ns	Ns	ns	ns	ns

Different letters indicate significant differences among the values in each column and individual factors (LSD test; p≤0.05); ns: non-significant ♦ Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los valores en cada columna y los factores individuales (prueba LSD; p≤0.05); ns=no significativo.

highest amount of stearic acid and oleic acid were found in the genotype TS-3, followed by SG-170 and SG-169, and the lowest content in SG-120. The percentage of palmitic acid and linoleic acid were higher in genotype SG-120 followed by SG-169 and SG-170, and the lowest percentage was found in TS-3. (Table 4). This indicates that the genotype TS-3 had the highest content of oil and oleic acid and the lowest content of palmitic acid, as well as a high seed yield potential. The higher contents of oleic acid in the seeds, and as a consequence in foods, would lower the blood cholesterol and blood pressure, protects against heart attack, improve the immune system and it is essential for brain functioning (Egger, 2017). The breeding of oilseed crops with high oleic acid has remained an ultimate objective of breeders since these oils have high stability against oxidation, which is desirable for frying and long terms storage of edible oils (Flagella *et al.*, 2002). But palmitic acid may enhance the incidence of heart attack, increase the blood cholesterol level and sometimes cause tumor formation (Fattore and Fanelli, 2013).

The differences within the sesame genotypes for oil contents and fatty acid profile might be due to the particular genetic makeup of that genotype and the environmental conditions prevailing during crop life cycle (Were *et al.*, 2006; Asghar and Majeed, 2013; Bhunia *et al.*, 2015; Kurt, 2018). Thus, Dwivedi *et al.* (1993) reported that the oil content decreases due to moisture stress at end of season, whereas Mustafa *et al.* (2015) found that temperature above 30 °C can significantly reduce the oil content since the higher temperature restricts the period for capturing radiation and, therefore, reduces the amount of oil accumulation within seeds. In our study, the climate of the experimental site was dry with temperature above 30 °C during the crop growth cycle; therefore, the low oil contents in some genotypes might be attributed to these environmental variables, as well as the genetic makeup of these genotypes. As compared to control without Si, the application of Si at 22 and 44 kg ha⁻¹ increased oil and linoleic acid content; besides, 44 kg Si ha⁻¹ increased oleic acid. In samples without Si or with 22 kg Si ha⁻¹, stearic and palmitic acid reached their highest level (Table 4).

CONCLUSIONS

There is a great variability in the response of the sesame genotypes to the variable rates of silicon

hubo un aumento del crecimiento, la biomasa, el rendimiento de la semilla y la calidad de los cultivos (Liang *et al.*, 2015). Éste también fue el resultado del presente estudio. Sin embargo, el incremento del rendimiento debido a la aplicación de Si se puede atribuir, de manera indirecta, a los efectos de Si en el ajuste del pH del suelo y la adquisición de macro y micro nutrientes (Liang *et al.*, 2015).

Variables de calidad

Los genotipos de ajonjolí difirieron significativamente en contenido de aceite, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico y ácido linoleico, pero los resultados no fueron significativos para el contenido de proteínas. La aplicación de Si afectó de manera significativa el contenido de aceite, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico y ácido linoleico, pero los resultados no fueron significativos para el contenido de proteína. La interacción de los genotipos de ajonjolí con la aplicación de Si no fue significativa en todas las variables de calidad (Cuadro 4). Entre los genotipos de ajonjolí, los contenidos mayores de aceite se registraron en el genotipo TS-3, los cuales fueron estadísticamente similares con el genotipo SG-170. El contenido más alto de ácido esteárico y ácido oleico se registró en el genotipo TS-3, seguido por SG-170 y SG-169, y el menor contenido en SG-120. El porcentaje de ácido palmítico y ácido linoleico fue mayor en el genotipo SG-120, seguido por el SG-169 y el SG-170, y el más bajo porcentaje se encontró en TS-3 (Cuadro 4). Esto indica que el genotipo TS-3 posee el contenido más alto de aceite y ácido oleico y el contenido más bajo de ácido palmítico, además de un alto potencial de rendimiento de semilla. Los contenidos más altos de ácido oleico en las semillas, y como consecuencia en los alimentos, reducirían el colesterol en la sangre y la presión sanguínea, protegerían contra los ataques al corazón, mejoran el sistema inmunológico y son esenciales para el funcionamiento del cerebro (Egger, 2017). La producción de oleaginosas con alto contenido de ácido oleico ha sido uno de los objetivos más importantes de los productores, debido a su alta estabilidad contra la oxidación, lo cual es deseable para freír y para el almacenamiento a largo plazo de esos aceites comestibles (Flagella *et al.*, 2002). Pero el ácido palmítico puede aumentar la incidencia de los ataques al corazón, elevar el nivel de colesterol en la sangre, y,

applied to the soil, and genotypes TS-3 and G-120 performed better under rainfed conditions of Pakistan. This better performance was visible through improvement in seed yield, oil and unsaturated fatty acids and reduced saturated fatty acid contents, as compared to control.

The farmers of the rainfed zones should apply silicon to boost the sesame yield. The genotypes TS-3 and G-120 should be grown under these environments for harvesting better seed and oil seed of sesame.

LITERATURE CITED

- Abate, M., and F. Mekbib. 2015. Study on genetic divergence in low-altitude sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm of Ethiopia based on agro morphological traits. J. Adv. Stud. Agric. Biol. Environ. Sci. 2: 78-90.
- Agarie, S., W. Agata, F. Kubota, and P. B. Kaufman. 1992. Physiological roles of silicon in photosynthesis and dry matter production in rice plants I. Effects of silicon and shading treatments. Jpn. J. Crop Sci. 61: 200-214.
- Ahmed, B. M. S., and F. A. Ahmed. 2012. Variability genotype's season interaction and characters association of some sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes under rainfed conditions of Sudan. Afr. J. Plant Sci. 6: 39-42.
- Ahmed, B. M. S., and F. A. Ahmed. 2013. Variability of yield and some morphological traits in some sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes under rain-fed conditions. Int. J. Agric. Sci. Res. 2: 54-59.
- Amjad, M. 2014. Oilseed crops of Pakistan. Status Paper, Plant Sciences Division, Pakistan Agricultural Research Council Islamabad. 40 p.
- Asghar, A., and M. N. Majeed. 2013. Chemical characterization and fatty acid profile of different sesame varieties in Pakistan. Am. J. Sci. Indus Res. 4: 540-545.
- Bacchus, G. L. 2010. An evaluation of the influence of biodynamic practices including foliar-applied silica spray on nutrient quality of organic and conventionally fertilised lettuce (*Lactuca sativa* L.). J. Org. Sys. 5: 4-13.
- Bachlava, E., and A. J. Cardinal. 2009. Correlation between temperature and oleic acid seed content in three segregating soybean population. Crop Sci. 49: 1328-1335.
- Bhunja, R. K., A. Chakraborty, R. Kaur, T. Gayatri, K. V. Bhat, A. Basu, M. K. Maiti, and S. K. Sen. 2015. Analysis of fatty acid and lignan composition of Indian germplasm of sesame to evaluate their nutritional merits. J. Am. Oil Chem. Soc. 92: 65-76.
- Chandramohan, Y. 2014. Variability and genetic divergence in sesame (*Sesamum indicum* L.). Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol. 5: 222-225.
- Dwivedi, S. L., S. N. Nigam, R. Jambunathan, K. L. Sahrawat, G. V. S. Nagabhushanam, and K. Raghunath. 1993. Effect of genotypes and environments on oil content and oil quality parameters and their correlation in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Peanut Sci. 20: 84-89.
- en ocasiones, causar la formación de tumores (Fattore y Fanelli, 2013).
- Las diferencias dentro de los genotipos de ajonjolí para los contenidos de aceite y el perfil de ácidos grasos pueden deberse a la estructura genética del genotipo y a las condiciones ambientales imperantes durante el ciclo de vida del cultivo (Were *et al.*, 2006; Asghar y Majeed, 2013; Bhunia *et al.*, 2015; Kurt, 2018). Así, Dwivedi *et al.* (1993) reportaron que el contenido de aceite disminuye debido al estrés hídrico al final de la temporada, mientras que Mustafa *et al.* (2015) encontraron que la temperatura mayor a 30 °C puede reducir significativamente el contenido de aceite dado que las temperaturas más elevadas restringen el período de captura de radiación y, por lo tanto, disminuye la cantidad de acumulación de aceite dentro de las semillas. En nuestro estudio, el clima del sitio experimental fue seco con temperatura sobre 30 °C durante el ciclo de crecimiento del cultivo; por lo tanto, los bajos contenidos de aceite en algunos genotipos se pueden atribuir a estas variables ambientales, así como a la estructura genética de estos genotipos. La aplicación de 22 y 44 kg Si ha⁻¹ aumentó el contenido de aceite y de ácido linoleico respecto al testigo sin Si; además, 44 kg Si ha⁻¹ incrementaron el contenido de ácido oleico. En las muestras sin Si o con 22 kg Si ha⁻¹ los ácidos esteárico y palmítico alcanzaron su mayor nivel (Cuadro 4).

CONCLUSIONES

La respuesta de los genotipos de ajonjolí a los niveles de Si aplicados en los suelos muestra gran variabilidad y los genotipos TS-3 y SG-120 se desempeñaron mejor en las condiciones de secano de Pakistán. Esta mejor respuesta fue visible por la mejora en el rendimiento de la semilla, el aceite y los ácidos grasos insaturados y por la reducción de los contenidos de los ácidos grasos saturados respecto al testigo.

Los campesinos de zonas de secano debieran aplicar silicio para estimular el rendimiento del ajonjolí. El cultivo de los genotipos TS-3 y SG-120 en estos ambientes proporcionaría una mejor semilla y un mejor aceite de ajonjolí.

—End of the English version—



- Egger, R. 2017. 13 Interesting Health Benefits of Oleic Acid+Negatives. <https://selfhacked.com/blog/oleic-acid-benefits/> (Access: January 2019).
- Fattore, E., and R. Fanelli. 2013. Palm oil and palmitic acid: a review on cardiovascular effects and carcinogenicity. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64: 648-659.
- Flagella, Z., T. Rotunno, E. Tarantino, R. D. Caterina, and A. D. Caro. 2002. Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and water regime. *Eur. J. Agron.* 17: 221-230.
- Font, R., M. D. R. Celestino, and A. D. Haro-Bailón. 2006. The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Indust. Crops Prod.* 24: 307-313.
- Gharby, S., H. Harhar, Z. Bouzoubaa, A. Asdadi, A. El Yadini, and Z. Charrouf, 2015. Chemical characterization and oxidative stability of seeds and oil of sesame grown in Morocco. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 16: 105-111.
- Government of Pakistan. 2015. Economic Survey of Pakistan. Government of Pakistan, Finance Division, Islamabad. Chapter 2, Agriculture. pp: 23-41.
- Kurt, C. 2018. Variation in oil content and fatty acid composition of sesame accessions from different origins. *Grasas y Aceites.* 69: 241.
- Liang, Y., M. Nikolic, R. Bélanger, H. Gong, and A. Song. 2015. Effect of silicon on crop growth, yield and quality. *In: Silicon in Agriculture.* Springer, Dordrecht. pp: 209-223.
- Liang, Y., Q. Chen, W. Zhang, and R. Ding. 2003. Exogenous silicon increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in root of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 160: 1157-1167.
- Ma, J. F. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 50: 11-18.
- Ma, J. F., and N. Yamaji. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant. Sci.* 8.
- Ma, J. F., K. Tamai, N. Yamaji, N. Mitani, S. Konishi, M. Katsuhara, M. Ishiguro, Y. Murata, and M. Yano. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688-691.
- Mustafa, H. S. B., N. Batool, Z. Iqbal, E. Hasan, and T. Mahmood. 2015. Effect of fruit position and variable temperature on chemical composition of seeds in brassica, cotton, sunflower and maize crops. *Researcher* 7: 51-67.
- Obiajunwa, E. I., F. M. Adebiyi, and P. E. Omode. 2005. Determination of essential minerals and trace elements in Nigerian sesame seeds, using TXRF-Technique. *Pak. J. Nutr.* 4: 393-395.
- Ogbonna, P. E., and S. I. Ukaa. 2012. Yield evaluation of 13 sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions in the derived savannah agro-ecology of southeastern Nigeria. *Afr. J. Agric. Res.* 7: 5772-5778.
- Orsavova, J., L. Misurcova, J. V. Ambrozova, R. Vicha, and J. Mlcek. 2015. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 12871-12890.
- Revathi, S., J. A. John, and N. Manivannan. 2012. Genetic variability in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Elect. J. Plant Breed.* 3: 692-694.
- Sabiel, S. A. I., M. I. Ismail, E.A. Abdalla, and A.A. Osman. 2015. Genetic variation in sesame genotypes (*Sesamum indicum* L.) grown in the semi-arid zone of the Sudan. *SABRAO J. Breed. Genet.* 47: 214-220.
- Sato, T., K. Eguchi, T. Hatano, and Y. Nishiba. 2008. Use of near-infrared reflectance spectroscopy for the estimation of isoflavone content in soyabean seeds. *Int. J. Pt. Prod. Sci.* 11: 481-486.
- Steel, R. G. D., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and Procedures of Statistics: A Biometric Approach. 3rd Ed. McGraw Hill Book Co. Inc. New York. USA. 672 p.
- Uzun, B., I. Arslan, and E. Furat. 2008. Variation in fatty acid compositions, oil content and oil yield in a germ plasm collection of sesame (*Sesamum indicum* L.). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85: 1135-1142.
- Were, B. A., A. O. Onkware, S. Gudu, M. Welander, and A. S. Carlsson. 2006. Seed oil content and fatty acid composition in East African sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions evaluated over 3 years. *Field Crops Res.* 97: 254-260.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PRECIPITACIÓN Y RADIACIÓN SOLAR EN EL RENDIMIENTO DE MAÍZ EN EL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO

INFLUENCE OF TEMPERATURE, PRECIPITATION AND SOLAR RADIATION ON MAIZE YIELD IN THE VALLEY OF TOLUCA MÉXICO

Alejandro Morales-Ruiz*, Ernesto Díaz-López

Ingeniería en Agricultura Sustentable y Protegida. Universidad Tecnológica de Tehuacán, Pro-longación de la 1 sur No. 1101 San Pablo Tepetzingo Tehuacán Puebla, México. C.P. 75859. (alejandro.morales@uttehuacan.edu.mx)

RESUMEN

Los factores ambientales y su variación influyen en el crecimiento, desarrollo y rendimiento del maíz (*Zea mays* L.) en valles altos como el de Toluca, México. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la temperatura, precipitación y radiación en los ciclos de cultivo 2008, 2009 y 2010 en el rendimiento de seis cultivares de maíz. La hipótesis fue que temperatura, precipitación y radiación solar en el valle de Toluca afectarán positiva y significativamente el rendimiento de maíz. El estudio se desarrolló en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas (UAE-Mex). Los datos de las normales climatológicas estudiadas se obtuvieron de la estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Comisión Nacional del Agua, estación Calixtlahuaca y del Centro de Investigación de Ciencias Agrícolas de la UAEMex. Estos datos se analizaron con ANDEVA ($p < 0.05$), y el diseño experimental fue completamente al azar. Los tratamientos fueron los años y tres datos de cada variable fueron las repeticiones. Los resultados indicaron que existieron diferencias significativas en precipitación, pero las diferencias en temperatura y radiación no fueron significativas. La precipitación mayor (941.3 mm) ocurrió en 2008 y superó estadísticamente a 2009, (750 mm) y 2010 (579.3). La disminución de la lluvia en 2009 y 2010, respecto a 2008, fue 20.3 y 38.4%. El rendimiento de maíz mayor (1132.6 g m⁻²) se obtuvo en 2008 porque la disponibilidad mayor de lluvia durante el ciclo del cultivo coincidió con el llenado de grano, en un efecto de sincronización con las etapas fenológicas R₃ y R₆. La conclusión es que la heterogeneidad en la precipitación limitó el rendimiento del cultivo, así como la duración del ciclo.

Palabras clave: *Zea mays* L., normales climatológicas, precipitación, temperatura, radiación, rendimiento de maíz.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2018. Aprobado: octubre, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 377-385. 2019.

ABSTRACT

Environmental factors and their variation affect growth, development and yield of maize (*Zea mays* L.) in high valleys such as the Valley of Toluca, Mexico. The objective of this study was to evaluate the effect of temperature, precipitation and radiation on the 2008, 2009, and 2010 crop cycles on the yield of six maize cultivars. The hypothesis was that temperature, precipitation and solar radiation in the Valley of Toluca will positively and significantly affect maize yield. The study was conducted in the Facultad de Ciencias Agrícolas of the Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas (UAE-Mex). The data of the climate normals under study were obtained from the meteorological station of the Facultad de Ciencias Agrícolas, Comisión Nacional del Agua, Calixtlahuaca Station, and the Centro de Investigación en Ciencias Agrícolas (UAEMex). These data were analyzed with ANOVA ($p \leq 0.05$), and the experimental design was completely randomized. Treatments were the years and three data of each variable were the replications. Results indicated that there were significant differences in precipitation, but differences in temperature and radiation were not significant. The highest precipitation (941.3 mm) occurred in 2008 and statistically surpassed that of 2009 (750 mm) and 2010 (579.3 mm). Rainfall was reduced in 2009 and 2010 by a 20.3 and a 38.4% decrease, compared to 2008. The greatest maize yield (1132.6 g m⁻²) was obtained in 2008 because greater availability of rainfall within the crop cycle coincided with grain fill; this was an effect of synchronization with the R₃ and R₆ phenological stages. Thus, we concluded that heterogeneity in precipitation limited maize yield, and also the extent of the crop cycle.

Key words: *Zea mays* L., climate normals, precipitation, temperature, radiation, maize yield.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es básico en la alimentación humana (Lardizabal, 2012), ya que aporta carbohidratos de fácil digestión y es fuente de energía para las funciones celulares (Castañeda, 2011). También se utiliza como forraje, para la extracción de grasas y la síntesis de biocombustibles, como etanol E₅ y E₁₀ (Núñez y Ayala, 2009). La disponibilidad del grano para abastecer los usos anteriores recibe influencia de elementos del ambiente como: la precipitación pluvial, temperatura y radiación solar (Garay y Cruz 2015).

El rendimiento de los cultivos es el resultado de la interacción entre el genotipo y el ambiente; a partir de ella, al fenotipo lo determina la ecuación $F = A + G + (GA)$, donde: F es el fenotipo, A el ambiente, G el genotipo y (GA) es la interacción entre el genotipo y el ambiente (Márquez, 1992). El ambiente es uno de los factores que determina el establecimiento de una especie agrícola en un lugar determinado. El ambiente se define desde el punto de vista biológico como un conjunto de cinco grupos que interactúan holocenóticamente entre sí; es decir, que ninguno actúa de manera independiente.

Estos grupos en orden de importancia son: climático, edáfico, geográfico, bióticos y pírco (Krebs, 1999; Biasutti y Galiñanes, 2001; Sutton y Harmon, 2001; Osuna *et al.*, 2008). De los anteriores, quizá el que tiene mayor influencia sobre los cultivos es el climático, y está definido por la temperatura y la precipitación del lugar, además de la radiación incidente, (Monasterio *et al.*, 2008; Olivera, 2013). La temperatura de un lugar obedece a la radiación y a la exposición del sitio a la masas de viento, aguas, corrientes marinas y la topografía, lo que provoca dos tipos de variación; vertical y horizontal (Casas y Alarcón, 1999; Rodríguez *et al.*, 2004). La precipitación es otra característica ambiental que depende de la latitud, altitud y topografía. Aunque Ortiz (1986) señaló que el periodo de lluvias, así como las estaciones del año, se originan por la inclinación de la tierra (23° 27') en su eje, lo cual limita las zonas agrícolas y las fechas de siembra.

La radiación solar es la cantidad de energía radiante que emite el sol y llega a la superficie terrestre. La latitud y la nubosidad de un sitio limitan la radiación porque a mayores latitudes, debido al ángulo de incidencia, los rayos solares tienen que atravesar

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is basic human food (Lardizabal, 2012) that supplies easily digested carbohydrates and it is an energy source for cell functions (Castañeda, 2011). It is also used as forage, for extraction of fats and synthesis of biofuels such as ethanol E₅ and E₁₀ (Núñez and Ayala, 2009). The availability of grain to meet these demands is affected by environmental elements such as rainfall, temperature and solar radiation (Garay and Cruz 2015).

Crop yield is the result of the interaction between the genotype and its environment. From these elements, phenotype is determined by the equation $F = E + G + (GE)$, where F is the phenotype and E is the environment, G is the genotype, and (GE) is the interaction between genotype and environment (Márquez, 1992). The environment is one of the factors that determine establishment of a crop species in a given location. It is defined, from a biological point of view, as a set of five groups that interact with each other holocenotically; that is, none acts independently.

These groups in order of importance are climatic, edaphic, geographic, biotic and pyric (Krebs, 1999; Biasutti and Galiñanes, 2001; Sutton and Harmon, 2001; Osuna *et al.*, 2008). Of these, perhaps the one that most affects crops is climate, which is defined by on-site temperature and precipitation, as well as incident solar radiation (Monasterio *et al.*, 2008; Olivera, 2013). Temperature follows radiation and on-site exposure to winds, water, oceanic currents and topography, which cause two types of variation: vertical and horizontal (Casas and Alarcón, 1999; Rodríguez *et al.*, 2004). Another environmental feature is precipitation, which is dependent on latitude, altitude and topography. Although Ortiz (1986) indicated that the rainy season, as well as the seasons of the year, are due to the inclination of the earth's axis (23° 27'), which delimits agricultural zones and planting dates.

Solar radiation is the amount of radiant energy emitted by the sun that reaches the Earth's surface. Latitude and the cloud cover on a given location limit radiation because at higher latitudes and due to the angle of incidence, sunrays get through a greater width of the atmosphere. This limitation causes the amount of incident energy to decrease, although this

una amplitud mayor de la capa atmosférica. Esta limitación causa una disminución en la cantidad de energía incidente, aunque esto no ocurre en latitudes cercanas al ecuador. Sin embargo, en altitudes mayores repercute en el fotoperiodo y afecta también la distribución de especies vegetales, las cuales tienden a adaptarse al medio con cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos en respuesta plástica a dicho factor (Torres, 2011; Taiz y Zeiger, 2002).

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de la temperatura, la precipitación y la radiación solar en el rendimiento de seis cultivares de maíz en el valle de Toluca, México. La hipótesis fue que temperatura, precipitación y radiación solar afectarán positiva y significativamente el rendimiento agronómico de cultivares de maíz en tres densidades de siembra en el valle de Toluca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Campus El Cerrillo, Piedras Blancas, 19° 24' N, 99° 54' O y 2611 m de altitud. El clima es Cw1 (w')eg, que corresponde a templado con temperatura media anual entre 12 y 18 °C, precipitación mayor a 600 mm y menor a 1200 mm, cuyo régimen de lluvia abarca de mayo a septiembre, con presencia de sequía intraestival (canícula). La oscilación de la temperatura es mayor a 7 °C y menor a 14 °C; el mes más cálido es mayo, antes del solsticio de verano (García, 2005).

El germoplasma utilizado consistió de cariósides de seis cultivares de maíz, tres de polinización libre (Jiquipilco, Cacahuacintle y Amarillo Almoloya) y tres híbridos (Cóndor, H-50 y Z-60), los cuales se sembraron en 2008, 2009 y 2010, en tres densidades. El diseño experimental fue bloques completos al azar, con arreglo de parcelas divididas. Las parcelas experimentales fueron cinco surcos de 5 m de largo, separados por 0.80 m. La parcela útil fue el surco central con 1 m de distancia para eliminar el efecto de borde.

En el análisis, los cultivares fueron la parcela grande (alfa) y las densidades fueron la parcela chica (beta). Estos se evaluaron con el modelo matemático $Y_{ijk} = \mu + B_k + \alpha_i + U_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, donde Y_{ijk} es la variable respuesta del i -ésimo cultivar en la j -ésima densidad del k -ésimo bloque; μ , es la media general verdadera, B_k , es el efecto del k -ésimo bloque o repetición; α_i , es el efecto del i -ésimo cultivar (parcela grande); U_{ik} , es el error aleatorio de la parcela grande; β_j , es el efecto de la j -ésima densidad (parcela chica); $(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción cultivar $\times$ densidad

does not occur at latitudes close to the equator. But at higher latitudes it has repercussions on photoperiod and plant species distribution, because species must adapt to the environment through morphological, anatomic and physiological changes in a plasticity response to this factor (Torres, 2011; Taiz and Zeiger, 2002).

The objective of this study was to determine the effects of temperature, rainfall and solar radiation on the yield of six maize cultivars grown in the Valley of Toluca, Mexico. The hypothesis was that temperature, precipitation and solar radiation will positively and significantly affect agronomic yield of maize cultivars grown at three plant densities in the Valley of Toluca.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in the experimental fields of the Facultad de Ciencias Agrícolas of the Universidad Autónoma del Estado de Mexico, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas, 19° 24' N, 99° 54' W, at an altitude of 2611 m. The climate is Cw₁(w')eg, which is temperate with a mean annual temperature from 12 to 18 °C, precipitation above 600 mm and lower than 1200 mm; the precipitation regime is from May to September with a short mid-summer drought (a.k.a. *canícula*). Temperature oscillation is greater than 7 °C and less than 14°C. The hottest month is May, before the summer solstice (García, 2005).

The germplasm used consisted of caryopses of six maize cultivars: three free-pollinating (Jiquipilco, Cacahuacintle and Amarillo Almoloya) and three hybrids (Cóndor, H-50 and Z-60). These cultivars were planted in 2008, 2009 and 2010 at three densities. The experimental design was a divided plot arrangement within complete randomized blocks. Five rows 5 m long separated by 0.80 m were experimental plots. And the useful plot was the central row at a distance of 1 m to eliminate the border effect.

In the analysis, cultivars were the large plot (alpha) and densities were the small plot (beta). These were evaluated with the mathematical model $Y_{ijk} = \mu + B_k + \alpha_i + U_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, where Y_{ijk} is the response variable of the i -th cultivar at the j -th density of the k -th block; μ is the true general mean; B_k is the effect of the k -th block or replication; α_i is the effect of the i -th cultivar (large plot); U_{ik} is the random error of the large plot; β_j is the effect of the j -th density (small plot); $(\alpha\beta)_{ij}$ is the interaction cultivar $\times$ density; and ε_{ijk} is the experimental error of the i -th cultivar at the j -th density of the k -th replication (Cochran and Cox, 1990; Infante and Zarate, 1999).

y ε_{ijk} , es el error experimental del i -ésimo cultivar en la j -ésima densidad de la k -ésima repetición (Cochran y Cox 1990; Infante y Zarate 1999).

Durante el experimento se registraron las etapas fenológicas V_n , que corresponden a las etapas vegetativas, R_n , reproductivas, con énfasis en la etapa R_3 , el estado del grano lechoso y R_6 , madurez fisiológica; con base en las claves de Torres (2011).

Para determinar diferencias significativas entre años en las variables temperatura, precipitación y radiación, como diseño experimental completamente al azar se realizó un ANDEVA de las normales climatológicas que se evaluaron con el modelo matemático: $Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$, donde Y_{ij} es la variable respuesta del i -ésimo tratamiento en la j -ésima repetición; μ , es la media general verdadera; T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento; ε_{ij} es el error experimental del i -ésimo tratamiento en la j -ésima repetición.

La variable respuesta de esta etapa del experimento fue el rendimiento del maíz el cual se determinó pensando el grano de 10 mazorcas con humedad del 14% y se obtuvo el promedio correspondiente de una muestra representativa de 1 m² (Steel y Torrie, 2005). A las variables significativas se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diagramas ombrotérmicos en 2008, 2009 y 2010

La temperatura máxima ($T_{\max}$) en el 2008 fluctuó entre 24.4 y 18.4 °C y presentó oscilación de 6 °C; así, el valor mayor de $T_{\max}$ ocurrió en la primera decena de mayo, y la $T_{\max}$ menor durante la primera decena de julio (Figura 1). La temperatura mínima ($T_{\min}$) osciló de 5 a 9.6 °C, con una variación de 4.6 °C, el valor mínimo extremo de temperatura mínima se presentó en la tercera decena de mayo y el límite mayor de $T_{\min}$ se registró en la segunda decena de septiembre. En el 2009 la oscilación de las temperaturas máximas y mínimas fue de 6.5 y 5.4 °C, respectivamente. Una tendencia similar ocurrió también en el 2010 (Figura 1).

La precipitación mayor y con mejor distribución ocurrió durante el ciclo del cultivo en 2008. En 2009 los volúmenes mayores se registraron en la tercer decena de junio y la primera de septiembre; mientras que en 2010 la precipitación mayor fue en julio (Figura 1). La precipitación en 2008 coincidió con la floración masculina y femenina del cultivo, a diferencia de los años subsecuentes. En estas condiciones de precipitación y temperatura durante los tres años de estudio, el cultivo alcanzó la madurez fisiológica sin limitaciones.

During the experiment the following phenological stages were recorded: V_n , vegetative stages; and R_n , reproductive stages; with emphasis on stage R_3 , the milky grain stage, and R_6 physiological maturity; based on the classification keys of Torres (2011).

In order to determine significant differences among years for the variables temperature, precipitation and radiation, following a completely randomized experimental design, an ANOVA was performed on the climate normals, which were evaluated with the mathematical model $Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$, where Y_{ij} is the response variable of the i -th treatment in the j -th replication; μ is the true general mean; T_i is the effect of the i -th treatment; ε_{ij} is the experimental error of the i -th treatment in the j -th replication.

The response variable at this stage of the experiment was maize yield, which was determined by weighing the grain from 10 ears with 14% humidity and the corresponding average was calculated from a representative sample of 1 m² (Steel and Torrie, 2005). For the significant variables, means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Ombrothermic diagrams in 2008, 2009 and 2010

Maximum temperature ($T_{\max}$) in 2008 fluctuated between 24.4 and 18.4 °C with an oscillation of 6 °C. The highest $T_{\max}$ occurred in the first group of ten days in May and the lowest $T_{\max}$ during the first group of ten days in July (Figure 1). Minimum temperature ($T_{\min}$) oscillated from 5 to 9.6 °C with a variation of 4.6 °C. The lowest $T_{\min}$ during the crop cycle occurred in the third group of ten days in May, and the maximum $T_{\min}$ limit was recorded in the second group of ten days in September. In 2009, maximum and minimum temperatures fluctuated with oscillations of 6.5 and 5.4 °C, respectively. A similar trend also occurred in 2010. (Figure 1).

The highest and best distributed rainfall occurred during the 2008 crop cycle. In 2009, greater volumes were recorded in the third group of ten days in June, and in the first group of ten days in September, while in 2010 the highest rainfall was in July (Figure 1). Rainfall in 2008 coincided with masculine and feminine maize flowering, unlike those subsequent years. Under these conditions of rain and temperature during the three years of study, the crop attained physiological maturity with no limitations.

Our data coincide with those reported by Díaz *et al.* (2013) and Contreras *et al.* (2012), who indicated

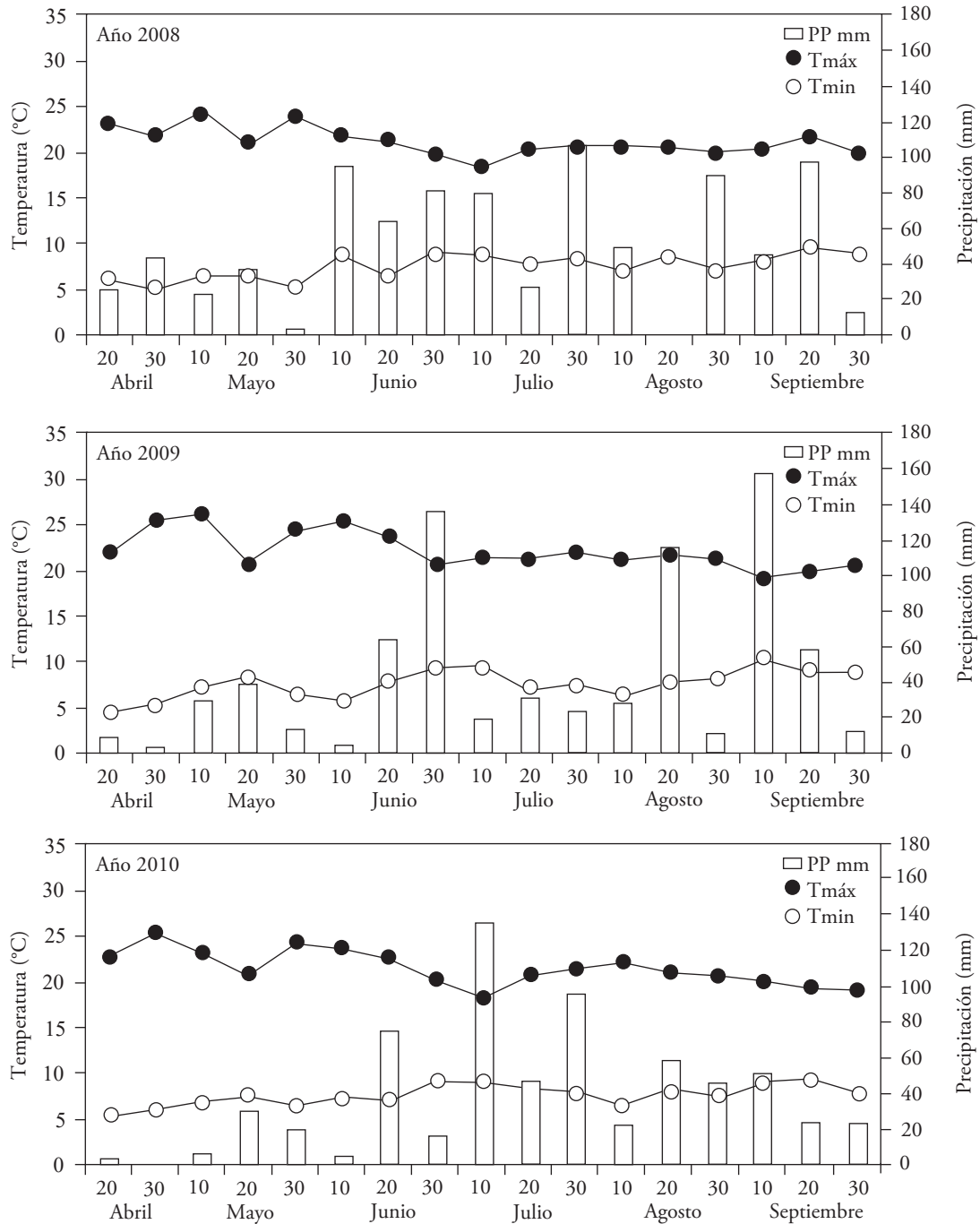


Figura 1. Distribución del promedio decenal de las temperaturas máximas y mínimas y la suma decenal de la precipitación en el valle de Toluca, México; en los ciclos de cultivo de maíz 2008, 2009 y 2010.

Figure 1. Distribution of 10d- averages in maximum and minimum temperatures and the 10d- sum of precipitation in the Valley of Toluca, Mexico, during the maize crop cycles 2008, 2009 and 2010.

Los datos de nuestra investigación coinciden con los reportados por Díaz *et al.*, (2013) y Contreras *et al.* (2012), quienes señalaron que las temperaturas máximas y mínimas para la zona de estudio fluctúan entre 5.9 y 24 °C, con una precipitación de 750 a 1200 mm. Esta congruencia de los datos se debe a que los estudios se realizaron en el mismo lugar, aunque en diferentes años; lo cual muestra la estabilidad del temporal en el sitio, a través de las normales climatológicas.

Rendimiento en relación con radiación fotosintéticamente activa, temperatura y precipitación

El rendimiento del maíz se analizó en relación con las variables radiación fotosintéticamente activa (RFA), temperatura y precipitación (Figura 2). El rendimiento no fue afectado por las variables radiación y temperatura, ya que ambas están estrechamente correlacionadas; sin embargo, la precipitación fue significativa. La precipitación mayor (941.3 mm) ocurrió en el año 2008, y en 2009 y 2010 disminuyó 20.2 y 38.5%, respectivamente; el rendimiento mostró estadísticamente el mismo comportamiento. El rendimiento de maíz mayor se obtuvo en 2008 (1132 g m⁻²), y fue menor en 2009 (951 g m⁻²) y 2010 (964 g m⁻²). Esto coincide con Bergamaschi *et al.* (2006), quienes indicaron que el déficit hídrico causa impacto mayor sobre el rendimiento de grano cuando se presenta durante la floración.

Además, Luna (2010) mencionó que el rendimiento medio de grano en maíz en la zona de Zacatecas varió significativamente debido a la diferencia en la cantidad y distribución de la precipitación. Lafitte y Edmeades (1994; citados por Yzarra *et al.*, 2010) indicaron que el cultivo de maíz necesita por lo menos 500 a 700 mm de precipitación bien distribuidos durante su ciclo para llegar a madurez fisiológica.

Análisis de varianza y comparación de medias para las normales climatológicas

Las diferencias en precipitación fueron significativas, pero no así en temperatura y radiación (Cuadro 1). Esto indicó poca variación en las variables meteorológicas durante el desarrollo de la investigación. Respecto a la comparación múltiple de la precipitación, la mayor ocurrencia fue durante el 2008,

that maximum and minimum temperatures for the study region fluctuate between 5.9 and 24 °C with precipitation of 750 to 1200 mm. This consistency in data occurs because the studies were conducted in the same location, although in different years; showing the rainfed season stability on the site, through the records of the climate normals.

Yield in relation to photosynthetically active radiation, temperature and precipitation

Maize yield was analyzed in relationship to the variables (RFA) photosynthetically active radiation, temperature and precipitation (Figure 2). Yield was not affected by radiation or temperature since the two variables are closely correlated. However, precipitation was significant. The highest rainfall (941.3 mm) occurred in 2008, while in 2009 and 2010 it was 20.2 and 38.5% lower, respectively, and yield showed statistically the same behavior. The highest maize yield was obtained in 2008 (1132 g m⁻²); and it was lower in 2009 (951 g m⁻²) and 2010 (964 g m⁻²). This result is consistent with Bergamaschi *et al.* (2006), who found water deficit has a greater impact on grain yield when it occurs during flowering.

In addition, Luna (2010) reported that mean yield of maize grain in the state of Zacatecas varied significantly due to the difference in quantity and distribution of rainfall. Lafitte and Edmeades, (1994), cited by Yzarra *et al.*, (2010) indicated that maize needs at least 500 to 700 mm of well-distributed rainfall during crop cycle to attain physiological maturity.

Analysis of variance and comparison of means on climate normals

Differences in precipitation were significant, but those in temperature and radiation were not (Table 1). This indicated little variation in meteorological variables during the term of the research. Regarding the multiple comparison of precipitation, the highest occurrence was that of 2008, 941.3 mm along the crop cycle, statistically surpassing those of the other two years. In 2009, precipitation was 750 mm, and in 2010 rainfall record was only 579.3 mm. Rainfall decrease in 2009 and in 2010, compared to 2008, were 20.3 and 38.4%, respectively.

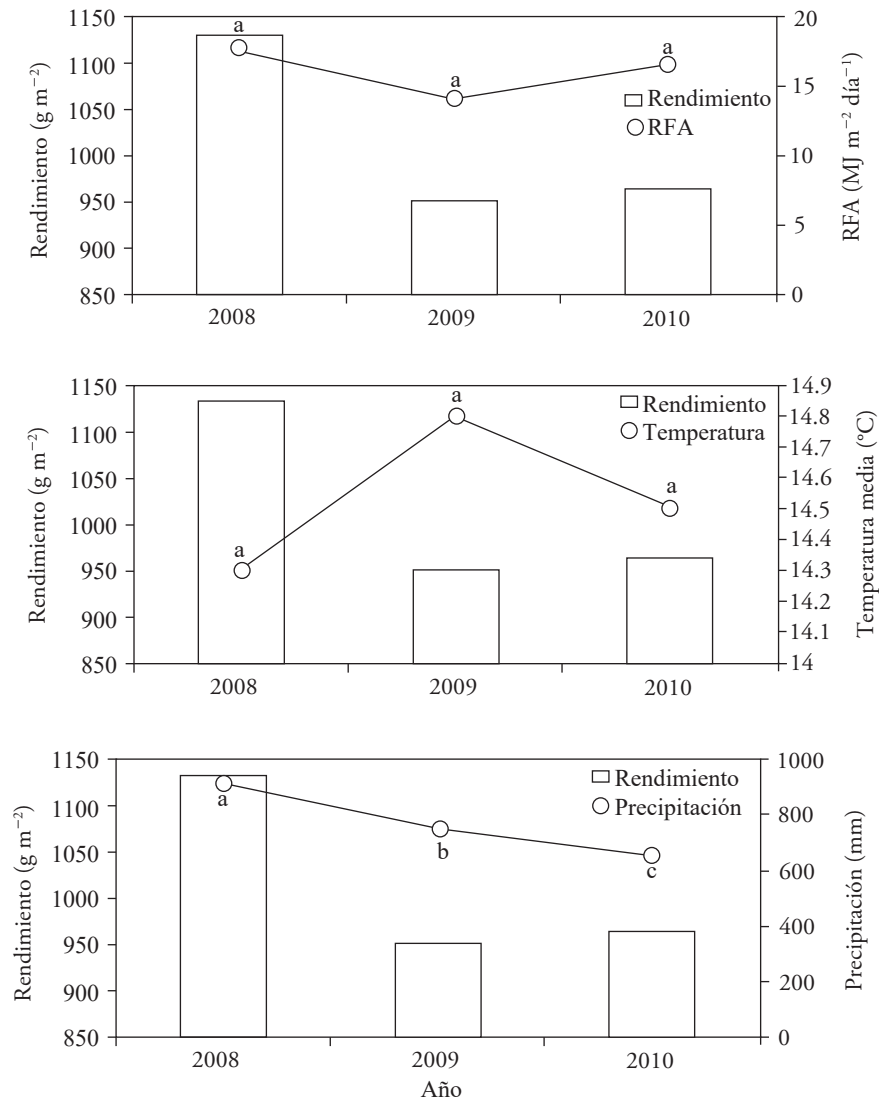


Figura 2. Rendimiento de maíz en relación con radiación, temperatura y precipitación en tres años de cultivo (2008 - 2010), en el valle de Toluca, México. RFA, radiación fotosintéticamente activa; MJ, mega Joules; g gramos; m, metro; mm, milímetros. Letras diferentes indican relación estadística significativa ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Maiz yield in relation to radiation, temperature and precipitation in three crop years (2008 - 2010) at the Valley of Toluca, Mexico. RFA, photosynthetically active radiation; MJ, mega Joules; g, grams; m, meter; mm, millimeters. Different letters indicate a significant statistical relationship ($p \leq 0.05$).

con 941.3 mm durante el ciclo del cultivo y superó estadísticamente a los otros años. En el 2009 la precipitación fue 750 mm y en 2010 solo se registraron 579.3 mm de lluvia. La disminución de lluvia en 2009 y en 2010 respecto a 2008, fue 20.3 y 38.4%, respectivamente.

Estos eventos del tiempo atmosférico se explican por la presencia del fenómeno del Niño, el cual ocurrió durante agosto en 2009 y redujo la preci-

These weather events can be explained by the presence of El Niño, which occurred in August 2009 and reduced precipitation, while in 2010 it occurred in May, as it is shown by the ombrothermic diagrams (Figure 1). These data agreed with information from the Comisión Nacional del Agua (Mexican National Water Commission) (CONAGUA, 2012) in a national water table data originated by precipitation in 2008, which was higher than those

Cuadro 1. Análisis de varianza y prueba de comparación de medias, de las normales climatológicas temperatura, precipitación y radiación, en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en el valle de Toluca, México, en función del año.

Table 1. Analysis of variance and comparison of means test on the climate normals temperature, precipitation, and radiation in three years (2008-2010) of maize (*Zea mays* L.) cultivation at the Valley of Toluca, Mexico.

Tratamiento	Temperatura °C	Precipitación mm	RFA MJ m ⁻² d ⁻¹
2008	14.3 a	941.3 a	17.7 a
2009	14.8 a	750.0 b	14.2 a
2010	14.5 a	579.3 c	16.5 a
DSH	5.13	138.40	7.51
CV %	13.76	7.30	18.59
ANDEVA	n.s	†	n.s

Medias con letra diferente indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). RFA, radiación fotosintéticamente activa; DSH, diferencia significativa honesta; CV, coeficiente de variación; ANDEVA, análisis de varianza; n.s, no significativo. †significativo con $p \leq 0.05$

♦ Means followed by different letters are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$). RFA, photosynthetically active radiation; DSH, honest significant difference; CV, coefficient of variation; ANDEVA, analysis of variance; n.s., not significant. †significant ($p \leq 0.05$).

pitación, mientras que en el 2010 ocurrió durante el mes mayo, como lo muestran los diagramas ombrotérmicos (Figura 1). Los datos se corroboraron con la información de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2012) en una lámina nacional originada por la precipitación durante el 2008, superior a 2009 y 2010. Además, coinciden con Ruíz y Pabón (2013) quienes publicaron que un fenómeno de El Niño débil provocó un incremento en las lluvias en 2009 y 2010 en Colombia, mientras que en latitudes superiores a los 15° Norte y Sur pudo ocasionar disminuciones de ligeras a moderadas en la precipitación y como consecuencia, afectar el rendimiento agronómico de los cultivos.

CONCLUSIONES

Las variaciones en la precipitación pluvial en el valle de Toluca afectaron el rendimiento del maíz durante los años 2009 y 2010, ya que en ambos el rendimiento y la precipitación fueron menores que en 2008. Los cambios en la temperatura y la radiación no afectaron el rendimiento de maíz; pero la distribución heterogénea de la precipitación no permitió el rendimiento máximo del cultivo.

Por lo tanto, es necesario considerar estos factores meteorológicos de la zona para el establecimiento del cultivo de maíz. La selección del cultivar más adecuado,

observed in 2009 and 2010. Data also coincides with Ruíz and Pabón (2013), who reported that a weak El Niño occurrence caused an increase on rainfall in Colombia, both in 2009 and 2010; whilst at higher latitudes than 15° North and South, it could cause slight to moderate decrease in precipitation, consequently affecting crop yields.

CONCLUSIONS

Variations in rainfall in the Valley of Toluca affected maize yield during 2009 and 2010. In both years, yield and rainfall were lower than those in 2008. Changes in temperature and radiation did not affect maize yield, but the heterogeneous distribution of rainfall did not allow to reach the maximum crop yield.

Therefore, it is necessary to consider these local meteorological factors when maize cultivation is established. Selection of the most adequate cultivar, which exhibits greater phenotypic plasticity, thus adapting to the heterogeneity of precipitation would be the better choice, since this factor limits the productivity of maize.

—End of the English version—

-----*-----

que presente una mayor plasticidad fenotípica, y se adapte a la heterogeneidad de la precipitación sería la mejor opción, pues este factor limita la productividad del cultivo de maíz.

LITERATURA CITADA

- Bergamaschi B., G. A. Dalmago., F. Comiran., J. I. Bergonci., A. G. Müller., S. Franca., A. O. Santos., B. Radin., C. A. Mene-gasi. e P. G. Pereira. 2006. Déficit hídrico e productividad na cultura do milho. *Pesq. Agrop. Bras.* 41: 243-249.
- Biasutti C. A. y V. A. Galiñanes. 2001. Influencia del ambiente de selección sobre la germinación de maíz (*Zea mays* L.) bajo estrés hídrico. *Relaciones entre caracteres de plántula con el rendimiento a campo. Agriscientia.* 18: 37-44.
- Casas C. M. C. y M. Alarcón. 1999. *Meteorología y clima.* Ed. UPC. Barcelona, España. 155 p.
- Castañeda S. A. 2011. Propiedades nutricionales y antioxidantes del maíz azul (*Zea mays* L.). *Temas Selec. Ing. de Alimentos.* 5: 75-83.
- Cochran W. G. y M. Cox G. 1990. *Diseños experimentales.* Ed. Trillas, México, DF. 661 p.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2012. Programa Nacional Hídrico. 2ª Ed. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, DF. 163 p.
- Contreras R. A., C. M. Martínez R. y G. Estrada C. 2012. Eficiencia en el uso de la radiación por híbridos de maíz de valles altos de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 35: 161-169.
- Díaz L. E. J. M. Loeza C., J. M. Campos P., E. J. Morales R., A. Domínguez L., O. Franco M. 2013. Eficiencia en el uso de la radiación, tasa de asimilación neta e integral térmica en función del fósforo en maíz (*Zea mays* L.). *Agrociencia.* 47: 135-146.
- Garay J. A y Cruz C. J. 2015. *El cultivo de maíz en San Luis.* Ed. INTA. Buenos Aires, Argentina 31 p.
- García E. 2005. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana. Instituto de Geografía. UNAM. México, DF. 98 p.
- Infante G. S. y G. P. Zarate D. 1990. *Métodos estadísticos: Un enfoque multidisciplinario.* Ed. Trillas. México, DF. 643 p.
- Krebs J. Ch. 1999. *Ecological Methodology.* 2 ed. Benjamin Cummings. San Francisco, CA. USA. 620 p.
- Lardizabal, R. 2012. Producción de maíz bajo el manejo integrado de cultivo. USAID. Honduras. 80 p.
- Luna F. M. 2010. Rendimiento de maíz en un año lluvioso y uno seco. *Inv. Cient.* 6: 1-13.
- Márquez S. F. 1992. *Genotecnia Vegetal. Métodos-Teorías-Resultados.* Tomo I. AGT Editor. México, DF. 357 p.
- Monasterio P., P. García., G. Alejos., A. Pérez., J. Tablante., W. Maturret. y L. Rodríguez. 2008. Influencia de la precipitación sobre el rendimiento de maíz: caso híbridos blancos. *Agron. Trop.* 58: 69-72.
- Núñez G. L. D. y D. A. Ayala O. 2009. Impacto de la producción de bioetanol en el mercado del maíz. Un análisis desde la dinámica de sistemas. *Econ. y Soc.* 14: 105-124.
- Olivera V., S. M. 2013. La productividad del maíz de temporal en México: repercusiones del cambio climático. División de desarrollo sostenible y asentamientos humanos. CEPAL. Santiago de Chile. 24 p.
- Ortiz S. C. A. 1986. *Elementos de Agrometeorología Cuantitativa con Aplicaciones a la República Mexicana.* 3 ed. Chapingo, México. 327 p.
- Osuna A. J. M., J. A. Marroquín J. y E. J. García S. 2008. *Ecología y Medio Ambiente.* COBACH. Hermosillo, Sonora. 116 p.
- Rodríguez J. R. M., A. Benito C. y A. Portela L. 2004. *Meteorología y climatología.* Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología. FECYT. Madrid, España. 170 p.
- Ruiz C. A. C. y J. D. Pabón C. 2013. Efecto de los fenómenos El Niño y La Niña en la precipitación y su impacto en la producción agrícola del departamento del Atlántico (Colombia). *Rev. Col. Geog.* 22: 35-54.
- Steel G. D. R., and H. J. Torrie. 2005. *Biostatistics: Principles and Procedures.* 2ª. Ed. McGraw-Hill. México, D.F. 622 p.
- Sutton D. B y N. P. Harmon. 2001. *Fundamentos de Ecología.* Ed. LIMUSA. México, DF. 293 p.
- Taiz L. and E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology.* 3 rd. Ed. Sinauer Assoc. Sunderland, MA. USA. 690 p.
- Torres R. E. 2009. *Agrometeorología.* 3a. Ed. Trillas. México, D. F. 320 p.
- Yzarra T. W., I. Trejo, V. y V. Noriega N. 2010. Evaluación del efecto del clima en la producción y productividad del maíz amarillo duro en la costa central del Perú. Universidad Agraria La Molina, Programa de Maíz. Lima, Perú. 90 p.

IMPROVEMENT OF DIRECT REGENERATION OF MEXICAN SOYBEAN FROM COTYLEDONARY NODES

MEJORA DE LA REGENERACIÓN DIRECTA DE SOYA MEXICANA A PARTIR DE NODOS COTILEDONALES

Soledad Mora-Vásquez^{1*}, Silverio García-Lara¹, Edgardo J. Escalante-Vázquez¹, Guy A. Cardineau^{1,2}

¹Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Avenida Eugenio Garza Sada 2501, Monterrey, Nuevo León, México, 64849. (morasole@gmail.com). ²Beus Center for Law and Society, Arizona State University, Mail Code 9520, 111 E. Taylor Street, Phoenix, AZ 85004-4467, USA.

ABSTRACT

Plant tissue culture provides an alternative approach to improve the quality of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. This study was undertaken to analyze the susceptibility of Mexican soybean for direct shoot regeneration and to determine the critical factors that affect *in vitro* performance. Our hypothesis was that Mexican soybean is suitable for *in vitro* regeneration using a cotyledonary node as explant. The effects of the seed disinfection procedure, soaking pretreatment before germination, soybean variety, as well as the culture medium composition of the shoot induction medium, were evaluated by two split-plot statistical designs. According to the statistical analysis, the seed disinfection procedure, the soaking pretreatment before germination, and the soybean genotype were the factors that brought about a significant effect ($p \leq 0.01$), while the hormones composition of the shoot induction medium did not have a significant effect. The best response for multiple shoot formation was observed using a chlorine gas seed disinfection method, 3% hydrogen peroxide soaking pretreatment, and Huasteca-100, Nainari and Suaqui soybean genotypes. A robust protocol was developed, and under these selected conditions, it is possible to obtain more than 10 shoots per explant. Well-developed plantlets were obtained after 60 d of *in vitro* culture.

Key words: plant tissue culture, *in vitro* culture, *Glycine max*, direct organogenesis, hydrogen peroxide soaking.

RESUMEN

El cultivo de tejidos de plantas brinda una estrategia alterna para mejorar la calidad de los cultivares del frijol de soya (*Glycine max* (L.) Merrill). Este estudio se llevó a cabo para analizar la susceptibilidad de la soya mexicana para la regeneración de brotes y para determinar los factores críticos que afectan su desempeño *in vitro*. Nuestra hipótesis fue que la soya mexicana es adecuada para la regeneración *in vitro* con el uso de un nodo cotiledonal como explante. Los efectos del procedimiento de desinfección de semillas, el pretratamiento de remojo antes de la germinación, la variedad de soya, así como la composición del medio de inducción de brotes, se evaluaron con el uso de dos diseños estadísticos en parcelas divididas. De acuerdo con el análisis estadístico, el procedimiento de desinfección, el pretratamiento de remojo antes de la germinación y el genotipo de soya fueron los factores que produjeron un efecto significativo ($p \leq 0.01$), mientras que la composición hormonal del medio de inducción de brotes no tuvo un efecto significativo. La respuesta mejor para la formación de brotes múltiples se observó al usar un método de desinfección con cloro gaseoso, un pretratamiento de remojo en agua oxigenada al 3%, y los genotipos de soya Huasteca-100, Nainari y Suaqui. Un protocolo robusto se desarrolló y, bajo las condiciones seleccionadas, es posible obtener más de 10 brotes por explante. Después de 60 d de cultivo *in vitro* se obtuvieron plántulas bien desarrolladas.

Palabra clave: cultivo de tejidos vegetales, cultivo *in vitro*, *Glycine max*, organogénesis directa, remojo en agua oxigenada.

INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max* (L.) Merrill), uno de los cultivos más importantes del mundo, presenta una tasa constante de crecimiento en

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.
Received: October, 2018. Approved: January, 2019.
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 387-399. 2020.

INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), one of the most important crops in the world, reaching a constant growth rate in terms of its production due to a consistently increasing demand and the development of new genomic technologies (USDA, 2018). Mexico imports the vast majority of the soybeans it consumes, since domestic production is insufficient to meet the national demand as a result of adverse climate conditions and biological factors such as pathogens and insects as pests (Ruiz *et al.*, 2013).

Consequently, the requirement for new soybean genotypes to address these important constraints is on the rise. Plant tissue culture provides an alternative approach that facilitates the development of new soybean cultivars with specific improvements through genetic transformation via particle bombardment (Stewart *et al.*, 1996) or *Agrobacterium tumefaciens* (Lee, 2011), through targeted mutagenesis (Haun *et al.*, 2014) or through wide hybridization (Singh and Nelson, 2015).

The main goal of tissue culture is to maximize the number of shoots obtained per explant. This is a prerequisite for an efficient transformation and clonal propagation of plants (Yildiz, 2012). Using cotyledonary nodes as explant, different soybean genotypes respond in a significantly different manner to the same protocol conditions. For example, the genotype most efficient at producing shoots was PNR791 (10.5 shoots per explant) in Australia, PK416 (39 shoots per explant) in India, Hefeng-25 (33 shoots per explant) in China, and NARC-4 (7.3 shoots per explant) in Pakistan (Ma and Wu, 2008; Zia *et al.*, 2010; Arun *et al.*, 2014; Raza *et al.*, 2017). Soybean regeneration depends upon several factors including the genotype, the medium composition (Texeira *et al.*, 2011) and the disinfection protocol (Paz *et al.*, 2004).

A direct shoot organogenesis from cotyledonary node tissues is a convenient procedure that was efficient on Chinese soybean genotypes (Ma and Wu, 2008). The main advantage of this approach is that it uses plant growth regulators (PGR), which present less potential for inducing mutations and allowing a reduced culture time in comparison with the indirect organogenesis procedures that go through an intermediate callus phase (Duncan, 2011).

términos de su producción, debido a una demanda en constante crecimiento y el desarrollo de nuevas tecnologías genómicas (USDA, 2018). México importa la gran mayoría de la soya que consume, ya que la producción doméstica no es suficiente para satisfacer la demanda nacional como resultado de condiciones climáticas adversas y de factores biológicos, tales como patógenos y plagas de insectos (Ruiz *et al.*, 2013).

En consecuencia, cada vez se vuelve un requisito más importante que los nuevos genotipos de soya enfrenten estas limitaciones. El cultivo de tejidos de plantas brinda un enfoque alternativo que facilita el desarrollo de nuevos cultivares de soya con mejoras específicas a través de la transformación genética por medio del bombardeo de partículas (Stewart *et al.*, 1996) o *Agrobacterium tumefaciens* (Lee, 2011), por mutagénesis dirigida (Haun *et al.*, 2014) o por medio de hibridación amplia (Singh and Nelson, 2015).

El objetivo principal del cultivo de tejidos es maximizar el número de brotes obtenidos por explante; este es un requisito previo para lograr una eficiente transformación y propagación de clones de plantas (Yildiz, 2012). Usando nodos cotiledonales como explantes, diferentes genotipos de soya respondieron de maneras significativamente diferentes a las mismas condiciones de protocolo. Por ejemplo, el genotipo más eficiente en cuanto a producción de brotes fue PNR791 (10.5 brotes por explante) en Australia, PK416 (39 brotes por explante) en India, Hefeng-25 (33 brotes por explante) en China, y NARC-4 (7.3 brotes por explante) en Pakistán (Ma y Wu, 2008; Zia *et al.*, 2010; Arun *et al.*, 2014; Raza *et al.*, 2017). La regeneración de soya depende de varios factores, incluyendo el genotipo, la composición del medio (Texeira *et al.*, 2011) y el protocolo de desinfección (Paz *et al.*, 2004).

La organogénesis directa de brotes a partir de tejidos de nodos cotiledonales es un procedimiento conveniente que demostró su eficiencia en genotipos chinos de soya (Ma y Wu, 2008). La principal ventaja de este método es que usa reguladores de crecimiento vegetal (RCV), que presentan potencial menor para inducir mutaciones y permiten un tiempo de cultivo menor en comparación con los procedimientos de organogénesis indirectos que atraviesan una fase intermedia de callo (Duncan, 2011).

En este estudio, la hipótesis es que la soya mexicana es adecuada para la regeneración *in vitro*, usando

In our study, the hypothesis is that Mexican soybean is suitable for *in vitro* regeneration using a cotyledonary node as explant. We aim to analyze the regeneration efficiency of eight Mexican genotypes by subjecting them to two seed disinfection procedures, two soaking pretreatments and four different shoot induction medium compositions, using the cotyledonary node method.

MATERIALS AND METHODS

The Mexican soybean genotypes for the study were selected on the basis of their commercial availability: Huasteca 100, Huasteca 200, Huasteca 300, Huasteca 400, Huasteca 600, Tamesi, Nainari and Suaqui-86. They were kindly donated by INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Mexico). The seeds were harvested in 2013 and stored at 4 °C until analysis.

The culture reagents were obtained from PhytoTechnology Laboratories (Shawnee Mission, KS, USA). The basal medium used was Murashige and Skoog salts with B5 vitamins, supplemented with 30 g L⁻¹ Sucrose, and 8 g L⁻¹ Plant Agar (MSB5). The pH was adjusted to 5.8 with 1M NaOH before autoclaving at 121 °C for 15 min. The incubation room was under a photoperiod of 16 h, an irradiance of 60 µmol m⁻² s⁻¹, and a temperature of 27 ± 1 °C.

Seed surface disinfection, soaking pretreatment and genotype evaluation

Two disinfection methods were evaluated: 1) chlorine gas seed disinfection and 2) aqueous sodium hypochlorite/ethanol method, with and without overnight soaking pretreatments with either water or 3% solution of commercial hydrogen peroxide (active ingredient 3% H₂O₂, DEGASA, Jiutepec, Mexico). In the first case, the seeds were placed into a tightly sealed chamber containing chlorine gas for 24 h. The chlorine gas was generated by mixing 3 mL of concentrated HCl and 100 mL commercial bleach (active ingredient 5% NaOCl, Clorox, Mexico City, Mexico) inside the chamber (Olhoft *et al.*, 2008). In the second method, the seeds were washed three times under running tap water, treated with 70% v/v ethanol for 30 s, disinfected with 12% commercial bleach for 20 min and rinsed four times with sterile distilled water (Ma and Wu, 2008).

For the soaking pretreatment, the seeds were soaked in sterile distilled water, or in a freshly prepared 3% dilution of commercial hydrogen peroxide, overnight (13 h) at 26 °C. The seeds were germinated over a period of five days on a basal medium supplemented with 0.50 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine

un nodo cotiledonal como explante. El objetivo fue analizar la eficiencia de regeneración de ocho genotipos mexicanos al someterlos a dos procedimientos de desinfección, dos pretratamientos de remojo y cuatro composiciones de medio de inducción de brotes, con el método de nodos cotiledonales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los genotipos de soya mexicanos utilizados en el presente estudio se eligieron con base en su disponibilidad comercial: Huasteca 100, Huasteca 200, Huasteca 300, Huasteca 400, Huasteca 600, Tamesi, Nainari y Suaqui-86. INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, México) los donó amablemente. Las semillas se sembraron en el 2013 y almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Los reactivos de cultivo se obtuvieron de PhytoTechnology Laboratories (Shawnee Mission, KS, EE. UU.) El medio de cultivo usado fue con sales de Murashige and Skoog con vitaminas B5, complementadas con 30 g L⁻¹ sacarosa, y 8 g L⁻¹ Agar vegetal (MSB5). El pH se ajustó a 5.8 con NaOH 1M antes de esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. La incubación se hizo bajo un fotoperiodo de 16 h, una irradiancia de 60 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 27 ± 1 °C.

Desinfección superficial de semillas, pretratamiento de remojo y evaluación de genotipo

Dos métodos de desinfección se evaluaron: 1) desinfección de semillas con cloro gaseoso y 2) el método acuoso de hipoclorito de sodio /etanol, con o sin pretratamientos de remojo, ya sea en agua o en una disolución al 3% de agua oxigenada comercial (ingrediente activo 3% H₂O₂, DEGASA, Jiutepec, México). En el primer caso, las semillas se colocaron en una cámara hermética con cloro gaseoso durante 24 h. El cloro gaseoso se generó con una mezcla de 3 mL de HCl concentrado y 100 mL de blanqueador comercial (ingrediente activo 5% NaOCl, Clorox, Ciudad de México, México) adentro de la cámara (Olhoft *et al.*, 2008). En el segundo método, las semillas se lavaron tres veces con agua potable, se trataron con etanol al 70% por 30 s, se desinfectaron con blanqueador comercial al 12% por 20 min y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril (Ma and Wu, 2008).

Para el pretratamiento de remojo, las semillas se pusieron a remojar en agua estéril destilada, o en una dilución al 3% de agua oxigenada comercial durante la noche (13 h) a 26 °C. Las semillas se dejaron germinar durante un periodo de cinco días en un medio de cultivo complementado con 0.50 mg L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP). Para preparar los explantes, las hojas pri-

(BAP). In order to prepare the explants, the primary leaves, epicotyl, and a portion of the hypocotyl were excised using a sterile blade; several scratches were made in the meristematic region of the cotyledonary node.

Explants from 5-day old seedlings were transferred onto a shoot induction medium (basal medium with PGR: 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ Indole-3-butyric acid (IBA), and 0.5 mg L⁻¹ Kinetin (KIN) and incubated for 15 d. The percentage of germination and the mean number of shoots were recorded.

Genotype and shoot induction medium evaluation

After using the chlorine gas disinfection method and overnight soaking pretreatment (3% H₂O₂), the seeds were germinated for 5 d, and explants prepared as described above. Then, the explants were transferred onto a Shoot Induction Medium (SIM) and incubated for 15 d. Eight Mexican genotypes and four SIM with different PGR composition were tested: 1) 3.0 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP), 0.2 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA), 0.5 mg L⁻¹ kinetin (KIN); 2) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.6 mg L⁻¹ IBA; 3) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA; 4) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA. After 15 d in SIM, the shoots were counted.

Regeneration protocol

The explants were prepared for the elongation stage using the conditions that maximized the number of shoots. The explants were transferred onto a PGR-free basal medium (shoot elongation medium) until elongated shoots were 3-4 cm in length. Several shoots required only a few days for elongation, while others needed 1-6 weeks. In the latter case, the explant was subcultured onto fresh elongation medium every 15 d.

Elongated shoots were excised and transferred to a rooting medium, which consisted of basal medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA), and then incubated for 15 d. The plantlets were gently washed under tap water, then transferred to pots containing autoclaved garden soil (#70786350, Scotts Miracle-Gro, Marysville, OH, USA). Plantlets were acclimatized 7 d by covering the pots with inverted transparent plastic cups to keep internal humidity, watered with tap water every 3 d and grown under a photoperiod of 16 h, an irradiance of 60 µmol m⁻² s⁻¹ and a temperature of 27 ± 1 °C.

Experimental design and statistical analysis

In order to test the amenability of Mexican soybean for direct shoot regeneration, the effects of the soybean genotype, seed disinfection procedure, soaking pretreatment before germination, as well as the culture medium composition of

marías, el epicótilo, y una porción del hipocótilo, se extirparon con un bisturí esterilizado; se realizaron varias rasgaduras en la región meristemática del nodo cotiledonal.

Los explantes de plántulas de 5 días de edad se transfirieron a un medio de inducción de brotes (medio de cultivo con RCV: 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ ácido Indol-3-butírico (AIB), 0.5 mg L⁻¹ Cinetina (CIN) e incubados por 15 d. El porcentaje de germinación y el número promedio de brotes se registraron.

Evaluación del genotipo y del medio de inducción de brotes

Después de usar el método de desinfección con cloro gaseoso y el pretratamiento de remojo durante toda la noche (3% H₂O₂), las semillas germinaron durante 5 d, y los explantes se prepararon según lo descrito anteriormente. Después, los explantes se transfirieron a un medio de inducción de brotes (MIB) e incubados por 15 d. Ocho genotipos mexicanos se probaron y cuatro MIB con diferentes composiciones RCV: 1) 3.0 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP), 0.2 mg L⁻¹ ácido indol-3-butírico (AIB), 0.5 mg L⁻¹ cinetina (CIN); 2) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.6 mg L⁻¹ IBA; 3) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA; 4) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA. Después de 15 d en MIB, se contaron los brotes.

Protocolo de regeneración

Los explantes se prepararon para la fase de elongación, con las condiciones que maximizaron el número de brotes. Los explantes se transfirieron a un medio de cultivo libre de RCV (medio de elongación de brotes) hasta que los brotes alcanzaron una longitud de 3-4 cm. Varios brotes solo requirieron pocos días para su elongación, mientras que otros necesitaron 1-6 semanas. En el último caso, el explante se subcultivó a un medio de elongación nuevo cada 15 d.

Los brotes largos se extirparon y trasladaron a un medio de enraizamiento, que consistió en un medio de cultivo complementado con 1.0 mg L⁻¹ de ácido 1-naftalenacético (ANA), y se incubó por 15 d. Las plántulas se lavaron con cuidado con agua potable y se transfirieron a macetas con tierra de jardín previamente esterilizada en autoclave (#70786350, Scotts Miracle-Gro, Marysville, OH, EE. UU.) Las plántulas se aclimataron durante 7 d por medio de cubrir las macetas con vasos de plástico transparentes invertidos para mantener la humedad interna, se regaron con agua potable cada 3 d, se dejaron crecer bajo un fotoperiodo de 16 h, una irradiancia de 60 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 27 ± 1 °C.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para probar la capacidad de respuesta de la soya mexicana a la regeneración directa de brotes, los efectos del genotipo de soya,

the shoot induction medium, were evaluated by two split-plot statistical designs (Altman and Krzywinski, 2015). In the first split-plot design, the effects of genotype (8 levels), disinfection procedure (2 levels) and soaking pretreatment (3 levels) were evaluated. The response variables were the germination percentage (%) and the mean number of shoots per explant (#). In the second split-plot design, the shoot induction medium (4 levels) and the genotype (8 levels) were evaluated; the response variable was the mean number of shoots (#).

In the first split-plot experiment, the germination percentage was determined from 15 seeds per treatment and the mean number of shoots was determined from eight explants per disinfection/soaking treatment in eight repetitions of the whole experiment. The Freeman–Tukey transformation and the Wilcoxon/Kruskal-Wallis nonparametric tests were used for the analysis of the germination percentage. When treatments had a significant effect, the nonparametric Steel-Dwass multiple comparison test was used ($p \leq 0.05$).

After validating the normality assumption through residuals analysis, the mean number of shoots was analyzed using the Standard Least Squares method with restricted maximum likelihood estimations (REML). Factors were statistically significant if $p \leq 0.01$ ($\text{LogWorth} > 2$). Multiple comparisons of the means were carried out using Tukey's test ($p \leq 0.05$). The Pearson coefficient was calculated for the correlation of the germination percentage with the mean number of shoots in the regeneration protocol.

In the second split-plot experiment, the shoot induction medium was the whole plot with eight subplots (eight varieties). Eight explants (one for each cultivar) per culture vessel and 15 replicates for each of the four evaluated media were used. The mean number of shoots per explant was recorded and analyzed by Standard Least Squares and Tukey's test. All statistical analyses were conducted in JMP v.12 (by SAS Institute for Mac).

RESULTS AND DISCUSSION

In the first split-plot analysis, the germination response was significantly affected by the disinfection method (Chi Square = 104, $df=1$, $p \leq 0.0001$), the soaking pretreatment (Chi Square=64, $df=2$, $p \leq 0.0001$) and the interaction between the two (Chi Square=189, $df=5$, $p \leq 0.0001$), but not by the genotype (Table 1). The germination percentage was significantly higher when using chlorine gas disinfection and a soaking pretreatment with either water or 3% hydrogen peroxide. Soaked seeds disinfected with chlorine gas reached close to optimal germination rates ($> 90\%$).

el procedimiento de desinfección de semillas, el pretratamiento de remojo antes de la germinación, así como la composición del medio de inducción de brotes se evaluaron por medio de dos diseños estadísticos en parcelas divididas (Altman y Krzywinski, 2015). En el primer diseño en parcelas divididas se evaluaron los efectos del genotipo (8 niveles), el procedimiento de desinfección (2 niveles) y el pretratamiento de remojo (3 niveles). Las variables de respuesta fueron el porcentaje de germinación (%) y el promedio de brotes por explante (#). En el segundo diseño en parcelas divididas se evaluó el medio de inducción de brotes (4 niveles) y el genotipo (8 niveles); la variable de respuesta fue el promedio de brotes (#).

En el primer experimento en parcela dividida, el porcentaje de germinación se determinó a partir de 15 semillas por tratamiento y el número promedio de brotes se determinó a partir de ocho explantes por tratamiento de desinfección/remojo en ocho repeticiones del experimento entero. Las pruebas de transformación de Freeman–Tukey y la no-paramétrica de Wilcoxon/Kruskal-Wallis se usaron para el análisis del porcentaje de germinación. Cuando los tratamientos tuvieron efecto significativo, se usó la prueba de comparación múltiple no-paramétrica Steel-Dwass ($p \leq 0.05$).

Una vez validada la suposición de normalidad a través del análisis de residuales, el promedio de brotes se analizó por medio del método de mínimos cuadrados estándar, con estimaciones de máxima verosimilitud restringida. Los factores fueron estadísticamente significativos si $p \leq 0.01$ ($\text{LogWorth} > 2$). Múltiples comparaciones de las medias se llevaron a cabo al aplicar la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El coeficiente de Pearson se calculó para la correlación del porcentaje de germinación con el promedio de brotes en el protocolo de regeneración.

En el segundo experimento en parcelas divididas, el medio de inducción de brotes fue la parcela grande con ocho subparcelas (ocho variedades). Ocho explantes (uno por cada cultivar) se usaron por recipiente de cultivo y 15 réplicas para cada uno de los cuatro medios evaluados. El número promedio de brotes por explante se registró y analizó por medio de las pruebas de mínimos cuadrados estándar y de Tukey. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en JMP v. 12 (desarrollado por SAS Institute para Mac).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer análisis en parcelas divididas, la respuesta de germinación se vio significativamente afectada por el método de desinfección (Chi Cuadrado = 104, $df=1$, $p \leq 0.0001$), el pretratamiento de remojo (Chi Square=64, $df=2$, $p \leq 0.0001$) y la interacción entre ambos (Chi Cuadrado=189, $df=5$,

Table 1. Effect of the genotype, seed disinfection method, soaking pretreatment and the interaction disinfection $\times$ soaking, over the germination and shoot induction of Mexican soybean genotypes.**Cuadro 1. Efecto del genotipo, método de desinfección de la semilla, pretratamiento de remojo y la interacción desinfección $\times$ remojo sobre la germinación e inducción de brotes en genotipos de soya mexicana.**

Effect	Germination %	Mean number of shoots [†]
Genotype		
Huasteca 100	76.8 $\pm$ 3.1	7.0 $\pm$ 0.9 a
Huasteca 200	74.0 $\pm$ 3.7	3.9 $\pm$ 0.5 b
Huasteca 300	73.3 $\pm$ 4.0	3.0 $\pm$ 0.6 b
Huasteca 400	77.8 $\pm$ 3.2	3.5 $\pm$ 0.3 b
Huasteca 600	75.0 $\pm$ 3.3	3.0 $\pm$ 0.3 b
Nainari	78.3 $\pm$ 4.0	6.4 $\pm$ 0.9 a
Suaqui-86	71.9 $\pm$ 4.7	6.5 $\pm$ 0.9 a
Tamesí	74.9 $\pm$ 3.7	3.3 $\pm$ 0.3 b
Disinfection procedure		
Cl ₂ (g)	85.8 $\pm$ 1.5 a	5.9 $\pm$ 0.4 a
NaOCl(aq) /EtOH	64.7 $\pm$ 1.5 b	3.3 $\pm$ 0.2 b
Soaking pretreatment		
3% H ₂ O ₂	83.8 $\pm$ 2.0 a	6.2 $\pm$ 0.5 a
No soaking	64.4 $\pm$ 1.4 b	3.1 $\pm$ 0.2 c
Water	77.6 $\pm$ 2.5 a	4.5 $\pm$ 0.4 b
Disinfection $\times$ Soaking		
Cl ₂ (g) $\times$ 3 % H ₂ O ₂	96.7 $\pm$ 0.9 a	8.6 $\pm$ 0.8 a
Cl ₂ (g) $\times$ No soaking	69.2 $\pm$ 1.8 b	2.9 $\pm$ 0.2 c
Cl ₂ (g) $\times$ Water	91.6 $\pm$ 1.7 a	6.3 $\pm$ 0.7 b
NaOCl(aq) /EtOH $\times$ 3% H ₂ O ₂	70.9 $\pm$ 2.1 b	3.8 $\pm$ 0.3 c
NaOCl(aq) /EtOH $\times$ No soaking	59.6 $\pm$ 1.9 b	3.3 $\pm$ 0.4 c
NaOCl(aq) /EtOH $\times$ Water	63.5 $\pm$ 3.3 b	2.7 $\pm$ 0.3 c

[†]The values represent means $\pm$ SE. For multiple comparisons, the Germination % was analyzed using a nonparametric test (Steel-Dwass) and the number of shoots was analyzed using Tukey's test. Different letters indicate statistical differences ($p \leq 0.05$). ♦ Los valores representan medias $\pm$ EE. Para comparaciones múltiples, el porcentaje de germinación se analizó con una prueba no-paramétrica (Steel-Dwass) y el número de brotes se analizó con la prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

The shoot induction was significantly affected by the disinfection method, the genotype, the soaking pretreatment and by the disinfection $\times$ soaking interaction with LogWorth values of 28, 27, 23 and 18, respectively. The number of shoots per explant was significantly higher when using the chlorine gas and a soaking pretreatment in comparison with the number of shoots produced by explants with no soaking pre-treatment (Table 1). Considering the chlorine gas method $\times$ soaking interaction, the water soaking pretreatment increased the mean number of shoots from 2.9 to 6.3 (117% increment), while the hydrogen peroxide pretreatment increased the mean number of shoots from 2.9 to 8.6 shoots per explant (197% increment).

$p \leq 0.0001$), aunque no por el genotipo (Cuadro 1). El porcentaje de germinación fue significativamente mayor al usar la desinfección con cloro gaseoso y un pretratamiento de remojo, ya sea con agua o agua oxigenada al 3%. Las semillas remojadas y desinfectadas con cloro gaseoso alcanzaron tasas de germinación cercanas a las óptimas ($> 90\%$).

La inducción de brotes se vio afectada de manera significativa por el método de desinfección, el genotipo, el pretratamiento de remojo y la interacción desinfección $\times$ remojo con valores LogWorth de 28, 27, 23 y 18, respectivamente. El número de brotes por explante fue significativamente mayor con el uso del cloro gaseoso y un pretratamiento de remojo en comparación con el número de brotes producidos

A seed surface disinfection method is a key factor in eliminating bacterial and fungal contamination when the seeds are harvested from open fields. Wet disinfection protocols with sodium hypochlorite are very common; however, it was noticed that when using a NaOCl(aq) /EtOH disinfection protocol, the germination rate and the shoot induction of Mexican soybean remained low (Table 1). Yildiz and Er (2002) and Barampuram *et al.* (2014) showed adverse effects of commercial sodium hypochlorite on plant species like wheat, cotton and flax, as well as the importance of optimizing NaOCl concentrations and exposure time to guarantee viability on explants.

Exposure to ethanol could also have detrimental effects on seed viability (Li *et al.*, 2017). A significant positive correlation was found between the germination and the shoot induction ($r=0.5$, $p\leq 0.0001$). This fact means that the lower the germination rate, the lower the capability to regenerate the target tissues. Since reduction of seed viability by disinfectants could result in unhealthy explants, it is worth noticing that the pretreatment of the seed affects the *in vitro* performance, from germination to shoot induction.

A prolonged dry disinfection protocol with chlorine gas can also have a negative effect on the explant vigor (Paz *et al.*, 2004). Using chlorine gas (without a soaking pretreatment) the germination percentage and the shoot induction were still suboptimal. This problem was circumvented by combining the chlorine gas disinfection method with a soaking pre-treatment. Maroufi and Aliabadi (2011) and Chen and Arora (2013) hypothesized that a water soaking pretreatment of seeds (hydropriming) improves the germination rate, uniformity, as well as the stress tolerance and vigor of germinating seeds.

When seeds are soaked in water, they quickly reach a high level of hydration and oxygen, which, in turn, increases the level of intermediate metabolites and enzymes associated with germination, DNA repair and energy production (Zulueta-Rodriguez *et al.*, 2015). The early repair mechanism activated during the imbibition phase has been associated with seed vigor (Ventura *et al.*, 2012). Our results showed that the overnight soaking enhanced the seed performance by improving the germination percentage and vigor of the explants, which consequently resulted in a higher number of shoots per explant in the regeneration process.

al no remojar los explantes (Cuadro 1). Al tomar en cuenta la interacción del método cloro gaseoso (g) $\times$ remojo, el pretratamiento de remojo en agua aumentó el promedio de brotes de 2.9 a 6.3 (incremento del 117%), mientras que el pretratamiento con agua oxigenada aumentó el número promedio de brotes de 2.9 a 8.6 brotes por explante (incremento de 197%).

Un método de desinfección de la superficie de semillas es un factor clave en la eliminación de contaminación bacteriana y fúngica cuando las semillas se cosechan en campos abiertos. Los protocolos de desinfección húmedos con hipoclorito de sodio son muy comunes; sin embargo, se observó que al usar un protocolo de desinfección con NaOCl(aq) /EtOH, la tasa de germinación y la inducción de brotes de soya mexicana permaneció baja (Cuadro 1). Yildiz y Er (2002) y Barampuram *et al.* (2014) demostraron efectos adversos del hipoclorito de sodio comercial sobre especies vegetales como trigo, algodón y linaza, así como la importancia de optimizar concentraciones de NaOCl y tiempos de exposición para garantizar la viabilidad del explante.

La exposición al etanol también podría tener efectos nocivos sobre la viabilidad de las semillas (Li *et al.*, 2017). Una correlación positiva se encontró entre la germinación y la inducción de brotes ($r=0.5$, $p\leq 0.0001$). Este hecho significa que cuanto más baja sea la tasa de germinación, menor será la capacidad de regeneración del tejido buscado. Debido a que la reducción en la viabilidad de las semillas por los desinfectantes podría resultar en explantes poco saludables, es importante indicar que el pretratamiento de la semilla afecta el desempeño *in vitro*, desde la germinación hasta la inducción de brotes.

Un protocolo prolongado de desinfección seca con cloro gaseoso también puede tener un efecto negativo sobre el vigor del explante (Paz *et al.*, 2004). Con el uso de cloro gaseoso (sin un pretratamiento de remojo) el porcentaje de germinación y la inducción de brotes continuaron siendo subóptimos. Este problema se evitó al combinar el método de desinfección con cloro gaseoso y el pretratamiento de remojo. Maroufi y Aliabadi (2011) y Chen y Arora (2013) plantearon la hipótesis de que un pretratamiento de remojo de semillas en agua (hidro-acondicionamiento) mejora la tasa de germinación, uniformidad, así como la tolerancia al estrés y el vigor de las semillas en germinación.

According to Mohammad (2013), hydrogen peroxide functions as a modulator, activating multiple defense responses that reinforce resistance to various abiotic and biotic stresses in plants. Hydrogen peroxide shows a signaling role with other reactive molecules, such as nitric oxide and hydrogen sulfide, and phytohormones, such as abscisic acid, gibberellins and ethylene, during seed germination (Wojtyła *et al.*, 2016).

Even though it was not possible to uncover previous evidence that correlated hydrogen peroxide with the regeneration capability, in our study it was confirmed that a pretreatment with hydrogen peroxide is a simple and valuable method to stimulate not only germination, but also shoot induction. The number of shoots was significantly higher for the seeds soaked in hydrogen peroxide, as compared to the ones soaked in water.

The effectiveness of the overnight soaking (for both water and 3% H_2O_2) was dependent on the disinfection method, with the combination of soaking after the chlorine gas disinfection being preferable (Table 1). Unlike the improvement in seed vigor observed after a soaking pretreatment following a chlorine gas disinfection; seeds that were soaked after a NaOCl (aq)/EtOH disinfection protocol did not improve their viability. It could be hypothesized that the phytotoxicity from the wet disinfection protocol surpassed a critical level, thereby preventing the advantages of the soaking pretreatment.

The shoot induction was also significantly affected by the genotype (Table 1) and by the following genotype-treatment interactions: genotype $\times$ soaking, genotype $\times$ disinfection and genotype $\times$ disinfection $\times$ soaking with LogWorth values of 11, 8 and 7 respectively (Figure 1). Under the NaOCl (aq)/EtOH disinfection protocol, there were no significant differences between the soaking pretreatments in all varieties. In contrast, under the chlorine gas disinfection protocol, the water pretreatment had a significant effect on the number of shoots in Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86 genotypes, while hydrogen peroxide had a significant effect on Huasteca-100, Huasteca-200, Nainari and Suaqui-86 genotypes (in comparison with the no soaked control).

Most Mexican genotypes registered an increase in the number of shoots when using a soaking pretreatment, however not all genotypes were equally

Las semillas se encuentran remojadas en agua, rápidamente alcanzan un nivel de hidratación y de oxígeno que, a su vez, aumenta el nivel de metabolitos intermedios y enzimas relacionadas con germinación, reparación de DNA y producción de energía (Zulueta-Rodriguez *et al.*, 2015). El mecanismo temprano de reparación activado durante la fase de imbibición se ha relacionado con el vigor de la semilla (Ventura *et al.*, 2012). Nuestros resultados mostraron que el remojo durante toda la noche contribuyó al desempeño de la semilla por medio de mejorar el porcentaje de germinación y el vigor de los explantes; esto en consecuencia, dio como resultado un número mayor de brotes por explante en el proceso de regeneración.

De acuerdo con Mohammad (2013), el agua oxigenada funciona como un modulator, al activar respuestas de defensa múltiples que refuerzan la resistencia a formas distintas de estrés biótico y abiótico en las plantas. El agua oxigenada desempeña un papel en la señalización hacia otras moléculas reactivas, tales como el óxido nítrico y el sulfuro de hidrógeno, y algunas fitohormonas como el ácido abscísico, gibberelinas y el etileno, durante la germinación de la semilla (Wojtyła *et al.*, 2016).

Aun cuando no fue posible descubrir evidencia previa que correlacionara el agua oxigenada con la capacidad de regeneración, en este estudio se confirmó que el pretratamiento con agua oxigenada es un método simple y valioso para estimular, no sólo la germinación, sino también la inducción de brotes. El número de brotes fue significativamente más alto para las semillas remojadas en agua oxigenada, en comparación con las remojadas en agua.

La efectividad del remojo durante toda la noche (tanto del agua potable como del H_2O_2 3%) dependió del método de desinfección, con la preferencia de la combinación del remojo después de la desinfección con cloro gaseoso (Cuadro 1). A diferencia de la mejora en el vigor de las semillas, observado después de un pretratamiento de remojo posterior a una desinfección con cloro gaseoso; las semillas que se remojaron después de un protocolo de desinfección de NaOCl (aq)/EtOH no mejoraron su viabilidad. La conjetura posible es que la fitotoxicidad del protocolo de desinfección húmedo sobrepasó un nivel crítico e impidió las ventajas del pretratamiento de remojo.

La inducción de brotes también se vio afectada de manera significativa por el genotipo (Cuadro 1) y

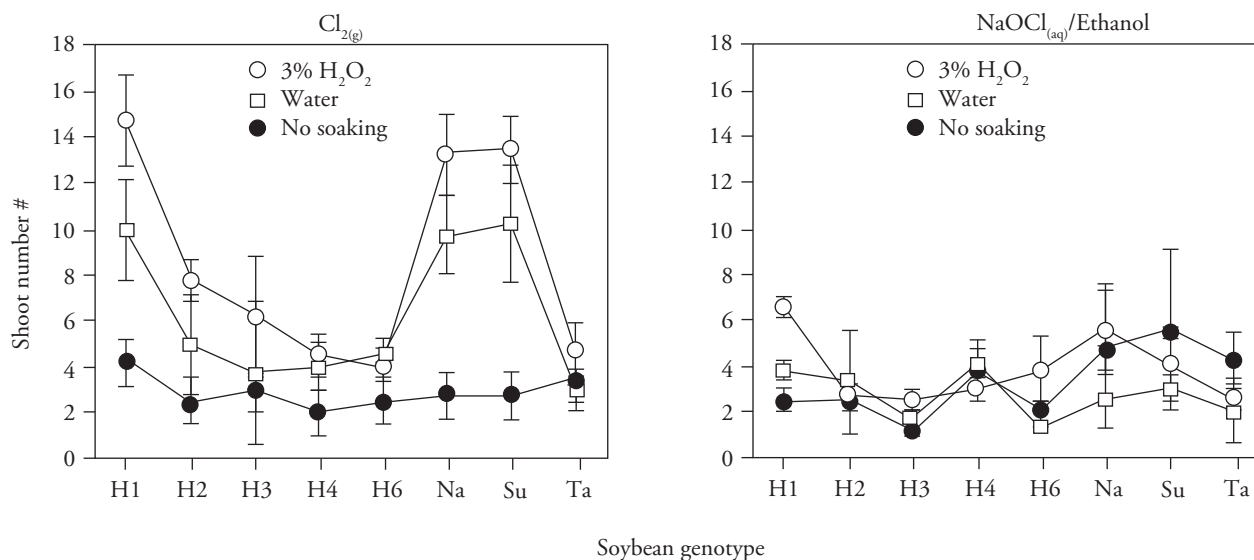


Figure 1. Effect of interactions of genotype, disinfection and soaking pretreatment on the shoot induction in Mexican soybean. If the difference between means is larger than Tukey's HSD value 3.8, the corresponding means are significantly different ($p \leq 0.05$). H1: Huasteca 100, H2: Huasteca 200, H3: Huasteca 300, H4: Huasteca 400, H6: Huasteca 600, Na: Nainari, Su: Suaqui-86 and Ta: Tamesi.

Figura 1. Efecto de las interacciones del genotipo, desinfección y pretratamiento de remojo sobre la inducción de brotes en la soya mexicana. Si la diferencia entre medias es mayor al valor HSD de Tukey de 3.8, las medias correspondientes son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). H1: Huasteca 100, H2: Huasteca 200, H3: Huasteca 300, H4: Huasteca 400, H6: Huasteca 600, Na: Nainari, Su: Suaqui-86 y Ta: Tamesi.

affected (Figure 1). Thus, the regeneration capability, in terms of the number of shoots, is the result of interactions between the genotype and the explant pretreatments. This finding agrees with Pratap *et al.* (2018), who pointed out that regeneration of grain legumes is highly genotype dependent. The process of organogenesis involves the activation of several metabolic pathways and developmental genes; therefore, protocols must be customized for each genotype (Nagle *et al.*, 2018). The most regenerative genotypes regarding shoot induction were Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86 under the current protocol conditions.

In the second split-plot analysis, in which the evaluated factors were the shoot induction medium composition and the genotype; the shoot induction was affected by the soybean genotype (LogWorth=73), but not by the shoot induction medium (LogWorth=0.8). The higher multiple shoot formation was obtained using the varieties Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86, which on average produced more than 10 shoots per explant; these three varieties were not significantly different (Figure 2).

por las siguientes interacciones genotipo-tratamiento: genotipo $\times$ remojo, genotipo $\times$ desinfección y genotipo $\times$ desinfección $\times$ remojo con valores Log-Worth de 11, 8 y 7 respectivamente (Figura 1). Bajo el protocolo de desinfección NaOCl (aq)/EtOH, no hubo diferencias significativas entre los pretratamientos de remojo en todas las variedades. Por el contrario, bajo el protocolo de desinfección con cloro gaseoso, el pretratamiento con agua tuvo un efecto significativo sobre el número de brotes en los genotipos Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86, mientras que el agua oxigenada tuvo un efecto significativo sobre los genotipos Huasteca-100, Huasteca-200, Nainari y Suaqui-86 (en comparación con el control sin remojar).

La mayoría de los genotipos mexicanos registraron un incremento en el número de brotes con un pretratamiento de remojo, aunque no todos los genotipos se afectaron igual (Figura 1). Por lo tanto, la capacidad de regeneración en términos del número de brotes es el resultado de las interacciones entre el genotipo y los pretratamientos a los explantes. Este hallazgo concuerda con Pratap *et al.* (2018), quien señaló que la regeneración a partir de granos de le-

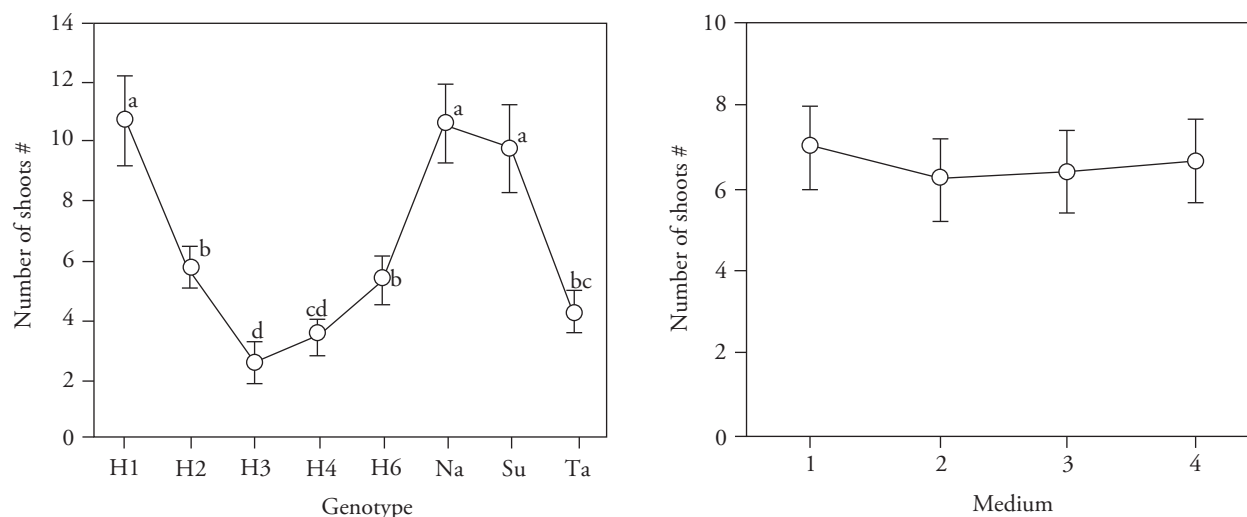


Figure 2. Effect of the genotype and the shoot induction medium on the shoot induction of Mexican soybean genotypes. 1) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA, 0.5 mg L⁻¹ KIN; 2) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.6 mg L⁻¹ IBA; 3) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA; 4) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA. If the difference between two means is larger than the Tukey's critical value (4.3) the two means are significantly different ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Efecto del genotipo y el medio de inducción de brotes sobre la inducción de brotes en genotipos de soya mexicana. 1) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA, 0.5 mg L⁻¹ KIN; 2) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.6 mg L⁻¹ IBA; 3) 3.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA; 4) 4.0 mg L⁻¹ BAP, 0.2 mg L⁻¹ IBA. Si la diferencia entre dos medias es mayor al valor crítico de Tukey (4.3), ambas medias son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

These genotypes are potentially a good platform for the improvement of soybean quality through *in vitro* systems. Huasteca-100 is adapted to Yucatan Peninsula, is resistant to plant diseases such as canker and frog eye (*Cercospora sojina*). Nainari and Suaqui-86 are adapted to northwestern Mexico and are resistant to whiteflies (Financiera Rural, 2013).

Another critical and important parameter in the regeneration process is the presence of auxins and cytokinins in the early stages of shoot development. Hai *et al.* (2014), Ma and Wu (2008), Song *et al.* (2013), Yang *et al.* (2016) and Zhang *et al.* (2014) reported successful results using BAP, IBA and KIN in the shoot induction stage. We tested different BAP, IBA and KIN levels in search of a medium to further optimize the regeneration capability.

However, in our experiments, the four evaluated media (and the interaction medium $\times$ genotype) did not have a significant effect on the mean number of shoots. In further studies, it would be of interest to determine whether additional changes in the composition of SIM, for example, the use of different PGR, the addition of polyamines, or the

guminosas depende en gran medida del genotipo. El proceso de la organogénesis involucra la activación de más de una ruta metabólica y genes codificadores del desarrollo; por lo tanto, los protocolos se deben adecuar a cada genotipo (Nagle *et al.*, 2018). Los genotipos más regenerativos en términos de inducción de brotes fueron Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86 bajo las condiciones del protocolo actual.

En el segundo análisis en parcelas divididas, en el cual los factores evaluados fueron la composición del medio de inducción de brotes y el genotipo; la inducción de brotes se vio afectada por el genotipo de soya (LogWorth=0.73), pero no así por el medio de inducción de brotes (LogWorth=0.8). La formación mayor de brotes múltiples se obtuvo con las variedades Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86; ya que en promedio produjeron más de 10 brotes por explante; estas tres variedades no fueron significativamente diferentes (Figura 2).

Estos tres genotipos tienen potencial como plataforma apropiada para la mejora de la calidad de la soya a través de sistemas *in vitro*. Huasteca-100 está adaptada a la Península de Yucatán, presenta resis-

addition of antibiotics and antioxidants (required in transformation), might affect the regeneration capability of Mexican genotypes (Arun *et al.*, 2014).

The regeneration of Mexican soybean was initially limited by low germination rates and low shoot induction frequencies. The elongation and root induction stages showed that all tested genotypes elongated shoots in shoot elongation medium (without PGR), and then 100% of elongated shoots formed roots after transference to rooting medium. In contrast to the shoot induction, the elongation stage, the root induction and the acclimatization of plantlets were not affected by the genotype.

The improved regeneration protocol for Mexican soybean (Figure 3) includes chlorine gas disinfection method, soaking pretreatment with 3% commercial hydrogen peroxide, a shoot induction phase with

tencia a fitopatologías tales como el cancro y el manchado “ojo de rana” (*Cercospora sojina*). Nainari y Suaqui-86 están adaptadas al noroeste mexicano y son resistentes a la mosquita blanca (Financiera Rural, 2013).

Otro indicador crítico e importante en el proceso de regeneración es la presencia de auxinas y citoquininas en las primeras etapas del desarrollo de los brotes. Hai *et al.* (2014), Ma y Wu (2008), Song *et al.* (2013), Yang *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2014) reportaron resultados exitosos con el uso de BAP, AIB y CIN en la etapa de inducción del brote. Así que se probaron niveles diferentes de BAP, AIB y CIN en busca de un medio para optimizar aún más la capacidad de regeneración.

Sin embargo, en nuestros experimentos, los cuatro medios evaluados (así como la interacción medio

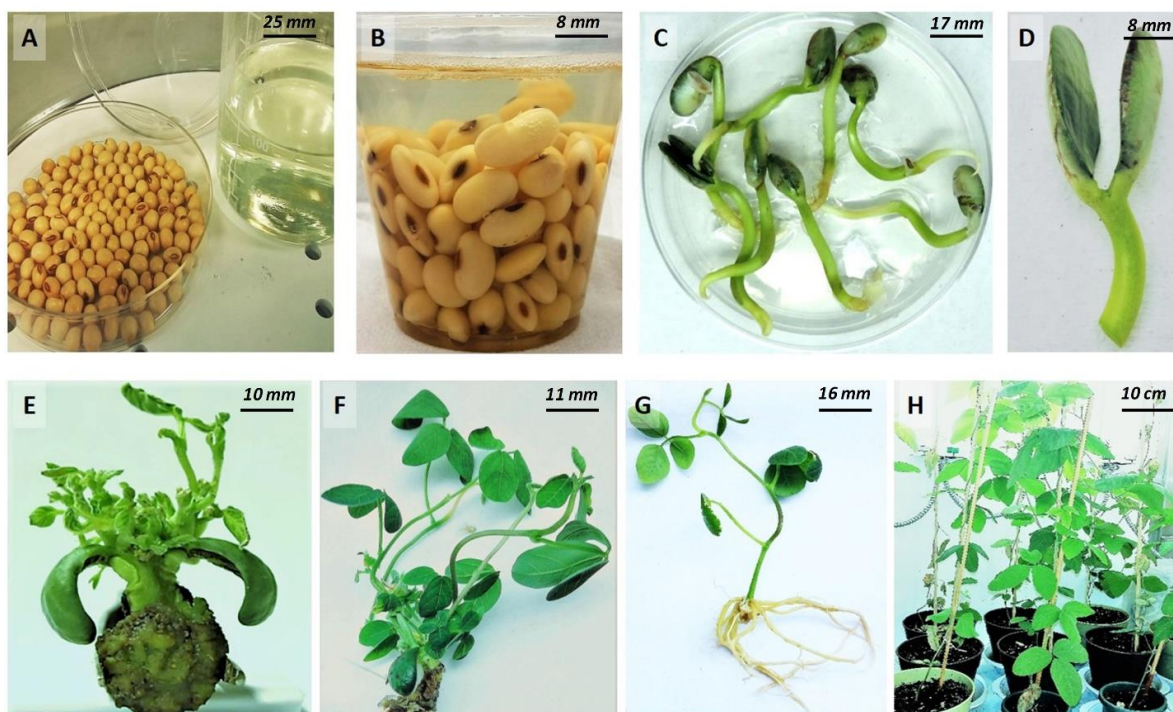


Figure 3. Regeneration of Mexican soybean (Huasteca-100) from cotyledonary node: A. Chlorine gas surface seed disinfection; B. 13 h soaking (3% H_2O_2); C. Five days old seedlings; D. Explant preparation; E. Explant with multiple shoots after 15 d in MSB5 supplemented with phytohormones (BAP, IBA, KIN); F. Elongated shoots after 15 d in hormone-free medium; G. Plantlet after 15 d in medium supplemented with NAA; H. Plants growing in soil.

Figura 3. Regeneración de soya mexicana (Huasteca-100) a partir de nódulos cotiledonales: A. Desinfección de semillas con cloro gaseoso; B. 13 h en remojo (3% H_2O_2); C. Plántulas de cinco días de edad; D. Preparación de explantes; E. Explante con brotes múltiples después de 15 d en MSB5 complementado con fitohormonas (BAP, IBA, KIN); F. Brotes alargados después de 15 d en un medio libre de hormonas; G. Plántula después de 15 d en un medio complementado con ANA; H. Plantas en crecimiento en suelo.

PGR (SIM-1), and Mexican genotypes with a good regeneration capability such as Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86. The entire process from the stage of soaking pretreatment to the stage of formation of plantlets in soil takes at least 60 d. This regeneration protocol enabled the successful regeneration of all tested varieties into healthy plants that produced viable seeds.

CONCLUSIONS

Mexican soybean varieties Huasteca-100, Nainari and Suaqui-86 were the most suitable for *in vitro* regeneration from cotyledonary node explants. For the improvement of the regeneration protocol, disinfection with chlorine gas and overnight soaking pretreatment with 3% commercial hydrogen peroxide were advantageous to increase the mean number of shoots per explant.

According to our knowledge, this is the first reported study on the influence of the disinfection and the soaking pretreatments on the regeneration of Mexican soybean. This regeneration protocol opens the door to future improvement for these Mexican genotypes.

ACKNOWLEDGMENTS

To CIDPRO (Centro de Investigación y Desarrollo de Proteínas) for its financial support and Dr. Sergio Serna and Dr. Robert Winkler for their revision of the manuscript. To the Centro de Agrobiotecnología and the Centro de Biotecnología, FEMSA for support through their facilities. And to CONACyT for the scholarship (Ref.No. 487097) granted to S. Mora-Vásquez. To Karla Lorena López and Francisco Almeida, for their technical assistance.

LITERATURE CITED

- Altman, N. and M. Krzywinski. 2015. Points of significance: Split plot design. *Nat. Methods* 12: 165–166.
- Arun, M., K. Subramanyam, J. Theboral, A. Ganapathi, and M. Manickavasagam. 2014. Optimized shoot regeneration for Indian soybean: The influence of exogenous polyamines. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 117: 305–309.
- Barampuram, S., G. Allen, and S. Krasnyanski. 2014. Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 118: 179–185.
- Chen, K., and R. Arora. 2013. Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 94: 33–45.
- Duncan, D. 2011. Organogenesis and embryogenesis in plant genetic transformation. In: Yinghui, D., and O. David × genotipo) no tuvieron un efecto significativo sobre el promedio de brotes. En estudios futuros sería de interés determinar si cambios adicionales en la composición del MIB, por ejemplo, el uso de diferentes RCV, la adición de poliaminas, o de antibióticos y antioxidantes (requeridos en la transformación), podrían afectar la capacidad de regeneración de genotipos mexicanos (Arun *et al.*, 2014).
- La regeneración de la soya mexicana estaba, en un principio, limitada por tasas bajas de germinación y frecuencias bajas de inducción de brotes. Las fases de elongación e inducción de raíz mostraron que todos los genotipos analizados elongaron brotes en el medio de elongación (sin RCV), y luego, 100% de los brotes elongados formaron raíces después de transferirse a un medio de enraizamiento. A diferencia de la inducción de brotes, a las etapas de elongación, inducción de raíz y aclimatación de las plántulas no las afectó el genotipo.
- El protocolo mejorado de regeneración para la soya mexicana (Figura 3) incluye el método de desinfección con cloro gaseoso, el pretratamiento de remojo con agua oxigenada comercial al 3%, una fase de inducción con RCV (MIB-1), y genotipos mexicanos con una buena capacidad de regeneración, tales como Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86. Todo el proceso, desde la etapa de pretratamiento de remojo, hasta la etapa de formación de plántulas en el suelo requiere al menos 60 d. Este protocolo de regeneración permitió la regeneración exitosa de todas las variedades probadas, las cuales se convirtieron en plantas sanas que produjeron semillas viables.

CONCLUSIONES

Las variedades de soya mexicana Huasteca-100, Nainari y Suaqui-86 fueron las más adecuadas para la regeneración *in vitro* a partir de explantes de nodos cotiledonales. Para la mejora del protocolo de regeneración, la desinfección con cloro gaseoso y un pretratamiento de remojo durante toda la noche en agua oxigenada comercial al 3% representaron una ventaja para aumentar el promedio de brotes por explante.

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer estudio reportado sobre la influencia de la desinfección y los pretratamientos de remojo en la regeneración de soya mexicana. Este protocolo de regeneración abre la puerta a mejoras futuras en estos genotipos mexicanos.

- (eds). Historical Technology Developments in Plant Transformation. Bentham Science Publishers. Chesterfield, Missouri, USA. pp: 46–54.
- Financiera Rural. 2013. Semilla para siembra de soya. <https://www.yumpu.com/es/document/read/30771461/semilla-para-siembra-de-soya-financiera-rural>. (Accessed: August 2018).
- Hai, H. N., S. K. Lal, S. K. Singh, K. V. Prabhu, and A. Talukdar. 2014. Direct organogenesis in some soybean genotypes using cotyledonary segments. *Indian J. Biotechnol.* 13: 527–531.
- Haun, W., A. Coffman, B. M. Clasen, Z. L. Demorest, A. Lowy, E. Ray, A. Retterath, T. Stoddard, A. Juillerat, F. Cedrone, L. Mathis, D. F. Voytas, and F. Zhang. 2014. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol. J.* 12: 934–940.
- Lee, K., B.-Y. Yi, K.-H. Kim, J.-B. Kim, S.-C. Suh, H.-J. Woo, K.-S. Shin, and S.-J. Kweon. 2011. Development of efficient transformation protocol for soybean (*Glycine max* L.) and characterization of transgene expression after *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54: 37–45.
- Li, K., W. Dong, Y. Zhao, H. Xu, J. Chen, and C. Xu. 2017. Effects of cultivar and ethanol disinfection on aseptic ermination of floquat (*Eriobotrya japonica*) seeds. *HortScience* 52: 941–945.
- Ma, X.-H., and T.-L. Wu. 2008. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiol. Plant.* 30: 209–216.
- Maroufi, K., and H. Aliabadi. 2011. Increasing of germination percentage by hydropriming method in soybean (*Glycine Max* L.). *Adv. Environ. Biol.* 5: 1663–1667.
- Mohammad, H. 2013. Hydrogen peroxide priming stimulates drought tolerance in mustard (*Brassica juncea* L.) Seedlings. *Plant Gene Trait* 4: 109–123.
- Nagle, M., A. Déjardin, G. Pilate, and S. H. Strauss. 2018. Opportunities for innovation in genetic transformation of forest trees. *Front. Plant Sci.* 9: 1–8.
- Olhoft, P. M., C. M. Donovan, and D. A. Somers. 2008. Soybean transformation using mature cotyledonary node explants. In: Wang, K. (ed). *Agrobacterium Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. pp: 385–396.
- Paz, M. M., H. Shou, Z. Guo, Z. Zhang, A. K. Banerjee, and K. Wang. 2004. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136: 167–179.
- Pratap, A., U. Prajapati, C. M. Singh, S. Gupta, M. Rathore, N. Malviya, R. Tomar, A. K. Gupta, S. Tripathi, and N. P. Singh. 2018. Potential, constraints and applications of in vitro methods in improving grain legumes. *Plant Breed.* 137: 235–249.
- Raza, G., M. B. Singh, and P. L. Bhalla. 2017. *In vitro* plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *Biomed Res. Int.* 2017: 1–9.
- Ruiz C., J. A., E. Bravo M, G. Ramirez O., A. D. Baez G., M. Alvarez C., J. L. Ramos G., U. Nava C., y K. F. Byerly M. 2013. Plagas de importancia económica en México: Aspectos de su biología y ecología. Libro Técnico Núm. 2. INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. 447 p.
- Singh, R. J., and R. L. Nelson. 2015. Intersubgeneric hybridization between *Glycine max* and *G. tomentella*: production of F1, amphidiploid, BC1, BC2, BC3, and fertile soybean plants. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1117–1136.
- Song, Z., J. Tian, W. Fu, L. Li, L. Lu, L. Zhou, Z. Shan, G. Tang, and H. Shou. 2013. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 14: 289–298.
- Stewart, C. N., M. J. Adang, J. N. All, H. R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker, and W. a Parrott. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIaC gene. *Plant Physiol.* 112: 121–129.
- Texeira, L., A. de L. Braccini, B. G. M. Churata, E. S. N. Vieira, P. K. Martins, and I. Schuster. 2011. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. *Acta Sci. Agron.* 33: 67–74.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2018. Mexico Oilseeds and Products. Annual Economic Uncertainty to Drag on Oilseed Sector Growth, USDA GAIN Report MX8013. Mexico City, 24 p.
- Ventura, L., M. Dona, A. Macovei, D. Carbonera, A. Buttafava, A. Mondoni, G. Rossi, and A. Balestrazzi. 2012. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 60: 196–206.
- Wojtyla, Ł., K. Lechowska, S. Kubala, and M. Garnczarska. 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* 7: 1–16.
- Yang, X., X. Yu, Z. Zhou, W.-J. Ma, and G. Tang. 2016. A high-efficiency *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system using cotyledonary node as explants in soybean (*Glycine max* L.). *Acta Physiol. Plant.* 38: 60.
- Yildiz, M. 2012. The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. In: Leva, A., and Rinaldi, L.M.R. (eds.), *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*. Intechopen, p. 64.
- Yildiz, M., and C. Er. 2002. The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften* 89: 259–261.
- Zhang, F., C. Chen, H. Ge, J. Liu, Y. Luo, K. Liu, L. Chen, K. Xu, Y. Zhang, G. Tan, and C. Li. 2014. Efficient soybean regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation using a whole cotyledonary node as an explant. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61: 620–625.
- Zia, M., Z. F. Rizvi, R. Riaz-ur, and M. F. Chaudhary. 2010. Micropropagation of two Pakistani soybean (*Glycine max* L.) cultivars from cotyledonary nodes. *Spanish J. Agric. Res.* 8: 448–453.
- Zulueta-Rodriguez, R., L. G. Hernandez-Montiel, B. Murillo-Amador, E. O. Rueda-Puente, L. Lara-Capistran, E. Troyo-Dieguez, and M. V. Cordoba-Matson. 2015. Effect of hydropriming and biopriming on seed germination and growth of two Mexican fir tree species in danger of extinction. *Forests* 6: 3109–3122.

NÍQUEL EN LA COMPOSICIÓN MINERAL Y EL RENDIMIENTO DE PIMIENTO MORRÓN (*Capsicum annuum* L.) CULTIVADO EN CASA SOMBRA

NICKEL IN THE MINERAL COMPOSITION AND YIELD OF BELL PEPPER (*Capsicum annuum* L.) GROWN IN A SHADE HOUSE

Saúl Parra-Terraza

Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. Km 17.5, Carretera Culiacán-Eldorado, Culiacán, Sinaloa. (saul.parra@uas.edu.mx).

RESUMEN

El níquel (Ni) es un micronutriente para plantas superiores; la información sobre este elemento y sus efectos en el rendimiento de los cultivos agrícolas es escasa, lo cual contribuye a que los productores hortícolas de México no lo apliquen en sus sistemas de producción. El rendimiento de pimiento morrón (*Capsicum annuum* cv. Cannon) cultivado en casa sombra y riego por goteo se afecta por la aplicación de Ni^{2+} al alterar las concentraciones nutrimentales en los órganos vegetales. El objetivo de este estudio fue evaluar cuatro concentraciones de Ni^{2+} en solución nutritiva (SN) (0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg L^{-1}) en la composición mineral y el rendimiento de pimiento morrón. El diseño experimental fue bloques completos al azar y cuatro repeticiones. Las variables evaluadas fueron la composición mineral de hojas, tallos y frutos, y peso, diámetro, longitud, número y el rendimiento de frutos (PF, DF, LF, NF y RF). Los resultados se analizaron con ANDEVA y los promedios se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El Ni^{2+} disminuyó las concentraciones de Cu y Zn en hojas e incrementó las concentraciones foliares de Ni, Fe, Mg, y la de N en frutos. Aunque no hubo diferencias significativas en el rendimiento, la producción mayor (71.32 Mg ha^{-1}) se obtuvo con $1.0 \text{ mg Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ en la SN, superior en 10.63 Mg ha^{-1} a la del tratamiento sin Ni^{2+} (60.69 Mg ha^{-1}). El níquel no se detectó en los frutos, los cuales pueden consumirse en fresco sin riesgos para la salud humana. La aplicación de $1.0 \text{ mg Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ en la SN aumentó en 14.9% el rendimiento de pimiento morrón cultivado en casa sombra y riego por goteo.

Palabras clave: níquel, *Capsicum annuum*, micronutriente, antagonismo, casa sombra.

ABSTRACT

Nickel (Ni) is a micronutrient for higher plants; the information about this element and its effects on agricultural crops is scarce. Because of that, horticulture producers in Mexico do not apply Nickel in their production systems. The yield of bell pepper (*Capsicum annuum* cv. Cannon) grown in a shade house with drip irrigation is affected by the application of Ni^{2+} by altering the nutrimental concentrations in the plant organs. The objective of this study was to evaluate four concentrations of Ni^{2+} in nutritive solution (NS) (0, 0.5, 1.0 and 1.5 mg L^{-1}) in the mineral composition and yield of bell pepper. The experimental design was complete randomized blocks and four replications. The variables evaluated were the mineral composition of leaves, stems and fruits, along with weight, diameter, length, number and yield of fruits (PF, DF, LF, NF, and RF). The results were analyzed with ANOVA and the averages were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The Ni^{2+} reduced the concentrations of Cu and Zn in leaves and increased the foliar concentrations of Ni, Fe, Mg, and N in fruits. Although there were no significant differences in yield, highest production (71.32 Mg ha^{-1}) was obtained with $1.0 \text{ mg Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ in the NS, higher by 10.63 Mg ha^{-1} than that of the treatment without Ni^{2+} (60.69 Mg ha^{-1}). The nickel was not detected in the fruits, which can be consumed fresh without risks for human health. The application of $1.0 \text{ mg Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ in the NS increased by 14.9% the yield of bell pepper grown in a shade house using drip irrigation.

Key words: nickel, *Capsicum annuum*, micronutrient, antagonism, shade house.

INTRODUCTION

In 2014, 32.3 million Mg of green chilis were produced in 1.9 million ha in the world (FAOSTAT, 2017). In the same year, Mexico produced 2.45 million Mg in 129 476 ha; 19.8%

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 54: 401-411. 2020.

INTRODUCCIÓN

En 2014 se produjeron 32.3 millones de Mg de chiles verdes en 1.9 millones de ha en el mundo (FAOSTAT, 2017). En el mismo año, México produjo 2.45 millones de Mg en 129 476 ha; al estado de Sinaloa corresponde el 19.8% de la producción y el 9.7% de la superficie sembrada (SIAP, 2017). En México se siembran aproximadamente 26 especies de chiles verdes, de ellas, la mayor producción es de pimienta morrón (*Capsicum annuum* L.). En 2016, 96% de la superficie cosechada de pimienta (3266 ha) se realizó en Sinaloa, y generó un valor de producción cercano a mil millones de pesos (SIAP, 2017).

El Ni es uno de los 17 nutrimentos esenciales para las plantas (Brown *et al.*, 1987); interviene en el metabolismo del N debido a que es un componente estructural de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) (Dixon *et al.*, 1975; Marschner, 2002). Esta enzima cataliza la hidrólisis de la urea, en el suelo o en la planta, y produce amonio y dióxido de carbono. El Ni participa en el metabolismo de los aminoácidos y del carbono (Bai *et al.*, 2006); contribuye al reciclamiento de H_2 producto de la fijación simbiótica del N por ser parte de la enzima hidrogenasa (EC 1.12.1.3), por lo tanto, un nivel bajo de Ni en los suelos agrícolas afecta la fijación simbiótica del N en leguminosas (Ruiz-Argüeso *et al.*, 2000).

Brown (2006) indicó que los factores principales que provocan una deficiencia de Ni en los cultivos son: 1) excesos de Cu y Zn que inhiben por competencia la absorción de Ni por las raíces, 2) pH del suelo mayor de 6.5 que aumenta los compuestos poco solubles de óxidos de Ni, 3) suelos con altos contenidos de Fe, Mn, Ca y Mg, 4) dosis excesivas de N o de cal agrícola, 5) niveles altos de P en el suelo que incrementan la formación de fosfato de Ni y, 6) inhibición de la enzima ureasa por la acumulación de Cu en las plantas. La deficiencia de Ni en las plantas provoca alteración en la síntesis de proteínas, reducción en el N total y una acumulación de urea, nitrato y aminoácidos (Brown *et al.*, 1990), todo lo cual origina síntomas de clorosis en las hojas y de necrosis en las células meristemáticas en cultivos como la soya (*Glycine max* L.) (Eskew *et al.*, 1984).

En cultivos de avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) se observó que la falta de Ni provoca inhibición del crecimiento y reducción en la formación de granos

de producción correspondiendo to the state of Sinaloa and 9.7% of the sown surface (SIAP, 2017). In Mexico, approximately 26 species of green chilis are sown, highest production corresponding to bell pepper (*Capsicum annuum* L.). In 2016, 96% of the harvested surface of this species (3266 ha) occurred in Sinaloa, generating a production value close to a billion pesos (SIAP, 2017).

Ni is one of the 17 essential nutrients for plants (Brown *et al.*, 1987); it intervenes in the metabolism of N due to the fact that it is a structural component of the enzyme urease (EC 3.5.1.5) (Dixon *et al.*, 1975; Marschner, 2002). This enzyme catalyzes the hydrolysis of urea, in the soil or in the plant, and produces ammonia and carbon dioxide. Ni participates in the metabolism of the amino acids and carbon (Bai *et al.*, 2006); it contributes to the recycling of H_2 , product of the symbiotic fixation of N due to being part of the enzyme hydrogenase (EC 1.12.1.3). Therefore, a low level of Ni in agricultural soils affects the symbiotic fixation of N in legumes (Ruiz-Argüeso *et al.*, 2000).

Brown (2006) indicated that the principal factors caused by a deficiency of Ni in crops are as follows: 1) Cu or Zn in excess, which inhibit by competition the uptake of Ni by the roots, 2) soil pH higher than 6.5 that increases Ni oxides, particularly low solubility compounds 3) soils with high contents of Fe, Mn, Ca and Mg, 4) excessive doses of N or of agricultural lime, 5) high levels of P in the soil which increase the formation of Ni phosphate, and 6) inhibition of the enzyme urease by the accumulation of Cu in the plants. The deficiency of Ni in the plants causes alteration in the synthesis of proteins, reduction in the total N and accumulation of urea, nitrate and amino acids (Brown *et al.*, 1990), which produce symptoms of chlorosis in the leaves and necrosis in the meristematic cells in crops such as soybean (*Glycine max* L.) (Eskew *et al.*, 1984).

In oat (*Avena sativa* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) crops, it was observed that the lack of Ni provokes growth inhibition and reduction of grain formation (Brown *et al.*, 1990). Whilst, in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Ni increased yield, quality and nutrimental state of the fruits (Palacios *et al.*, 1998). Khoshgoftarmansh and Bahmanziari (2012) reported that the addition of 50 μM Ni^{2+} to the nutritive solution increased yield, total soluble solids and firmness of cucumber fruits (*Cucumis sativus* L.).

(Brown *et al.*, 1990). Mientras que, en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) el Ni aumentó el rendimiento, la calidad y el estado nutrimental de los frutos (Palacios *et al.*, 1998). Khoshgoftarmanesh y Bahmanzari (2012) reportaron que la adición de 50 μM Ni^{2+} a la solución nutritiva aumentó el rendimiento, los sólidos solubles totales y la firmeza de los frutos de pepino (*Cucumis sativus* L.).

En suelos agrícolas los contenidos de Ni^{2+} varían de 3 a 1000 mg kg^{-1} (Cempel y Nickel, 2006), con promedio de 50 mg kg^{-1} (Liu *et al.*, 2011), aunque en suelos contaminados por Ni^{2+} las concentraciones de este elemento son de 200 a 26 000 mg kg^{-1} (Izosimova, 2005). El nivel foliar crítico de toxicidad de Ni en especies sensibles es mayor de 25 mg por kg de materia seca (Malavolta y Moraes, 2007). Un nivel adecuado es menor de 10 (Marschner, 2002), en especies moderadamente tolerantes es de 50 (Asher, 1991), y en plantas hiperacumuladoras es de 1000 (Pollard *et al.*, 2002).

Las raíces de las plantas absorben el Ni en forma de catión Ni^{2+} (Liu *et al.*, 2011) y lo incorporan a la biomasa aérea, de donde puede movilizarse a las semillas y a los frutos en forma de complejos con ácidos orgánicos (Brown, 2006). En México no hay información disponible sobre la influencia del Ni en el rendimiento de los cultivos agrícolas, por eso el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de cuatro concentraciones de Ni^{2+} en la solución nutritiva en la composición mineral y el rendimiento de pimiento morrón desarrollado en casa sombra y con riego por goteo. Así, el conocimiento de las respuestas del pimiento al Ni^{2+} ayudará a diseñar acciones para su uso y manejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una casa sombra ubicada en Culiacán, Sinaloa, México a 24° 37' 29" N, 107° 24' 30" O, y 38 m de altitud. El suelo es tipo Vertisol Usterts (Soil Survey Staff, 2015), con capacidad de campo de 64%, punto de marchitamiento permanente de 39%, y humedad aprovechable de 25%, con base en el peso de suelo seco. El contenido de materia orgánica es 1.1%, pH 7.4, conductividad eléctrica 0.4 dS m^{-1} , capacidad de intercambio catiónico 71 cmol kg^{-1} , 0.07% N, 7 y 300 mg kg^{-1} de P y K, respectivamente; las concentraciones de micronutrientes ($\mu\text{g g}^{-1}$) son: Fe (6.6), Cu (1.9), Mn (13.7), Zn (0.6).

Semillas de pimiento morrón (*Capsicum annuum* cv. Cannon) se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades llenadas con turba, en condiciones de invernadero. Diez días

In agricultural soils the contents of Ni^{2+} vary from 3 to 1000 mg kg^{-1} (Cempel and Nickel, 2006), with an average of 50 mg kg^{-1} (Liu *et al.*, 2011), although in soils contaminated by Ni^{2+} the concentrations of this element are from 200 to 26 000 mg kg^{-1} (Izosimova, 2005). The critical foliar level of toxicity of Ni in sensitive species is higher than 25 mg per kg of dry matter (Malavolta and Moraes, 2007). An adequate level is lower than 10 (Marschner, 2002), in moderately tolerant species it is 50 (Asher, 1991), and in hyperaccumulating plants it is 1000 (Pollard *et al.*, 2002).

The roots of plants absorb the Ni in the form of cation Ni^{2+} (Liu *et al.*, 2011) and they incorporate it to the aboveground biomass, from where it can be mobilized to the seeds and the fruits in the form of complexes with organic acids (Brown, 2006). In Mexico there is no information available of the influence of Ni in yield of agricultural crops; therefore, the objective of this study was to determine the effect of four concentrations of Ni^{2+} in the nutritive solution on the mineral composition and yield of bell pepper grown in shade house and with drip irrigation. Thus, the knowledge of the responses of bell pepper to Ni^{2+} will help to design actions for its use and management.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in a shade house located in Culiacán, Sinaloa, Mexico at 24° 37' 29" N, 107° 24' 30" W, and 38 m altitude. The soil is Vertisol Usterts (Soil Survey Staff, 2015), with 25% field capacity, permanent wilting point 39%, usable moisture 25%, based on dry soil weight. The content of organic matter is 1.1%, pH 7.4, electric conductivity 0.4 dS m^{-1} , cationic exchange capacity 71 cmol kg^{-1} , 0.07% N, 7 and 300 mg kg^{-1} of P and K, respectively; the concentrations of micronutrients ($\mu\text{g g}^{-1}$) are as follows: Fe (6.6), Cu (1.9), Mn (13.7), Zn (0.6).

Bell pepper seeds (*Capsicum annuum* cv. Cannon) were sown in polystyrene trays of 200 cavities filled with peat, under greenhouse conditions. Ten days after sowing (das), when the seedlings presented the first green leaf, and until 20 das, daily irrigation was applied with 50% NS (universal Steiner nutrient solution) (Steiner, 1984), from 21 to 31 das watering was made with 75% NS, from 32 to 43 das irrigation applied was 100% NS. NS was prepared with reactive grade organic salts and distilled water, and the following concentrations of micronutrients (mg L^{-1}) were added: Fe 2.5, Mn 0.5, B 0.5, Cu 0.02 and Zn 0.05 (Parra, 2016).

después de la siembra (dds), cuando las plántulas tenían la primera hoja verdadera y hasta los 20 dds se aplicó un riego diario con la SN universal de Steiner (Steiner, 1984) al 50%, de los 21 a los 31 dds se aplicó la SN al 75%, de los 32 a los 43 dds se aplicó la SN al 100%. La SN se preparó con sales inorgánicas grado reactivo y agua destilada y se añadieron las concentraciones de micronutrientes (mg L^{-1}) siguientes: Fe 2.5, Mn 0.5, B 0.5, Cu 0.02 y Zn 0.05 (Parra, 2016).

El trasplante de las plántulas se realizó 44 dds; el suelo se preparó con la remoción manual de residuos vegetales y malezas, se desmenuzaron los terrones con pala y azadón, y se formaron las camas separadas a 1.8 m; se instaló el riego por goteo con dos cintas regantes por cama y goteros cada 0.3 m con un gasto por gotero de 1 L h^{-1} ; las camas se acolcharon con polietileno bicolor blanco arriba y negro abajo; el trasplante se realizó a doble hilera en suelo húmedo después de un riego de 8 h, con distancias de 0.4 m entre plantas y 0.4 m entre hileras de plantas, para una densidad de 27 778 plantas ha^{-1} .

El criterio para definir las concentraciones de Ni^{2+} utilizadas fue considerar las concentraciones propuestas por Steiner (1984) para los micronutrientes Fe, Mn, Zn y B, las cuales varían de 0.2 a 2 mg L^{-1} . Los tratamientos estudiados fueron cuatro concentraciones de Ni^{2+} : 0, 0.5, 1 y 1.5 mg L^{-1} a partir de NiSO_4 y $6\text{H}_2\text{O}$, aplicados a la SN universal de Steiner, cuya composición química es la siguiente: 12, 1, 7, 7, 9 y $4 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de NO_3^- , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , respectivamente (Steiner, 1984). La solución universal se complementó con las concentraciones de micronutrientes, descritas anteriormente. Las SN se prepararon con agua de riego con CE de 0.3 dS m^{-1} y pH de 7, clasificada como C1S1 (riesgo bajo de salinización y sodificación) (Ayers y Westcot, 1985); por lo tanto, los nutrientes presentes en el agua se consideraron en la formulación de las SN. El diseño experimental fue bloques completos al azar con cuatro repeticiones; la unidad experimental correspondió a un surco de 6 m de largo y un área de 10.8 m^2 ($6 \text{ m} \times 1.8 \text{ m}$); el rendimiento se evaluó en un área de 1.8 m^2 (seis plantas), en el centro de cada unidad experimental.

Los tratamientos se colocaron en cuatro depósitos de plástico de 200 L de capacidad, con un manejo en circuito abierto, sin reciclaje de las SN, las cuales se distribuyeron a las unidades experimentales por medio de cuatro bombas de 1 hp y cintas de riego. El crecimiento vertical de las plantas se apoyó con postes de madera de 8 cm de diámetro por 2.5 m de altura, distanciados 3 m e introducidos 30 cm en el suelo. Las plantas se sujetaron con hilos de rafia colocados horizontalmente uno sobre otro cada 30 cm, a lo largo de la hilera de plantas. Los primeros 30 ddt (días después del trasplante), el riego se aplicó cuando la tensión de humedad del suelo alcanzó valores de 12-15 kPa en los tensiómetros colocados a 15 cm de profundidad; después se regó cuando

The seedlings were transplanted at 44 das; the soil was prepared with manual removal of plant residue and weeds, clumps were broken up with a shovel and hoe, and the planting beds were separated at 1.8 m. Drip irrigation was installed with two drip hoses per bed and emitters every 0.3 m with a flow of 1 L h^{-1} per emitter. The beds were cushioned with bicolored polyethylene, white above and black below. Transplanting was carried out in double rows in moist soil after an irrigation of 8 h, with distances of 0.4 m between plants and 0.4 m between plant rows, with a density of 27 778 plants ha^{-1} .

The criterion for defining the concentrations of Ni^{2+} was to consider the concentrations proposed by Steiner (1984) for the micronutrients Fe, Mn, Zn and B, which vary from 0.2 to 2 mg L^{-1} . The treatments consisted of four concentrations of Ni^{2+} : 0, 0.5, 1 and 1.5 mg L^{-1} based on NiSO_4 and $6\text{H}_2\text{O}$, applied to the universal Steiner NS, whose chemical composition is as follows: 12, 1, 7, 7, 9 and $4 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ of NO_3^- , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively (Steiner, 1984). The universal Steiner solution was complemented with the aforementioned concentrations of micronutrients. The NS were prepared with irrigation water with CE of 0.3 dS m^{-1} and pH of 7, classified as C1S1 (low risk of salinization and sodification) (Ayers and Westcot, 1985). Therefore, the nutrients present in the water were considered in the formulation of the NS. The experimental design was of complete randomized blocks with four replications. The experimental unit was the furrow, 6 m length and an area of 10.8 m^2 ($6 \text{ m} \times 1.8 \text{ m}$). Yield was evaluated in an area of 1.8 m^2 (six plants), in the center of each experimental unit.

Treatments were placed in four plastic containers of 200 L capacity, with open circuit management, without recycling of the NS, which were distributed to the experimental units by four 1 hp pumps and irrigation hose. The vertical growth of the plants was supported with wooden posts of 8 cm diameter by 2.5 m height, spaced at 3 m and introduced 30 cm in the soil. The plants were secured with raffia twine placed horizontally one over another every 30 cm, all along the plant row. Irrigation was applied after the first 30 dat (days after transplant) when the soil moisture tension reached values of 12-15 kPa in the tensiometers placed at 15 cm depth. Then, irrigation was applied when the average readings of the tensiometers placed at 15 and 30 cm in each experimental unit were from 15-18 kPa. In total the water level applied was 333 mm ($3330 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$) during the crop cycle; and 539, 96, 357, 853, 479 and 122 kg ha^{-1} of N were applied in the form of NO_3^- , P, S, K, Ca and Mg, respectively.

In the final fruit cutting (164 dat), one plant per experimental unit was selected (four plants per treatment), which were sectioned by their different organs and dried at 70°C to constant weight, then ground and passed through a sieve of 0.5 mm diameter. The chemical analysis for quantifying the nutritional

las lecturas promedio de los tensiómetros colocados a 15 y 30 cm en cada unidad experimental fueron de 15-18 kPa; en total la lámina de agua usada fueron 333 mm (3330 m³ ha⁻¹) durante el ciclo del cultivo; y se aplicaron 539, 96, 357, 853, 479 y 122 kg ha⁻¹ de N en forma de NO₃⁻, P, S, K, Ca y Mg, respectivamente.

En el último corte de frutos (164 ddt) se seleccionó una planta por cada unidad experimental (cuatro plantas por tratamiento), las cuales se seccionaron en sus diferentes órganos y se secaron a 70 °C hasta peso constante, se molieron y se pasaron por un tamiz de 0.5 mm de diámetro. El análisis químico para cuantificar la concentración nutrimental en hojas, tallos y frutos, se realizó conforme a las metodologías propuestas por Motsara y Roy (2008), excepto el Ni que se evaluó por espectrofotometría de absorción atómica.

Los frutos se cosecharon cuando el 90% de la superficie era de color rojo, solo se registraron los frutos que medían al menos 6.4 cm de diámetro y longitud. La cosecha inició 90 ddt y finalizó 164 ddt. Los componentes del rendimiento registrados fueron: longitud, diámetro, peso y número de frutos por planta (LF, DF, PF y NF, respectivamente) y rendimiento de frutos (RF) por ha. El análisis de los datos incluyó ANDEVA y comparación de medias ($p \leq 0.05$), mediante el sistema computacional Statistical Analysis System v. 9.4 (SAS Institute, Inc., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferencias en concentraciones de Mg en hojas, y de N en frutos fueron significativas ($p \leq 0.05$; Cuadro 1). Los tratamientos de 1.0 y 1.5 mg Ni²⁺ L⁻¹ aumentaron la concentración de Mg en las hojas comparado con 0 y 0.5 mg Ni²⁺ L⁻¹. Este resultado coincide con Yang *et al.* (1996) quienes reportaron que las concentraciones de Mg en hojas de col (*Brassica oleracea* L.) y de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) no se redujeron en concentraciones menores de 7 mg Ni²⁺ L⁻¹ de solución. Sin embargo, difiere de Nishida *et al.* (2015) quienes informaron sobre una reducción en la absorción de Mg²⁺ en plantas de *Arabidopsis thaliana* L., debido a que Ni²⁺ y Mg²⁺ compiten por los sitios de unión eléctrica a nivel celular (Lock *et al.*, 2007), porque tienen la misma carga eléctrica (2⁺) y radios iónicos similares (0.69 Å y 0.72 Å, respectivamente) que afectan la entrada de Mg²⁺ al interior de la célula.

Degryse *et al.* (2012) en espinaca (*Spinacia oleracea* L.), Worms *et al.*, (2007) en algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii* L.) y Lock *et al.* (2007) en cebada reportaron que el Mg²⁺ disminuyó la entrada del Ni²⁺ a los sitios de transporte en la membrana

concentration in leaves, stems and fruits was performed according to the methodologies proposed by Motsara and Roy (2008), except the Ni, which was evaluated by spectrophotometry of atomic absorption.

The fruits were harvested when 90% of the surface was red, only the fruits that measured at least 6.4 cm diameter and length were registered. Harvest initiated at 90 dat and concluded 164 dat. Yield components registered were as follows: length, diameter, weight and number of fruits per plant (LF, DF, PF and NF, respectively) and fruit yield (RF) per ha. The analysis of data included ANOVA and comparison of means ($p \leq 0.05$), using the computational system Statistical Analysis System v. 9.4 (SAS Institute Inc., 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

The differences in concentrations of Mg in leaves and of N in fruits were significant ($p \leq 0.05$; Table 1). The treatments of 1.0 and 1.5 mg Ni²⁺ L⁻¹ increased the concentration of Mg in the leaves compared with 0 and 0.5 mg Ni²⁺ L⁻¹. This result coincides with Yang *et al.* (1996), who reported that the concentrations of Mg in leaves of cabbage (*Brassica oleracea* L.) and of white clover (*Trifolium repens* L.) were not reduced in concentrations lower than 7 mg Ni²⁺ L⁻¹ of solution. However, this differs from Nishida *et al.* (2015) who reported a reduction in the uptake of Mg²⁺ in plants of *Arabidopsis thaliana* L., due to the fact that Ni²⁺ and Mg²⁺ compete for the sites of electric union at the cellular level (Lock *et al.*, 2007). Competition occurs because they have the same electric charge (2⁺) and similar ionic radii (0.69 Å and 0.72 Å, respectively) which affect the entrance of Mg²⁺ to the interior of the cell.

Degryse *et al.* (2012) in spinach (*Spinacia oleracea* L.), Worms *et al.* (2007) in green algae (*Chlamydomonas reinhardtii* L.) and Lock *et al.* (2007) in barley, reported that the Mg²⁺ diminished the entrance of Ni²⁺ to the transport sites in the cell membrane. The differences in the concentrations of Mg obtained by the above mentioned authors, and those reported in this study can be attributed to variations in the concentrations of Ni²⁺ (6 to 59 mg Ni²⁺ L⁻¹); the species of plants; the duration of the studies of nutrimental absorption (1 to 120 h); and the concentrations of Mg²⁺ (≤ 20 mM L⁻¹) used by cited researchers, compared to the conditions used in our study (164 d term, ≤ 1.5 mg Ni²⁺ L⁻¹ and 2 mM Mg²⁺ L⁻¹).

Cuadro 1. Suministro de Ni^{2+} en la solución nutritiva y las concentraciones de N, P, K, Ca y Mg en órganos de pimiento morrón.**Table 1. Supply of Ni^{2+} in the nutritive solution and the concentrations of N, P, K, Ca and Mg in organs of bell pepper.**

Órgano	Ni^{2+} (mg L^{-1})	N	P	K (g kg^{-1})	Ca	Mg
Hoja	0.0	24 a	3 a	37 a	5 a	1.0 b
	0.5	26 a	6 a	44 a	5 a	1.0 b
	1.0	20 a	4 a	41 a	6 a	1.3 a
	1.5	28 a	3 a	39 a	6 a	1.3 a
Tallo	0.0	24 a	3 a	19 a	5 a	1.7 a
	0.5	26 a	6 a	22 a	5 a	1.8 a
	1.0	20 a	4 a	22 a	6 a	1.5 a
	1.5	28 a	3 a	20 a	6 a	1.7 a
Fruto	0.0	15 b	12 a	22 a	5 a	0.6 a
	0.5	16 b	14 a	21 a	5 a	0.7 a
	1.0	13 b	13 a	18 a	5 a	0.8 a
	1.5	24 a	14 a	22 a	4 a	0.8 a

Valores medios con letra distinta indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$) ♦
Mean values with different letter indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$).

celular. Las diferencias en las concentraciones de Mg obtenidas por los investigadores antes mencionados, y las reportadas en este estudio, pueden atribuirse a variaciones en las concentraciones de Ni^{2+} (6 a 59 $\text{mg Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$); a las especies de plantas; a la duración de sus estudios de absorción nutrimental (1 a 120 h); y a las concentraciones de Mg^{2+} ($\leq 20 \text{ mM L}^{-1}$) usadas por estos investigadores y las utilizadas en este estudio (164 d de duración, $\leq 1.5 \text{ mg Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ y $2 \text{ mM Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$).

La concentración mayor de N en hojas, tallos y frutos se obtuvo con 1.5 mg L^{-1} de Ni^{2+} , aunque solo fue significativa en frutos, lo cual coincide con Gad *et al.* (2007) quienes encontraron que el Ni aumentó la concentración de N en frutos de tomate. Esto puede atribuirse a que el Ni es indispensable para el metabolismo del N, la síntesis de proteínas y para regular la actividad de la enzima nitrato reductasa, por lo que un nivel adecuado de Ni contribuye al aumento del N total (Brown *et al.*, 1990). Kutman *et al.* (2013) y Siqueira *et al.* (2018) indicaron que el Ni aumenta la eficiencia en el metabolismo del N, e incrementa las concentraciones de este elemento en hojas y semillas de soya.

Por el contrario, una deficiencia de Ni afecta la síntesis de proteínas y reduce el N total (Brown *et al.*, 1990). Los niveles de Ni^{2+} en la SN afectaron

The highest concentration of N in leaves, stems and fruits was obtained with 1.5 mg L^{-1} of Ni^{2+} , although it was only significant in fruits, which coincides with Gad *et al.* (2007), who found that Ni increased the concentration of N in tomato fruits. This fact could be due to Ni is essential to N metabolism, to the synthesis of proteins and to regulate the activity of the enzyme nitrate reductase. Thus, an adequate level of Ni contributes to the increase of the total N (Brown *et al.*, 1990). Kutman *et al.* (2013) and Siqueira *et al.* (2018) indicated that Ni increases the efficiency of the metabolism of N, and increases the concentration of this element in leaves and seeds of soybean.

On the contrary, a deficiency of Ni affects the synthesis of proteins and reduces the total N (Brown *et al.*, 1990). The levels of Ni^{2+} in the NS affected ($p \leq 0.05$) the concentrations of Cu, Zn, Fe and Ni in leaves, and of Cu in stems (Table 2). The lowest concentrations of Zn in leaves, and of Cu in stems were obtained with $1 \text{ mg Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ in the NS. The reductions of both cations reflect a competition for the same cellular transporter among these three ions. Our results coincide with Cataldo *et al.* (1978), who indicated an antagonism of the Cu^{2+} and Zn^{2+} over the Ni^{2+} , since both cations inhibited the absorption of Ni^{2+} in soybean plants, and in plants of cabbage,

($p \leq 0.05$) las concentraciones de Cu, Zn, Fe, y Ni en hojas, y de Cu en tallos (Cuadro 2). Las concentraciones menores de Zn en hojas, y de Cu en tallos se obtuvieron con 1 mg $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ en la SN; las reducciones de ambos cationes reflejan una competencia por el mismo transportador celular entre estos tres iones. Nuestros resultados coinciden con Cataldo *et al.* (1978) quienes señalaron un antagonismo del Cu^{2+} y Zn^{2+} sobre el Ni^{2+} , ya que ambos cationes inhibieron la absorción de Ni^{2+} en plantas de soya, y en plantas de col, y maíz (*Zea mays* L.) (Yang *et al.*, 1996). Tang y Miller (1991) mencionaron antagonismo entre Ni^{2+} y Cu^{2+} en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), y Nishida *et al.* (2015) indicaron que a la absorción de Ni^{2+} la reduce el Zn^{2+} en *Arabidopsis thaliana* L., porque el mismo transportador absorbe ambos cationes.

Las concentraciones de Fe en las hojas aumentaron con los tratamientos de Ni, la mayor concentración de Fe se obtuvo con 1 mg $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$, la cual fue significativa ($p \leq 0.05$) comparada con 0 mg $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (Cuadro 2). Este resultado coincidió con los resultados de Matraszek *et al.* (2002), y Torres *et al.* (2016), quienes documentaron aumentos en las concentraciones de Fe provocadas por el Ni en hojas de maíz y espinaca, respectivamente. Nishida *et al.* (2011) encontraron que la aplicación de 50 μM Ni^{2+} aumentó

and maize (*Zea mays* L.) (Yang *et al.*, 1996). Tang and Miller (1991) mentioned antagonism between Ni^{2+} and Cu^{2+} in the rice crop (*Oryza sativa* L.), and Nishida *et al.* (2015) reported that the uptake of Ni^{2+} is reduced by Zn^{2+} in *Abidopsis thaliana* L., because the same transporter absorbs both cations.

The concentrations of Fe in the leaves increased with the treatments of Ni; the highest concentration of Fe was obtained with 1 mg $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$, which was significant ($p \leq 0.05$) compared with 0 mg $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (Table 2). This result coincided with the results of Matraszek *et al.* (2002), and Torres *et al.* (2016), who reported increases in the concentrations of Fe caused by the Ni in leaves of maize and spinach, respectively. Nishida *et al.* (2011) found that the application of 50 μM Ni^{2+} increased the accumulation of Fe in plants of *Arabidopsis thaliana*, due to the fact that the Ni^{2+} increased the uptake of Fe^{2+} through the roots by inducing the expression of the Fe transporter AtIRT1.

By contrast, Ahmad *et al.* (2011) in the sunflower (*Helianthus annuum* L.) crop, Rahman *et al.* (2005) in oats, Palacios *et al.* (1998) in tomato, and Matraszek *et al.* (2002) in lettuce (*Lactuca sativa* L.) registered that Ni decreased the concentrations of Fe in these crops, which they attributed to a competition for the sites of electric union at the cell level. The

Cuadro 2. Suministro de Ni^{2+} en la solución nutritiva y concentraciones de Cu, Mn, Fe, Zn y Ni en órganos de pimiento morrón.

Table 2. Supply of Ni^{2+} in the nutritive solution and concentrations of Cu, Mn, Fe, Zn and Ni in organs of bell pepper.

Órgano	Ni^{2+} (mg L^{-1})	Cu	Mn	Fe (mg kg^{-1})	Zn	Ni
Hoja	0.0	18.0 a	8.0 a	13.0 b	5.4 a	0.1 b
	0.5	8.3 b	7.0 a	20.0 ab	5.3 a	20.0 a
	1.0	6.0 b	8.0 a	23.0 a	3.0 b	23.0 a
	1.5	7.3 b	6.0 a	21.0 ab	4.9 ab	28.0 a
Tallo	0.0	5.4 a	5.0 a	14.0 a	6.0 a	nd [†]
	0.5	3.2 ab	5.0 a	15.0 a	6.0 a	nd
	1.0	2.6 b	4.0 a	24.0 a	5.0 a	nd
	1.5	3.5 ab	5.0 a	19.0 a	4.0 a	nd
Fruto	0.0	3.2 a	3.0 a	19.0 a	3.0 a	nd
	0.5	4.5 a	4.0 a	18.0 a	2.0 a	nd
	1.0	4.4 a	4.0 a	17.0 a	5.0 a	nd
	1.5	5.1 a	5.0 a	19.0 a	4.0 a	nd

Valores medios con letra distinta indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$); [†]nd = no detectado ♦
Mean values with different letter indicate statistical differences (Tukey; $p \leq 0.05$); [†]nd = not detected.

la acumulación de Fe en plantas de *Arabidopsis thaliana*, debido a que el Ni^{2+} aumentó la absorción de Fe^{2+} por las raíces al inducir la expresión del transportador de Fe AtIRT1.

En contraste, Ahmad *et al.* (2011) en el cultivo de girasol (*Helianthus annuum* L.), Rahman *et al.* (2005) en avena, Palacios *et al.* (1998) en tomate, y Matraszek *et al.* (2002) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) registraron que el Ni disminuyó las concentraciones de Fe en estos cultivos, lo cual atribuyeron a una competencia por los sitios de unión eléctrica a nivel celular. El Ni^{2+} (0.69 Å) y Fe^{2+} (0.64 Å) tienen radios iónicos parecidos y se absorben vía el transportador de Fe IRT1 (Nishida *et al.*, 2011). Los aumentos o reducciones registrados en las concentraciones de Fe por efecto del Ni, quizás se relacionan con las diferencias en los materiales genéticos o las especies de plantas elegidas, los suelos o medios de cultivo y las concentraciones de Ni utilizadas, entre otros factores.

Los diferentes tratamientos afectaron de modo significativo ($p \leq 0.05$) la concentración de Ni en las hojas (Cuadro 2); hubo una relación directa entre la concentración de Ni^{2+} en las SN y la concentración de Ni en las hojas. La concentración mayor de Ni se obtuvo con 1.5 mg Ni^{2+} L⁻¹, la cual fue igual a 0.5 y 1 mg Ni^{2+} L⁻¹ pero estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) al tratamiento con 0 mg Ni^{2+} L⁻¹. Otros autores han documentado el aumento del Ni en la biomasa aérea de las plantas en respuesta a las concentraciones de Ni^{2+} en el medio de crecimiento vegetal (Cataldo *et al.*, 1978; Matraszek *et al.*, 2002; Nishida *et al.*, 2011; Mohammadzadeh *et al.*, 2014; Rathor *et al.*, 2014).

Las concentraciones de Ni, Ca y Mg en las hojas se correlacionaron en forma positiva (0.79, 0.56 y 0.66, respectivamente) y significativa ($p \leq 0.05$) con el Ni^{2+} en la solución nutritiva. Esta correlación positiva indica que al aumentar la concentración de Ni^{2+} en solución aumentaron las concentraciones de los nutrimentos antes mencionados; mientras que el Cu se correlacionó de manera negativa (-0.68) y significativa ($p \leq 0.01$) con el Ni^{2+} , porque la concentración de Cu en las hojas se redujo con los aumentos de Ni^{2+} en la solución nutritiva.

El Ni no se detectó en los frutos de pimiento, ya que la concentración menor cuantificada por absorción atómica en hojas fue de 0.1 mg kg⁻¹. Por lo tanto, el pimiento morrón tratado con Ni en este estudio

Ni^{2+} (0.69 Å) and Fe^{2+} (0.64 Å) have similar ionic radii and are absorbed via the Fe transporter IRT1 (Nishida *et al.*, 2011). The increments or reductions reported in the concentrations of Fe under the effect of Ni are related perhaps to the differences in the genetic materials or the plant species chosen, the soils or culture media and the concentrations of Ni used, among other factors.

The different treatments significantly affected ($p \leq 0.05$) the concentration of Ni in the leaves (Table 2); there was a direct relation between the concentration of Ni^{2+} in the NS and the concentration of Ni in the leaves. The highest concentration of Ni was obtained with 1.5 mg Ni^{2+} L⁻¹, which was equal to 0.5 and 1 mg Ni^{2+} L⁻¹, but statistically different ($p \leq 0.05$) from the treatment with 0 mg Ni^{2+} L⁻¹. Other authors have reported the increase of Ni in the aboveground biomass of the plants in response to the concentrations of Ni^{2+} in the plant growth medium (Cataldo *et al.*, 1978; Matraszek *et al.*, 2002; Nishida *et al.*, 2011; Mohammadzadeh *et al.*, 2014; Rathor *et al.*, 2014).

The concentrations of Ni, Ca and Mg in the leaves were correlated positively (0.79, 0.56 and 0.66, respectively) and significantly ($p \leq 0.05$) with the Ni^{2+} in the nutritive solution. This positive correlation indicates that, as the concentration of Ni^{2+} in solution was increased, there was an increase in the concentrations of the above mentioned nutrients; whereas the Cu was negatively (-0.68) and significantly ($p \leq 0.05$) correlated with the Ni^{2+} , because the concentration of Cu in the leaves was reduced with the increments of Ni^{2+} in the nutritive solution.

Ni was not detected in the pepper fruits, given that the lower concentration quantified by atomic absorption in the leaves was 0.1 mg kg⁻¹. Therefore, bell pepper treated with Ni in this study is a safe food for humans, whose maximum consumption is 1.33 mg Ni d⁻¹ for an adult with a weight of 66.6 kg (US-EPA, 1991). The highest fruit yield (71.32 Mg ha⁻¹) was obtained with 1.0 mg Ni^{2+} L⁻¹ in the NS (Table 3), equivalent to 3.33 kg Ni^{2+} ha⁻¹; this value was 10.63 Mg ha⁻¹ higher than the treatment without Ni^{2+} . However, ANOVA did not show significant effects in the yield nor in its components, because yield change was lower than the significant difference (14.26 Mg ha⁻¹) value.

es un alimento seguro para los seres humanos, cuyo consumo máximo es 1.33 mg Ni d⁻¹ para un adulto con peso de 66.6 kg (US-EPA, 1991). El rendimiento mayor de fruto (71.32 Mg ha⁻¹) se obtuvo con 1.0 mg Ni²⁺ L⁻¹ en la SN (Cuadro 3), equivalente a 3.33 kg Ni²⁺ ha⁻¹; valor superior en 10.63 Mg ha⁻¹ respecto al tratamiento sin Ni²⁺. Sin embargo, el ANDEVA no mostró efectos significativos en el rendimiento ni en sus componentes; porque el cambio en el rendimiento fue menor que el valor de diferencia significativa (14.26 Mg ha⁻¹).

CONCLUSIONES

El níquel (Ni²⁺) en la solución nutritiva redujo las concentraciones de cobre y zinc en las hojas de las plantas de pimiento morrón en casa sombra; pero aumentó las concentraciones de hierro en las hojas y de nitrógeno en los frutos.

La aplicación de 1 mg de níquel por litro de solución incrementó el rendimiento de frutos respecto al tratamiento sin níquel. El níquel no se acumuló en los frutos; por lo tanto, el pimiento morrón así fertilizado resultó un alimento seguro para los seres humanos.

LITERATURA CITADA

Ahmad, M.S.A., M. Ashraf, and M. Hussain. 2011. Phytotoxic effects of nickel on yield and concentration of macro and micronutrients in sunflower (*Helianthus annuum* L.) achenes. J. Hazard Mat. 185: 1295-1303.

Asher, C. J. 1991. Beneficial elements, functional nutrients, and possible new essential elements. In: Mortvedt J. J., F. R. Coz,

CONCLUSIONS

Nickel (Ni²⁺) in the nutrient solution reduced the concentrations of copper and zinc in the leaves of the bell pepper plants in a shade house; but increased the concentrations of iron in the leaves and of nitrogen in the fruits.

The application of 1 mg of nickel per liter of solution increased fruit yield in comparison to the treatment without nickel. The nickel did not accumulate in the fruits; therefore, this dose of Ni fertilization in bell pepper resulted safe for human consumption.

—End of the English version—



L. M. Shuman and R. M. Welch (eds.). Micronutrients in agriculture. Soil Science Society of America, Madison, WI. pp: 703-723.

Ayers, R.S., and D.W. Westcot. 1985. Water quality for agriculture. FAO Irrigation and Drainage. Paper 29 Rev.1, Roma. 174 p.

Bai, C., C. C. Reilly, and B. W. Wood. 2006. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. Plant Physiol. 140: 433-443.

Brown, P. H. 2006. Ni. In: Borker, A. V. and D. J. Pilbeam (eds.). Handbook of plant nutrition. CRC. Press, Boca Raton, FL. pp: 329-350.

Brown, P. H., R. M. Welch, and E. E. Cary. 1987. Nickel a micronutrient essential for all higher plants. Plant Physiol. 85: 801-803.

Cuadro 3. Suministro de Ni²⁺ en la solución nutritiva en el peso del fruto (PF), diámetro de fruto (DF), longitud del fruto (LF), número de frutos (NF) y rendimiento de fruto (RF) de pimiento morrón.

Table 3. Supply of Ni²⁺ in the nutritive solution in fruit weight (PF), fruit diameter (DF), fruit length (LF), number of fruits (NF) and yield of fruits (RF) of bell pepper.

Ni ²⁺ (mg L ⁻¹)	PF (g)	DF (cm)	LF (cm)	NF (Mg ha ⁻¹)	RF (Mg ha ⁻¹)
0	177.5	7.9	9.0	11	60.69
0.5	173.5	8.1	8.8	10	58.61
1.0	155.0	8.1	8.6	13	71.32
1.5	189.0	8.2	8.7	12	67.30

No hubo diferencia significativa entre tratamientos (Tukey; p>0.05) ♦ There were no significant differences among treatments (Tukey; p>0.05).

- Brown, P. H., R. M. Welch, and J. T. Madison. 1990. Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. *Plant Soil* 125: 19-27.
- Cataldo, D. A., T. R. Garland, and R. E. Wilding. 1978. Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. *Plant Physiol.* 62: 563-565.
- Cempel, M., and G. Nikel. 2006. Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. *Pol. J. Environ. Stud.* 15: 375-382.
- Degryse, F., A. Shahbazi., L. Verheyen, and E. Smolders. 2012. Diffusion limitations in root uptake of cadmium and zinc, but not nickel, and resulting bias in the Michaelis constant. *Plant Physiol.* 160: 1097-1109.
- Dixon, N. E., C. Gazzola, R. L. Blakeley, and R. Zerner. 1975. Jack bean urease. (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *J. Am. Chem. Soc.* 97: 4131-4133.
- Eskew, D. L., R. M. Welch, and W. A. Cieslak. 1984. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. *Plant Physiol.* 76: 691-693.
- FAOSTAT. 2017. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Base de datos. Disponible en <http://faostat.fao.org> (Consultado: octubre 2017).
- Gad, N., M. H. El-Sherif, and N. H. M. El-Gereedy. 2007. Influence of nickel on some physiological aspects of tomato plants. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 1: 286-293.
- Izosimova, A. 2005. Modelling the interactions between calcium and nickel in the soil-plant system. *FAL Agricultural Research Special Issue.* pp: 288-299.
- Khoshgoftarmanesh, A. H., and H. Bahmanziari. 2012. Stimulating and toxicity effects of nickel on growth, yield and fruit quality of cucumber supplied with different nitrogen sources. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175: 474-481.
- Kutman, B. Y., U. B. Kutman, and I. Cakmak. 2013. Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean. *Plant Soil* 363: 61-75.
- Liu, G., E. H. Simonne, and Y. Li. 2011. Nickel nutrition in plants. HS1191. Serie Horticultural Science UF/IFAS Extension. University of Florida. Florida, USA. 6 p.
- Lock, K., H. van Eeckhout., K. A. de Schampelaere., P. Criel, and C. R. Janssen. 2007. Development of a biotic ligand model (BLM) predicting nickel toxicity to barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chemosphere* 66: 1346-1352.
- Malavolta, E., and M. F. Moraes. 2007. Ni-from toxic a nutrient essential. *Better Crops with Plant Food* 91: 26-27.
- Marschner, H. 2002. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press, London. 889 p.
- Matraszek, R., M. Szymanska, and M. Wroblewska. 2002. Effect of nickel on yielding and mineral composition of the selected vegetables. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 1: 13-22.
- Mohammadzadeh, A., M. Tavakoli, M. R. Chaichi, and B. Motesharezadeh. 2014. Effects of nickel and PGPB on growth indices and phytoremediation capability of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Arch. Agron. Soil Sci.* 60: 1765-1778.
- Motsara, M. R., and R. N. Roy. 2008. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* 19. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 219 p.
- Nishida, S., Ch. Tsuzuki, A. Kato, A. Aizu, J. Yoshida, and T. Mizuno. 2011. AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52: 1433-1442.
- Nishida, S., A. Kato, Ch. Tsuzuki, J. Yoshida, and T. Mizuno. 2015. Induction of nickel accumulation in response to zinc deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 9420-9430.
- Palacios, G., I. Gómez, A. Carbonell-Barrachina, J. Navarro P, and J. Mataix. 1998. Effect of nickel concentration on tomato plant nutrition and dry matter yield. *J. Plant Nutr.* 21: 2179-2191.
- Parra T. S. 2016. Relaciones cloruro/aniones y sodio/cationes en soluciones nutritivas y la composición mineral de dos cultivos de tomate. *Terra Latinoamericana* 34: 219-227.
- Pollard, A. J., K. D. Powell, H. A. Harper, and J. A. C. Smith. 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 539-566.
- Rahman, M. H., S. Sabreen, S. Alam, and S. Kawai. 2005. Effect of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 28: 393-404.
- Rathor, G., N. Chopra, and T. Adhikari. 2014. Effect of variation in nickel concentration on growth of maize plant: A comparative overview for Pot and Hoagland culture. *Res. J. Chem. Sci.* 4: 30-32.
- Ruiz-Argueso, T., J. Imperial, and J. M. Palacios. 2000. Uptake hydrogenases in root nodule bacteria. *In: Triplett, E. W. (ed.). Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process.* Horizon Scientific Press, Wymondham, U. K. pp: 489-507.
- SIAP 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en <http://www.siap.gob.mx> (Consultado: marzo 2018).
- SAS 2013. Statistical Analysis System Institute. SAS Proceeding Guide, Versión 9.4. SAS Institute. Cary, NC. USA
- Siqueira, F. D., B. Wurr R, A. Rodríguez dos Reis, F. de Barros Reis, T. Soares de Carvalho, J. Schulze, M. A. Carbone, and L. R. Guimaraes. 2018. Hidden nickel deficiency? Nickel fertilization via soil improves nitrogen metabolism and grain yield in soybean genotypes. *Front. Plant Sci.* 9: 1-16.
- Soil Survey Staff. 2015. Illustrated guide to soil taxonomy, version 2. U. S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, National Soil Survey Center, Lincoln, Nebraska. 681 p.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *In: Proceeding 6th. International Congress on Soilless Culture.* Wageningen, The Netherlands. pp: 633-650.
- Tang, T., and D. M. Miller. 1991. Growth and tissue composition of rice grown in soil treated with inorganic copper, nickel and arsenic. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22: 2037-2045.
- Torres, G. N., S. L. Camargos, O. L. D. S. Weber, K. D. B. Mass, and W. L. M. P. Scaramuzza. 2016. Growth and micronutrient concentration in maize plants under nickel and lime applications. *Rev. Caatinga* 29: 796-804.
- US-EPA (United States Environmental Protection Agency). 1991. Integrated Risk Information System. Nickel, soluble salts: CASRN Various. Washington. USA. Disponible en: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=271 (Consultado: enero 2018).

- Worms, I. A. M., N. Parthasarathy, and K. J. Wilkinson. 2007. Ni Uptake by a green alga. 1. Validation of equilibrium model for complexation effects. *Environ. Sci. Technol.* 41: 4258-4263.
- Yang, X., B. C. Valigar, D. C. Martens, and R. B. Clark. 1996. Plant tolerance to nickel toxicity. II. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. *J. Plant Nutr.* 19: 265-279.

ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS MINERALES ESENCIALES Y TÓXICOS EN TEJIDOS VEGETALES

ANALYSIS OF ESSENTIAL AND TOXIC MINERAL ELEMENTS IN PLANT TISSUE

Juliana **Padilla-Cuevas**^{1*}, Hernani T. **Yee-Madeira**², Agustín **Merino-García**³, Claudia **Hidalgo**¹, Jorge D. **Etchevers**¹

¹Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (jpadic@colpos.mx). ²ESFM. Instituto Politécnico Nacional. 07738, Ciudad México, México.

³Universidad Santiago de Compostela, Lugo, Galicia, España.

RESUMEN

Las técnicas para analizar los elementos esenciales o tóxicos para las plantas y los seres humanos, ha experimentado un acelerado desarrollo en los últimos tiempos, tanto en las convencionales o clásicas, que requieren la solubilización de la muestra, como en otras emergentes que no la requieren. Las técnicas convencionales avanzadas y las no destructivas se usan poco por los investigadores en genética, agronomía, nutrición, fisiología, biología, para evaluar la composición y calidad nutrimental de alimentos, cuantificar elementos metálicos esenciales y tóxicos, diagnosticar el estado nutrimental de los cultivos y estudiar alimentos funcionales. Estas técnicas analíticas se pueden aplicar, además, a suelos, abonos y fertilizantes. El objetivo de este ensayo es difundir las posibilidades de aplicación y los principios básicos de estas técnicas analíticas emergentes. La espectrometría de emisión por atomización con plasma inductivamente acoplado (ICP, Inductively coupled plasma) y la de ICP masas (ICP-MS, Mass spectrometry with inductive coupling plasma) tienen mayor interés que las técnicas clásicas usadas en los laboratorios de los países de escaso desarrollo, como las espectrometrías de emisión (AES, Atomic emission spectrometry) y absorción atómica (AAS, Atomic absorption spectrometry), que requieren solubilización de la matriz. La ICP-MS y la ICP tienen ventajas para el análisis simultáneo de contenidos totales de la mayoría de los elementos esenciales para el crecimiento de los vegetales. Entre las técnicas no destructivas de la matriz, la mayoría de las consideradas en este ensayo se basan en la interacción de los rayos X con la materia, como fotoemisión de rayos X (XPS, X-ray photoelectron spectrometry), emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE, Particle induced X-ray emission), fluorescencia de rayos X (XRF, X-ray fluorescence) y espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy),

ABSTRACT

Conventional and classic techniques to analyze the essential or toxic elements for plants and humans, either the ones requiring solubilization of the sample and others emerging ones that do not need it, have undergone an accelerated development in recent times. Researchers in genetics, agronomy, nutrition, physiology, and biology rarely used advanced conventional and non-destructive techniques to assess the nutrient composition and quality of food, quantify essential and toxic metallic elements, in order to diagnose the nutritional status of crops and to study functional foods. These analytical techniques are applied to soils, fertilizers and manures also. Atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP) and that of mass ICP (ICP-MS, Mass spectrometry with inductively coupled plasma) are of greater interest than the classical techniques used in laboratories in developing countries, such as emission spectrometry (AES, Atomic emission spectrometry) and atomic absorption spectrometry (AAS), which require matrix solubilization. The ICP-MS and the ICP allow the simultaneous analysis of the total contents of most of the essential elements for plant growth. Among the non-destructive techniques of the matrix, most of those considered in this essay are based on the interaction of X-rays with matter; such as X-ray photoemission (XPS, X-ray photoelectron spectrometry), particle-induced X-ray emission (PIXE), X-ray fluorescence (XRF) and dispersion spectrometry of X-ray energy (EDS, Energy-dispersive X-ray spectrometry), similar in their principles. These techniques, unlike the previous ones, do not require the solubilization of the sample or its preparation is minimal. Other advantages are their speed, the performance of simultaneous multi-element analysis, small sample size, acquisition of the distribution of chemical elements in the sample, and mapping in two dimensions. The four techniques described above analyze total contents. PIXE and XRF have higher sensitivity than the other two to quantify trace elements in concentrations of parts per million, and these two,

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: agosto, 2019. Aprobado: enero, 2020.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 54: 413-434. 2020.

similares en sus fundamentos. Estas técnicas, a diferencia de las anteriores, no requieren solubilizar la muestra o su preparación es mínima. Otras ventajas son su rapidez, la realización de análisis multielemental simultáneo, tamaño pequeño de muestra, adquisición de la distribución de elementos químicos en la muestra y generar mapas en dos dimensiones. Las cuatro técnicas descritas más arriba analizan contenidos totales. PIXE y XRF presentan mayor sensibilidad que las otras dos para cuantificar elementos traza en concentraciones de partes por millón, y estas dos más EDS se pueden acoplar a microscopios *ad hoc* para obtener la distribución de elementos químicos y hacer mapeos. La técnica XPS permite analizar fracciones iónicas en estudios de estados de oxidación de los elementos, pero las concentraciones en las muestras deben ser superiores a 0.1% en peso. Las aplicaciones de las técnicas no destructivas generan información complementaria a las clásicas y aportan conocimiento básico. Otras ventajas es que la preparación de las muestras requiere menos tiempo, excepto cuando se requieren mapeos. Su capacidad para ejecutar multianálisis permite reducir costos. En México y otros países hay grupos de investigación especializados en estas técnicas, pero es necesario desarrollar e implementar aplicaciones para realizar análisis de matrices biológicas como vegetales (semillas, hojas, etc.), alimentos, abonos y matriz orgánica de los suelos. Un conocimiento más profundo de estas técnicas permitirá la interacción de grupos de investigación y generar información para estudios de ciencia básica en agronomía y alimentos.

Palabras clave: técnicas analíticas no convencionales, XPS, PIXE, XRF, EDS, ICP-MS.

INTRODUCCIÓN

El análisis de la concentración total de los elementos esenciales y de algunos potencialmente tóxicos para las plantas, se realiza por lo general mediante métodos convencionales que requieren la destrucción física o solubilización de la matriz de la muestra. En décadas recientes el análisis de plantas ha dado un salto cualitativo y cuantitativo y hay metodologías analíticas con instrumentos que no lo requieren. Estas técnicas actuales se emplean para determinar elementos totales y algunas permiten analizar especies iónicas (Tezotto *et al.*, 2013).

Entre los análisis convencionales se encuentran las espectrometrías de emisión atómica (AES, atomic emission spectrometry), absorción (AAS, atomic absorption spectrometry), emisión por atomización con plasma inductivamente acoplado (ICP, inductively coupled plasma) y la de ICP masas (ICP-MS,

in addition to EDS, can be coupled to *ad hoc* microscopes to obtain the distribution of chemical elements and mapping. The XPS technique allows the analysis of ionic fractions in studies of oxidation states of the elements, but the concentrations in samples must be greater than 0.1% by weight. The applications of non-destructive techniques generate complementary information to classic ones and provide fundamental knowledge. Besides, sample preparation requires less time, except when mapping is required. Its ability to run multi-analysis allows for reducing costs. In Mexico and other countries, there are research groups specialized in these techniques. Still, it is necessary to develop and implement applications to perform analyzes of biological matrices such as vegetables (seeds, leaves, and others), food, fertilizers, and soil organic matrix. More in-depth knowledge of these techniques allows the interaction of research groups and generate information for basic science studies in agronomy and food.

Key words: unconventional analytical techniques, XPS, PIXE, XRF, EDS, ICP-MS.

INTRODUCTION

The analysis of the total concentration of the essential elements and potentially toxic to the plants is generally performed through conventional methods that require the physical destruction or solubilization of the sample matrix. In recent decades the analysis of plants has taken a qualitative and quantitative leap, and there are analytical methodologies with instruments that do not require such solubilization. These latter techniques are used to determine total elements content, and some allow the analysis of ionic species (Tezotto *et al.*, 2013).

Conventional analyzes include atomic emission spectrometry (AES), absorption (AAS, atomic absorption spectrometry), inductively coupled plasma atomization (ICP), and mass ICP (ICP-MS). The AES and AAS techniques are the most used in laboratories in less developed countries. However, ICP and ICP-MS have advantages, such as the simultaneous analysis of the total contents of most of the essential elements for plant growth, in particular, those for human consumption and determine the presence of contaminating or toxic metallic elements.

The interaction of matter with various particles of the electromagnetic spectrum offers a range of possibilities for measurements (Grieken, 2004). Thus, X-ray radiation is used in genetic, agronomic, plant

mass spectrometry with inductive coupling plasma). Las técnicas AES y AAS son las más usadas en los laboratorios de los países menos desarrollados. Sin embargo, ICP e ICP-MS presentan ventajas, como análisis simultáneo de los contenidos totales de la mayoría de los elementos esenciales para el crecimiento de los vegetales, en particular, de aquellos para consumo humano y determinar la presencia de elementos metálicos contaminantes o tóxicos.

La interacción de la materia con diversas partículas del espectro electromagnético ofrece un abanico de posibilidades para mediciones (Grieken 2004). Así, las radiaciones con rayos X se usan en investigaciones genéticas, agronómicas, de nutrición vegetal y fisiología, para mejorar variedades de granos, frutales y otros cultivos; para evaluar la composición y calidad nutricional de alimentos; cuantificar elementos metálicos esenciales potencialmente contaminantes y tóxicos; diagnosticar el estado nutricional de los cultivos; y generar alimentos funcionales. Estas técnicas son aplicables a otros materiales orgánicos e inorgánicos, como los componentes presentes en los suelos que soportan las plantas y los fertilizantes para su nutrición. Su base es la interacción de los rayos X con la materia vegetal o los suelos, son técnicas rápidas, admiten muestras de tamaño pequeño y se puede adquirir mapas en dos dimensiones de la distribución de elementos químicos sin destruir la muestra (van der Ent *et al.* 2018; de Carvalho *et al.*, 2018). Las técnicas basadas en la interacción con los rayos X con la materia se pueden usar en combinación con ICP e ICP-MS (de Carvalho *et al.*, 2018; Romero-Dávila *et al.*, 2018), y aquellas con base en la interacción de las radiaciones electromagnéticas del rango infrarrojo (NIR, MIR) tienen otras cualidades que no se presentan en este ensayo por razones de espacio.

El objetivo de este ensayo es presentar los principios básicos de ICP-MS, una técnica destructiva convencional y de técnicas no destructivas, como la fotoemisión de rayos X (XPS, X-ray photoelectron spectrometry), la emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE, particle induced X-ray emission), la fluorescencia de rayos X (XRF, X-ray fluorescence), y la espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy), para facilitar el

nutrition, physiology research to improve varieties of grains, fruit, and other crops; as well as, to evaluate the composition and nutritional quality of food; quantify essential, potentially polluting and toxic metallic elements; diagnose the nutritional status of crops, and generate functional food. These techniques are applied to other organic and inorganic materials, like the components present in the soil that support the plants and fertilizers for their nutrition. They are based on the interaction of X-rays with plant matter or soils, are fast, admit small-sized samples, and two-dimensional maps of the distribution of chemical elements can be obtained without destroying the sample (van der Ent *et al.*, 2018; de Carvalho *et al.*, 2018). Techniques based on the interaction of X-rays with matter can be used in combination with ICP and ICP-MS (de Carvalho *et al.*, 2018; Romero-Dávila *et al.*, 2018) and those based on the interaction of electromagnetic radiation of the infrared range (NIR, MIR) have other qualities that are not addressed in this essay for reasons of space.

The objective of this essay is to present the basic principles of ICP-MS, a conventional destructive technique, as well as, non-destructive techniques, such as X-ray photoemission (XPS, X-ray photoelectron spectrometry), particle-induced X-ray emission (PIXE), X-ray fluorescence (XRF), X-ray energy dispersion spectrometry (EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy) to facilitate the access of researchers in an area of knowledge generally unrelated to their training, and examples of their applications are given.

Techniques that require the destruction of the sample

Mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS)

The ICP-MS is a spectrometry of increasing interest for the simultaneous analysis of total contents of macro and trace elements in plant material and others. The advantage of this technique is to be highly sensitive. It can quantitatively determine nearly all the elements present in the periodic table with ionization potential less than Argon (Ar), to measure nanogram concentrations per kilogram or parts per trillion (ppt). Its basis is the generation of ions by using a plasma; a mass spectrometer separates and detects ions. The Ar gas transports the solubilized sample

acceso de los investigadores a un área del conocimiento por lo general ajena a su formación y se dan ejemplos de sus aplicaciones.

Técnicas que requieren destrucción de la muestra

Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La ICP-MS es una espectrometría de interés creciente para el análisis de contenidos totales simultáneos de elementos macro y traza, en material vegetal y otros. La ventaja de esta técnica es ser altamente sensible y puede determinar cuantitativamente casi todos los elementos presentes en la tabla periódica con potencial de ionización menor al del Argón (Ar), para medir concentraciones de nanogramo por kilo o partes por trillón (ppt). Su fundamento es la generación de iones con un plasma y un espectrómetro de masas separa y detecta los iones. La muestra solubilizada es transportada por el gas Ar con una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador, donde es transformada en aerosol. Este último es conducido a la zona de ionización generada al someter el flujo de Ar, a la acción de un campo magnético oscilante (inducido por una corriente de alta frecuencia) para formar un plasma. En el interior del plasma se puede alcanzar temperaturas de hasta 8000 K. Los iones pasan al interior del filtro cuadrupolo a través de una interfase de vacío creciente y son separados según su relación masa/carga (m/z). Cada una de las masas sintonizadas llegan al detector donde se evalúa su abundancia en la muestra (Sedgwick and Hindenlang, 1996).

Los principios del ICP sin acoplamiento de masas, una técnica de uso frecuente en laboratorios de rutina e investigación, y los de espectrometría ICP-MS son similares; ambos se basan en la producción y detección de líneas espectrales procedentes de elementos excitados al alcanzar el estado de vapor atómico o plasma. Este vapor atómico tiene propiedades físicas únicas que lo hacen un agente óptimo para vaporizar, atomizar, ionizar y excitar a los componentes de la muestra (Soltanpour *et al.*, 1996). La diferencia

with a peristaltic pump to the nebulizer system, to form an aerosol. The latter is led to the ionization zone generated by subjecting the flow of Ar to the action of an oscillating magnetic field (induced by a high frequency current) to generate a plasma. Inside the plasma temperatures can reach up to 8000 K. The ions pass into the quadrupole filter through an increasing vacuum interface and are separated according to their mass/charge ratio (m/z). Each of the tuned masses arrive to a detector to evaluate its abundance (Sedgwick and Hindenlang, 1996).

The principles of ICP, a technique often used in routine laboratories and research, and those of ICP-MS spectrometry are similar. Both are based on the production and detection of spectral lines that come from excited elements upon reaching the state of atomic vapor or plasma. This atomic vapor has unique physical properties that make it an optimal agent to vaporize, atomize, ionize and excite the sample components (Soltanpour *et al.*, 1996). The difference between an ICP device and an ICP-MS is that the latter has an attachment that allows to identify the mass of the measured elements. The ICP-MS apparatus mainly analyzes atomic species, and in more advanced versions its isotopes. The ICP-MS analysis, like other types of atomic spectrometry (ICP, EAS and AAS) and conventional techniques for chemical analysis of agricultural materials (plants, soils and others), requires solubilization of the chemical elements present in solid samples with chemical oxidizing agents (HClO_4 , H_2O_2 or others) (Tezotto *et al.*, 2013). Those chemical species solubilized by oxidation of the solid sample generate molecules and ions in a gaseous fluid. Ions are separated based on their m/z ratio in a quadrupole or mass filter and are detected and quantified. The ICP-MS equipment have four main components: a sample introduction system that can be direct, indirect or from a gas chromatograph; a source of ions that can be of electronic or chemical impact; an electrostatic acceleration-analyzer system to separate the ions, which can be of magnetic sector, quadrupole or flight time; a detector system; and the reading device (Rubinson and Rubinson, 2001). The complete system requires a high vacuum throughout the spectrometer, from the introduction of samples to ionic detection. Mass spectrometers are of two types: atomic mass and molecular mass.

entre un equipo ICP y un ICP-MS es que este último posee un aditamento que permite identificar la masa de los elementos medidos. Con ICP-MS se analizan principalmente especies atómicas y en sus versiones más avanzadas, sus isótopos; este análisis ICP-MS, como otros tipos de espectrometría atómica (ICP, EAS y AAS) y técnicas convencionales de análisis químico de materiales agrícolas (vegetales, suelos y otros), requiere que los elementos químicos en las muestras sólidas se solubilizan con agentes químicos oxidantes (HClO_4 , H_2O_2 u otros) (Tezotto *et al.*, 2013). Aquellas especies químicas solubilizadas por oxidación de la muestra sólida generan moléculas y iones en un fluido gaseoso. Los iones se separan en función de su relación m/z en un cuadrupolo o filtro de masas, y son detectados y cuantificados. Los equipos ICP-MS tienen cuatro componentes principales: un sistema de introducción de la muestra que puede ser directa, indirecta o desde un cromatógrafo de gases; una fuente de iones que puede ser de impacto electrónico o químico; un sistema electrostático de aceleración-analizador para separar los iones que puede ser de sector magnético, cuadrupolo o tiempo de vuelo; un sistema detector; y el dispositivo de lecturas (Rubinson y Rubinson, 2001). El sistema completo requiere tener un alto vacío en todo el espectrómetro, desde la introducción de muestras hasta la detección iónica. Los espectrómetros de masas son de dos tipos: de masa atómica y de masa molecular.

La atomización de las muestras se realiza con ablación láser (una aplicación útil cuando se manejan muestras sólidas, lo cual evita el uso de digestión o solubilización con ácidos y bases fuerte según Chirinos *et al.*, 2017); por chispa; o por descarga luminiscente. Para ionizar los elementos en solución, según el tipo de equipo y edad, se utiliza irradiación con electrones, fotones, iones o moléculas, o con procesos térmicos o eléctricos (Fernández-Ruiz, 2008).

El filtro de masas o cuadrupolo que separa los iones por su relación m/z es el sistema más usado en los espectrómetros de masas atómicas. Está formado por un conjunto de barras cilíndricas paralelas que funcionan como electrodos, con cargas contrarias; a cada par de barras se aplican potenciales variables de corriente alterna y de

The atomization of the samples is carried out by laser ablation (useful application when handling solid samples, which avoids the use of digestion or solubilization with strong acids and bases, according to Chirinos *et al.*, 2017); spark; or by luminescent discharge. The ionization of the elements in solution is done by irradiation with electrons, photons, ions or molecules, or with thermal or electrical processes, depending on the type of equipment and age (Fernández-Ruiz, 2008).

The mass filter or quadrupole that separates the ions by their ratio m/z is the most used system in atomic mass spectrometers and consist of a set of parallel cylindrical bars that function as electrodes, with opposite charges, potential alternating current and radiofrequency variables applied to each pair of bars. The ions inside this device are accelerated by a potential of 5 to 10 V. By varying the radiofrequency parameters of the quadrupole, the ions affect the detector in suitable ranges of m/z values, to separate its isotopes. The mass spectra in this system obtained by scanning the potential applied to the bars or electrodes are related to the m/z of the isotopes and elements (Abián *et al.*, 2008).

To calibrate the ICP-MS to study various materials, including plant analyses and soil solutions, AAS, AES, and ICP techniques are used (Masson *et al.*, 2010). The ICP-MS is less accurate and precise than conventional atomic spectrometric techniques for analyzing essential elements (macro and micro) in the plant, soil, and other samples. But this last technique shows greater precision and sensitivity for the analysis of trace elements (Chirinos *et al.*, 2017; Masson *et al.*, 2010; Soltanpour *et al.*, 1996). The ICP-MS can detect metals and non-metals elements in concentrations as low as parts per trillion (Caughlin, 2010; Chirinos *et al.*, 2017; Ruvalcaba, 2013); these concentrations are characteristic of rare earth (Caughlin, 2010), so their use is frequent in environmental studies (Caughlin, 2010; Masson *et al.*, 2010; Ruvalcaba, 2013). The ICP-MS analysis cost is usually higher than the AAS, AES and ICP techniques, but it is compensated by the ability to simultaneously analyze macro, micro and trace elements (Chirinos *et al.*, 2017; Soltanpour *et al.*, 1996), and some instruments can analyze isotopes. With ICP and ICP-MS it is possible to measure elements such as P, S, which cannot be evaluated in AAS and AES devices (Soltanpour *et al.*, 1996).

radiofrecuencia. Los iones al interior de este dispositivo son acelerados por un potencial de 5 a 10 V. Al variar los parámetros de radiofrecuencia del cuadrupolo, los iones inciden en el detector en rangos adecuados de valores m/z , para separarlos en isótopos. Los espectros de masas en este sistema se obtienen mediante un barrido del potencial aplicado a las barras o electrodos relacionado a la m/z de los isótopos y elementos (Abián *et al.*, 2008).

Para calibrar el ICP-MS en el estudio de materiales diversos, incluidos los análisis vegetales y disoluciones de suelos, se usan las técnicas AAS, AES e ICP (Masson *et al.*, 2010). La ICP-MS es menos exacta y precisa que las técnicas atómicas convencionales para analizar elementos esenciales (macro y micro) en muestras vegetales, suelos y otros. Pero esta última técnica ha mostrado mayor precisión y sensibilidad para el análisis de elementos traza (Chirinos *et al.*, 2017; Masson *et al.*, 2010; Soltanpour *et al.*, 1996). La ICP-MS puede detectar metales y elementos no metálicos en concentraciones tan bajas como partes por trillón (Caughlin, 2010; Chirinos *et al.*, 2017; Ruvalcaba, 2013); estas concentraciones son características de las tierras raras (Caughlin, 2010), por lo que su uso es frecuente en estudios ambientales (Caughlin, 2010; Masson *et al.*, 2010; Ruvalcaba, 2013). El costo de análisis de ICP-MS suele ser elevado en comparación con las técnicas AAS, AES e ICP, pero se compensa por la capacidad de analizar simultáneamente elementos macro, micro y traza (Chirinos *et al.*, 2017; Soltanpour *et al.*, 1996), y algunos equipos pueden analizar isótopos. Con ICP e ICP-MS es posible medir elementos como P y S, que no se pueden evaluar en aparatos de AAS y AES (Soltanpour *et al.*, 1996).

El detector de los iones produce la multiplicación y amplificación en cascada de las señales en nanosegundos. La espectrometría ICP-MS es sensible y rápida, pero presenta interferencias espectrales y no espectrales (Fernández-Ruiz, 2004). Las interferencias espectrales pueden ser: isobáricas, es decir, de elementos que presentan masas nominales semejantes (*v.g.* $^{58}\text{Ni}^+$, $^{58}\text{Fe}^+$); por presencia de iones poliatómicos (*v.g.* ^{48}Ti , ^{31}P , ^{16}O), que incluye elementos presentes en el sistema (*v.g.* $^{40}\text{Ar}^{2+}$, $^{16}\text{O}_2^{+2}$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{OH}^+$); por

The ion detector produces the multiplication and amplification in a cascade of the signals in nanoseconds. The ICP-MS spectrometry is sensitive and fast but has spectral and non-spectral interference (Fernández-Ruiz, 2004). The spectral interferences can be: isobaric, that is, of elements that have similar nominal masses (*e.g.* $^{58}\text{Ni}^+$, $^{58}\text{Fe}^+$) due to the presence of polyatomic ions (*e.g.* ^{48}Ti , ^{31}P , ^{16}O), which includes elements present in the system (*e.g.* $^{40}\text{Ar}^{2+}$, $^{16}\text{O}_2^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{OH}^+$); by the formation of doubly charged molecules (M^{2+} , *e.g.* ArO^+ , ArH^+) or because they come from the sample matrix. Nonspectral interferences are attributed to the sample matrix. They can be total dissolved solids; elements of high masses that affect their balance with low masses; easily ionizable elements such as Na and K, or by the formation of oxides. Spectral interferences are minimized: when those interference-free isotopes are measured (*e.g.* ^{105}Ba instead of ^{106}Ba); by the use of a cold plasma (with reactive gases - H_2 , O_2 , NO , NO_2 , CH_4 , NH_3 , or with inert gases - He, Kr, Xe) that prevents the formation of oxides and M^{2+} (Fernández-Ruiz, 2004). Nonspectral interferences are minimized: diluting the sample, by the elimination of the matrix and by the use of internal standards (of concentration and ionizing potential analogous to that of the analyte and not present in the sample). Procedures such as chelation, chromatography or desolvation, mathematical corrections, use of collision/reaction cells within the quadrupole (octopoles) allow eliminating matrix effects, such as the presence of solids (Chirinos *et al.*, 2017).

Mass spectrometry is a technique with various applications in the chemical analysis of plant material, for example, to detect atomic and molecular species in various organic materials and quantify them. For this, the spectrometers must be coupled with gas and liquid chromatographic devices. The ICP-MS spectrometry is also used to study isotopic speciation, especially in environmental studies, and in the research of reaction mechanisms and tracers. Queralt *et al.* (2005) analyzed with ICP, ICP-MS and XRF essential microelements for plants and some potentially toxic elements (Cu, Mn, Zn and As, Rb, Sr, Pb, Ti) in concentrations of micrograms per liter to characterize and control the quality of infusions of medicinal plants. The comparison between the measurement of ICP-MS and ICP produced similar results. Guelke-Stelling and von Blanckenburg

formación de moléculas doblemente cargadas (M^{2+} , *v.g.* ArO^+ , ArH^+) o porque son aportadas por la matriz de la muestra. Las interferencias no espectrales se atribuyen a la matriz de la muestra. Pueden ser: sólidos disueltos totales; elementos de masas altas que afectan el balance de éstas con las masas bajas; elementos fácilmente ionizables como Na y K o por formación de óxidos. Las interferencias espectrales se minimizan: cuando se miden aquellos isótopos libres de interferencias (*v.g.* ^{105}Ba en lugar de ^{106}Ba); por el uso de un plasma frío (con gases reactivos - H_2 , O_2 , NO , NO_2 , CH_4 , NH_3 , o con gases inertes - He, Kr, Xe) que evita la formación de óxidos y M^{2+} (Fernández-Ruíz, 2004). Las interferencias no espectrales se minimizan: al diluir la muestra, por eliminación de la matriz y por uso de patrones internos (de concentración y potencial ionizador, análogos al del analito y que no estén presentes en la muestra). Los procedimientos como la quelación, cromatografía o desolvatación, correcciones matemáticas, uso de celdas colisión/reacción dentro del cuadrupolo (octapolos) permiten eliminar los efectos matriciales, como por ejemplo la presencia de sólidos (Chirinos *et al.*, 2017).

La espectrometría de masas es una técnica con diversas aplicaciones en el análisis químico de material vegetal; por ejemplo, para detectar especies atómicas y moleculares en diversos materiales orgánicos y cuantificarlas. Para ello, los espectrómetros se tienen que acoplar con cromatógrafos de gases y líquidos. La espectrometría ICP-MS también se emplea para estudiar la especiación isotópica, en especial en estudios ambientales, así como en la investigación de mecanismos de reacción y en el estudio de trazadores. Queralt *et al.* (2005) analizaron con ICP, ICP-MS, y XRF, microelementos esenciales para las plantas y algunos potencialmente tóxicos (Cu, Mn, Zn y As, Rb, Sr, Pb, Ti) en concentraciones de microgramos por litro para caracterizar y controlar la calidad de infusiones de plantas medicinales. La comparación entre la medición de ICP-MS e ICP produjo resultados similares. Guelke-Stelling and von Blanckenburg (2012) estudiaron el fraccionamiento del Fe-isotópico con ICP-MS en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. y *Avena sativa* L., en tres etapas del desarrollo, que difícilmente se pudiera hacer con otra técnica.

(2012) studied the fractionation of Fe-isotopic with ICP-MS in *Phaseolus vulgaris* L. and *Avena sativa* L. plants, in three stages of development, which could hardly be done with another technique.

Other techniques that employ mass spectrometry

ICP-MS coupled to a high-performance liquid chromatograph

Zheng *et al.* (2013) quantified and studied the distribution of arsenic (As) and dimethyl arsenic acid (DMA) in different rice plants with an ICP-MS coupled to a liquid chromatograph (HPLC-ICP, High-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry) and supplemented with X-ray fluorescence (XRF). The DMA induces toxicity in rice reproductive tissues and reduces grain yield, while As only accumulated in vegetative tissues and did not affect its yield.

ICP with laser ablation coupled to triple quadrupole mass spectrometer

Thyssen *et al.* (2018) obtained bio-images of the distribution of Cd and Pb contaminants and essential elements P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, and Zn, in cocoa beans using triple quadrupole mass spectrometry coupled with ICP with laser ablation (LA-ICP-TQMS, Laser ablation-inductively coupled plasma-triple quadrupole mass spectrometry). The analysis of solid samples with laser ablation avoided common isobaric or polyatomic interference in the ICP-MS analysis for elements such as Ca or Fe and the exact and precise determination of low concentrations of Cd and Pb.

Secondary ion mass spectrometry (SIMS)

Secondary ion mass spectrometry (SIMS) is an analytical technique for the study of the distribution of liquid or solid sample analytes, which are converted to the gaseous state. SIMS is used for plant samples analysis. Small concrete points on the surface of the sample are bombarded with a beam of primary ions (atoms or fragmented molecules, for example, Cs^+ or O^{2+}) in an energy range between 0.5-100 KeV. These energetic ions expel ions from the surface of the material, called secondary ions; the ejected material is in a gaseous state and can be analyzed using a mass

Otras técnicas que emplean espectrometría de masas

ICP- MS acoplado a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Zheng *et al.* (2013) cuantificaron y estudiaron la distribución de arsénico (As) y ácido dimetilarsénico (ADMA) en diferentes plantas de arroz con un ICP-MS acoplado a un cromatógrafo de líquidos (HPLC-ICP, High-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry) y complementado con fluorescencia de rayos X (XRF). El ADMA induce toxicidad en los tejidos reproductivos del arroz y reduce el rendimiento del grano, mientras que el As sólo se acumuló en los tejidos vegetativos y no afectó su rendimiento.

ICP con ablación por láser acoplado a espectrómetro de masas con triple cuadrupolo

Thyssen *et al.* (2018) obtuvieron bioimágenes de la distribución de contaminantes de Cd y Pb y de elementos esenciales P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu y Zn, en granos de cacao mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo acoplado con ICP con ablación láser (LA-ICP-TQMS, Laser ablation-inductively coupled plasma-triple quadrupole mass spectrometry). El análisis de las muestras sólidas con ablación láser evitó interferencias isobáricas o poliatómicas comunes en el análisis ICP-MS para elementos como Ca o Fe y la determinación exacta y precisa de concentraciones bajas de Cd y Pb.

Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)

La SIMS (Secondary ion mass spectrometry) es una técnica analítica para el estudio de la distribución de los analitos de muestras líquidas o sólidas que son convertidas al estado gaseoso y se ha usado para muestras vegetales. Pequeños puntos concretos de la superficie de la muestra se bombardean con un haz de iones primarios (átomos o moléculas fragmentadas, por ejemplo, Cs^+ u O_2^+) en un intervalo de energía de 0.5 a 100 KeV. Estos iones energéticos expulsan iones de la

spectrometer. The mass and abundance of ions in the gaseous state are measured by SIMS in the following sequence: generation of molecules in the gas phase (and fragments of molecules and atoms), ionization, separation according to their mass and detection of ion peaks (Rubinson and Rubinson, 2001). The SIMS technique allows measuring m/z ratios of these secondary ions to determine their elemental, isotopic or molecular composition. Metzner *et al.* (2008) used flight time SIMS coupled with scanning electron microscopy and a cryogenic procedure (TOF-SIMS and SEM, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cryo-scanning electron microscope) to study macronutrient transport routes, as well as their distribution at the cell level *in situ* in fresh bean tissue. Ionization with this flight time spectrometer (TOF) is done by a pulse of energy on the sample; with the thermal shock, molecules are positively or negatively charged and go into the gas phase. Although this technique has a moderate resolution, it allows detecting all the ions projected by the ionization source (Sedgwick and Hindenlang, 1996).

Techniques that do not require destruction of the sample

In this essay the techniques that use X-rays (wavelength between 10 and 0.01 nm) were considered to perform elementary analysis, based on the interaction of electromagnetic radiation (REM) with the material to be analyzed. The REM is generated by the deceleration of high-energy charged particles (photons, electrons, or protons) when they hit a metallic target (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). These particles interact with the electrons of internal energy levels of the atoms in the sample, excites, and expels them, which generates gaps in the corresponding orbital. Other electrons with more external and higher energy levels fill these empty spaces, generating X-rays.

The use of XPS, PIXE, XRF, EDS techniques applies to the identification of total essential elements and trace in plants; some of the latter may be potentially contaminating in soils. The name of microanalysis techniques is because they handle small sample sizes. The PIXE, XRF, EDS and WDS techniques can work in combination with microscopes to generate distribution maps of

superficie del material, llamados iones secundarios; el material eyectado queda en estado gaseoso y puede analizarse mediante un espectrómetro de masas. La masa y la abundancia de iones en estado gaseoso por SIMS se mide en la siguiente secuencia: generación de moléculas en fase gaseosa (y fragmentos de moléculas y átomos), ionización, separación según su masa y detección de los picos de los iones (Rubinson and Rubinson, 2001). La técnica SIMS permite medir relaciones m/z de estos iones secundarios para determinar su composición elemental, isotópica o molecular. Metzner *et al.* (2008) usaron SIMS de tiempo de vuelo acoplado con microscopía electrónica de barrido y un procedimiento criogénico (TOF-SIMS and SEM, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cryo-scanning electron microscope) para estudiar las rutas de transporte de macronutrientes y su distribución a nivel de célula *in situ*, en tejido fresco de frijol. La ionización con este espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) se hace mediante un pulso de energía sobre la muestra; con el golpe térmico las moléculas se cargan positiva o negativamente y se proyectan a la fase gaseosa. Aunque esta técnica tiene una resolución moderada permite detectar todos los iones proyectados por la fuente de ionización (Sedgwick and Hindenlang, 1996).

Técnicas que no requieren destrucción de la muestra

En este ensayo se consideraron técnicas que emplean rayos X (longitud de onda entre 10 y 0.01 nm) para realizar análisis elemental y su base es la interacción de la radiación electromagnética (REM) con el material que se analiza. Las REM se generan por la desaceleración de partículas cargadas de alta energía (fotones, electrones o protones) al chocar con un blanco metálico (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). Estas partículas interactúan con los electrones de niveles energéticos internos de los átomos de la muestra, los excita y expulsa, lo cual genera vacíos en el orbital correspondiente. Otros electrones de niveles energéticos más externos y de mayor energía llenan estos espacios vacíos y se generan los rayos X.

the concentration of chemical elements (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). These techniques are complementary to the conventional ones used to determine chemical elements in materials of different nature. The basic of these techniques are presented below.

X-ray photoemission spectrometry (XPS)

X-ray photoemission spectrometry is based on bombarding an atom of solid material with a photon (generated by X-rays), with enough energy to eject an electron from the atom (Figure 1) (Vempati *et al.* 1996). Energy greater than 1000 eV is required to separate the electron from the atom corresponding to the binding energy (Rubinson and Rubinson, 2001). The energy of electrons can only come from the first layers of the atom. The most used lines are AlK (1486.6 eV) and MgK (1253.6 eV) (Vempati *et al.*, 1996).

An electron of a higher energy level occupies the gap left by the ejected electron. As a result of photoemission, the internal recombination of energy occurs in the excited atom, including the expulsion of a second electron from external levels called Auger electrons. The emission of electrons of this type is the basis of the Auger surface spectrometry, but it is not addressed in this essay.

The speed and bond energy (EL) of the expelled electrons are characteristic of each element. According to Vempati *et al.* (1996), small changes in the binding energy (50 eV) may reflect differences in the chemical state of the atom, which allows obtaining stoichiometric information on quantification of ionic species, the oxidation state, and the electronic structure.

The XPS spectrometry is a surface analysis technique; the penetration depth of the photon beam does not exceed 1 to 2 nm. It is non-destructive and a total analysis technique; it is multi-elemental, but does not include hydrogen; it is semi-quantitative (error ± 10 and 20%), and quantitative; and is used to analyze the qualitative, quantitative composition, and the chemical state of the elements on the surface of a material. The sensitivity of XPS depends on the concentration of the element in the matrix, as well as its purity. The analysis of a heterogeneous matrix with of low concentration of the analyte is less sensitive than a homogeneous matrix. The essential

Las técnicas XPS, PIXE, XRF, EDS se usan para identificar elementos esenciales y traza totales; algunos de los últimos pueden tener potencial contaminante en los suelos. El nombre técnicas de microanálisis se debe a que manejan tamaños de muestra muy pequeños. PIXE, XRF, EDS y WDS pueden funcionar combinadas con microscopios para generar mapas de distribución de la concentración de elementos químicos (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). Estas técnicas son complementarias a las clásicas usadas para determinar elementos químicos en materiales de distinta naturaleza. A continuación, se presentan fundamentos de estas técnicas y ejemplos de su aplicación en el estudio de material vegetal y de suelos.

Espectrometría de fotoemisión de rayos X (XPS)

La XPS se basa en bombardear un átomo de un material sólido con un fotón (generado por rayos X), con suficiente energía para expulsar un electrón del átomo (Figura 1) (Vempati *et al.*, 1996). Se requiere una energía mayor a 1000 eV para separar al electrón del átomo correspondiente a la energía de enlace (Rubinson y Rubinson,

components of an XPS spectrometer are an ultra-high vacuum chamber, an X-ray source (electron beam), an electron counter, a detector, and a data acquisition and processing system (Figure 2).

Measurement with XPS requires ultra-high vacuum conditions, less than 10^{-7} pascals, or 100 nanopascals. Turbo-molecular and rotary oil vacuum pumps generate the vacuum (Barr *et al.*, 1999; Vempati *et al.*, 1996). The development of new materials such as polymers and adhesives, metallurgy, heterogeneous catalysis, corrosion studies, and in the characterization of solid surfaces use this technique (Fadley, 2010). Still, there is little information on its use to study mineral elements in plant material, because XPS detection limits (more than 0.1%) (Hofmann, 2012) are above the average concentrations of elements in these materials. However, XPS can be useful in studies of physiological processes, and to study the contamination of plant material. For example, Reyes-Moreno *et al.* (1993) reported that the oxidation of lipids from bean seeds intervened in the hardening of the seed coat. This phenomenon can be studied with XPS as a complement to other analytical methodologies, as suggested by Hoffman (2012).

In soils, XPS allows the study of adsorption, dissolution, and precipitation processes of ions in

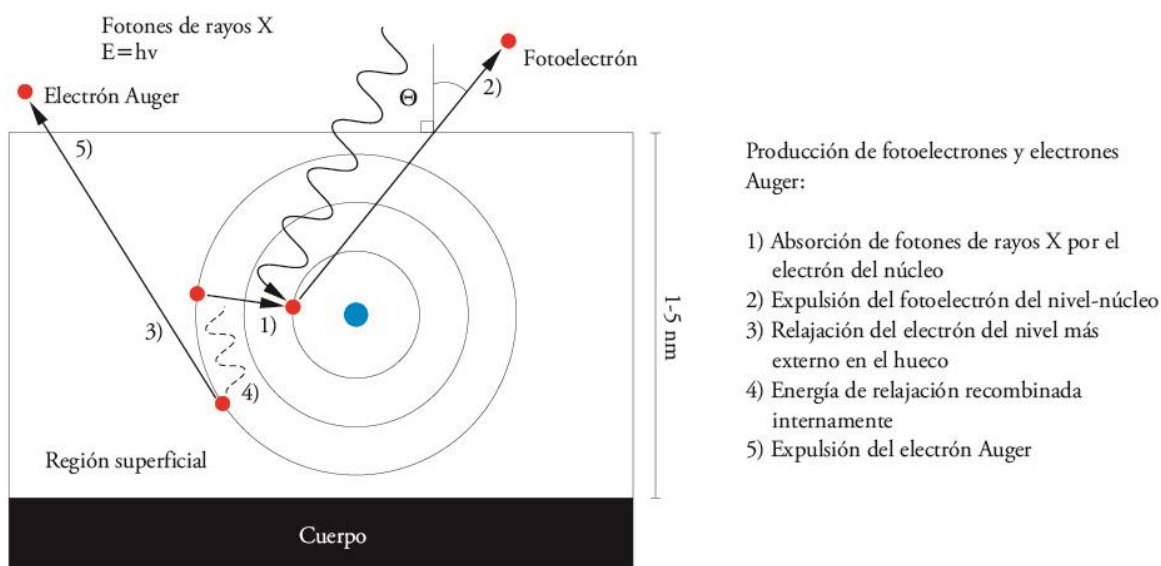


Figura 1. Esquema del proceso de fotoemisión y del electrón Auger inducido por el bombardeo de rayos X (Vempati *et al.*, 1996).
Figure 1. Scheme of the photoemission process and the Auger electron induced by X-ray bombardment (Vempati *et al.*, 1996).

2001). La energía de los electrones sólo puede provenir de las primeras capas del átomo. Las líneas más usadas son AlK (1486.6 eV) y MgK (1253.6 eV) (Vempati *et al.*, 1996).

Un electrón de un nivel energético mayor ocupa el hueco dejado por el electrón expulsado. Como resultado de la fotoemisión se produce una recombinación interna de energía en el átomo excitado, incluyendo la expulsión de un segundo electrón de los niveles externos llamados electrones Auger. La emisión de electrones de este tipo es la base de la espectrometría de superficie Auger, el cual no se trata en este ensayo.

La velocidad y la energía de enlace (EL) de los electrones expulsados son características de cada elemento. Según Vempati *et al.* (1996), pequeños cambios en la energía de enlace (50 eV) pueden reflejar diferencias en el estado químico del átomo, lo cual permite obtener información estequiométrica sobre cuantificación de especies iónicas, el estado de oxidación y la estructura electrónica.

La XPS es una técnica de análisis de superficie, porque la profundidad de penetración del haz de fotones en la muestra no supera 1 a 2 nm; es no destructiva y de análisis total; es multielemental, pero no incluye al hidrógeno; es semicuantitativa (error ± 10 y 20%), y cuantitativa; y se usa para analizar la composición cualitativa, cuantitativa, y el estado químico de los elementos en la superficie de un material. La sensibilidad de XPS depende de la concentración del elemento en la matriz y de la pureza de ésta última. El análisis de una matriz heterogénea y con baja concentración del analito de interés, será menos sensible. Los componentes básicos de un espectrómetro XPS son: una cámara de ultra alto vacío, una fuente de rayos X (haz de electrones), un contador de electrones, un detector y un sistema de adquisición y procesamiento de datos (Figura 2).

La medición con XPS requiere condiciones de ultra alto vacío, inferiores a 10^{-7} pascal o 100 nanopascals. El control de vacío se consigue mediante bombas turbo-moleculares y rotatorias de aceite (Barr *et al.*, 1999; Vempati *et al.*, 1996). Esta técnica se usa en el desarrollo de nuevos materiales como polímeros y adhesivos, metalurgia, catálisis heterogénea, estudios de corrosión, y en

the environment and their components, which previously underwent experimentation exclusively in solutions (Vempati *et al.*, 1996). A more recent application is the mapping of a region of solid soil samples to study the chemistry of silicates and their association with biological materials, with a spatial resolution of 10 mm (Barr *et al.*, 1999).

Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE)

The PIXE technique basis is the detection of the X-rays emitted when a beam of charged particles interacts with atom electrons in a sample (Figure 3A). The electrons of the internal layers are expelled and the excess energy of the atoms may be liberated through the emission of X-rays (van der Ent *et al.*, 2018). The energy of the emitted X-rays is equal to the energy difference between the levels of the transition, which is characteristic of each element. The particle beam can be protons or electrons of heavy atoms that are accelerated and acquire energy ranging from a few KeV to 10 MeV. The particle beam penetrates the sample linearly up to about 15 mm. The use of highly focused protons allows the obtention of one- and two-dimensional images of the distribution of chemical elements in the sample (Johansson *et al.*, 1995). Under this principle, PIXE is a total analysis technique that does not require atomization (Rubinson and Rubinson, 2001), whose detection limits are milligrams per kilogram or parts per million (ppm). And it is a non-destructive surface technique for the complete- multi-element analysis.

A PIXE spectrometer consists of an ultra-high vacuum chamber, a source of protons or electrons, and a nuclear accelerator (of the tandem or Van de Graaff type), a proton or electron analyzer, a detector and a counter (Figure 3B).

The detector of Si (Li) solid-state measures the energy of X-rays, which varies from 1 to 3 MeV (van der Ent *et al.*, 2018) and for heavy elements up to 10 MeV (Ruvalcaba, 2013). The efficiency of the detector is higher if the energy applied is 5 to 25 eV. In part, this determines the series of X-ray emission used for the analysis of elements according to their atomic number (Z). The PIXE technique allows analyzing more accurately elements with Z between 18 and 40 (van der Ent *et al.*, 2018). With PIXE, it is not possible to analyze light elements such as Na,

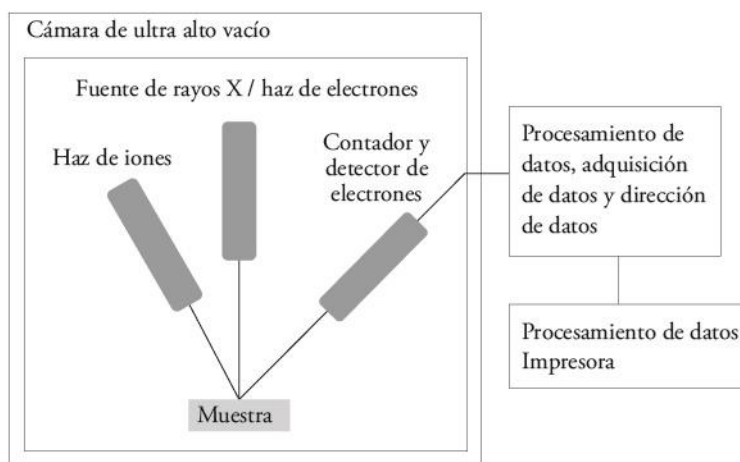


Figura 2. Componentes de un instrumento XPS (Hofmann, 2012).
Figure 2. Components of an XPS instrument (Hofmann, 2012).

la caracterización de superficies de sólidos (Fadley, 2010), pero hay poca información de su uso para estudiar elementos minerales en material vegetal. Esto podría atribuirse a que los límites de detección de XPS (mayor a 0.1%) (Hofmann, 2012) son superiores a las concentraciones normales de elementos, en estos materiales. Sin embargo, XPS puede ser útil en estudios de procesos fisiológicos y para investigar la contaminación de material vegetal. Por ejemplo, Reyes-Moreno *et al.* (1993) reportaron que la oxidación de los lípidos de las semillas de frijol intervenía en el endurecimiento de la testa. Este fenómeno se puede estudiar con XPS como complemento de otras metodologías analíticas, según lo sugiere Hoffman (2012).

En suelos, XPS permite estudiar procesos de adsorción, disolución y precipitación de iones en el ambiente y sus componentes, que antes se experimentaban exclusivamente en soluciones (Vempati *et al.*, 1996). Una aplicación más reciente es el mapeo de una región de muestras sólidas de suelo para estudiar la química de los silicatos y su asociación con materiales biológicos, con una resolución espacial de 10 mm (Barr *et al.*, 1999).

Espectrometría de emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE)

La técnica PIXE se basa en la detección de los rayos X emitidos cuando un haz de partículas

Al, Mg, and Si (Kuisma-Kursula, 2000), which are of interest in studies of plants and soils. The PIXE equipment is in nuclear physics laboratories, and its use is not for routine analysis purposes, because the device includes a particle accelerator. However, the micro version of PIXE is a technique used more frequently and increasingly presents new applications (Johansson *et al.*, 1995; Grieken, 2004).

The first use of the PIXE spectrometry was to analyze trace elements in thin leaves in semiconductors. Then the sample holders were modified to introduce and analyze geological, archaeological, forensic materials, and artistic objects where it is important not to alter the sample, and no vacuum is required. This technique is sensitive and fast to analyze these materials (Johansson *et al.*, 1995) and complement other techniques. Applications for the study of physiological processes in living plants were subsequently developed (van der Ent *et al.*, 2018).

Mesjasz-Przybyłowicz and Przybyłowicz (2002) used micro-PIXE to study physiological processes in plants at the cell level and determined essential nutrients and toxic elements. Micro-PIXE is a microprobe analysis technique that consists of applying the stable and focused beam of protons on micro samples or micro areas of larger specimens. The microprobes use modified optical microscopes to locate the area to be analyzed, direct the probe beam, and collect the analytical signal. With this procedure, it is possible to obtain one- and two-

cargadas interacciona con electrones de los átomos de una muestra (Figura 3A). Los electrones de las capas internas son expulsados y el exceso de energía de los átomos se puede liberar mediante la emisión de rayos X (van der Ent *et al.*, 2018). La energía de los rayos X emitidos es igual a la diferencia energética entre los niveles de la transición, la cual es característica de cada elemento. El haz de partículas puede ser de protones o electrones de átomos pesados que son acelerados y adquieren energía desde unos pocos KeV a 10 MeV. El haz de partículas penetra linealmente la muestra hasta unas 15 mm. El uso de protones altamente enfocados permite obtener imágenes de una y dos dimensiones de la distribución de elementos químicos en la muestra (Johansson *et al.*, 1995). Bajo este principio PIXE es una técnica de análisis total que no requiere atomización (Rubinson y Rubinson, 2001), cuyos límites de detección son de miligramos por kilogramos o partes por millón (ppm). Y es una técnica de superficie, no destructiva, para el análisis multielemental total.

Un espectrómetro PIXE se compone de una cámara de ultra alto vacío, una fuente de protones o electrones y un acelerador nuclear (del tipo tándem o Van de Graaff), un analizador de protones o electrones, un detector y un cuantificador (Figura 3B).

El detector de Si (Li) de estado sólido mide la energía de los rayos X que varía de 1 a 3 MeV (van

dimensional images of the distribution of chemical elements in the sample. Micro-PIXE has the potential to study the distribution of chemical elements in various materials and vegetables of interest in this essay. Progress in the application of this technique is subject in part to closer collaboration between biologists researching plants and the community of PIXE scholars to address the problems: sample preparation, refinement of analytical protocols, mainly in quantitative elementary mapping and interpretation of results. This essay seeks to enhance this type of interaction.

In this respect, Cvitanich *et al.* (2010) used ICP and PIXE to study the accumulation of Fe and ferritin in the seed coat and cotyledon of *Phaseolus* seeds. These studies are useful in the biofortification of micronutrients in this crop. Romero-Dávila *et al.* (2018) measured the total concentrations of P, S, Cl, K, and Ca with PIXE (1.7 MeV) in fortified cereals consumed in Mexico and Fe, Cu, Mn, and Zn with X-ray fluorescence (XRF, 35 kV). They used reference materials for quality control and a certified fortified cereal material to verify analytical accuracy and reported the overestimation of some content of these elements on cereal labels.

PIXE can combine with other techniques, such as the Rutherford elastic backscatter spectrometry (RBS), particle-induced gamma-ray emission (PIGE) (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). Kuisma-Kursula (2000) combined PIXE with X-rays (WDXRF, Wavelength dispersive X-ray fluorescence;

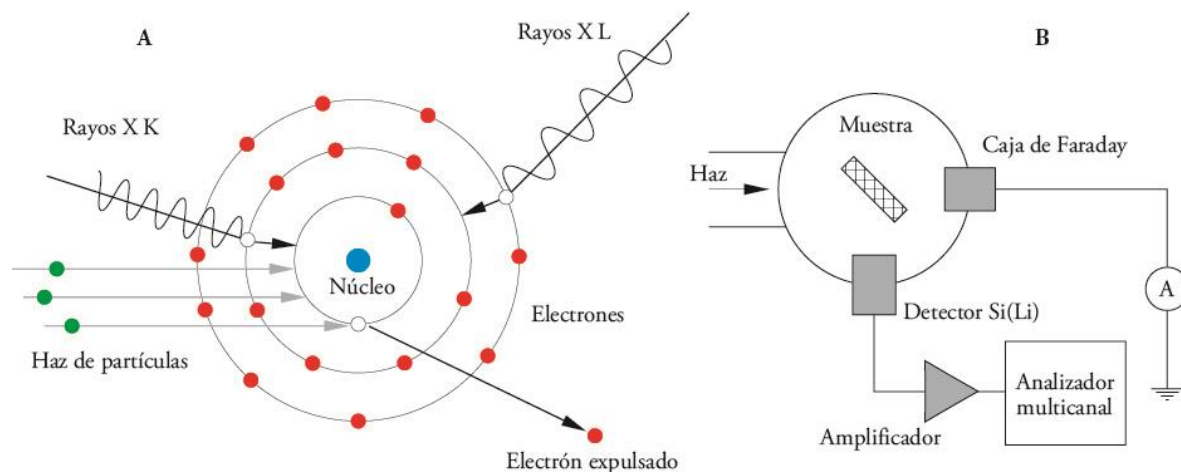


Figura 3. A) Emisión de electrones por PIXE. B) Componentes de un espectrómetro PIXE.
Figure 3. A) Electron emission by PIXE. B) Components of a PIXE spectrometer.

der Ent *et al.*, 2018) y para elementos pesados hasta 10 MeV (Ruvalcaba, 2013). La eficiencia del detector es más alta si la energía aplicada es de 5 a 25 eV. En parte, esto determina las series de emisión de rayos X usados para el análisis de elementos según su número atómico (Z). La técnica PIXE permite analizar con mayor exactitud elementos con Z entre 18 y 40 (van der Ent *et al.*, 2018). En PIXE no se pueden analizar elementos ligeros como Na, Al, Mg y Si (Kuisma-Kursula, 2000), de interés en estudios de vegetales y suelos. Los equipos PIXE están en laboratorios de física nuclear y su uso no es para fines de análisis rutinario, debido a que el aparato incluye un acelerador de partículas. No obstante, la versión micro de PIXE es una técnica usada con mayor frecuencia y cada vez presenta nuevas aplicaciones (Johansson *et al.*, 1995; Grieken, 2004).

La espectrometría PIXE en su inicio se usó para analizar elementos traza en hojas delgadas en semiconductores. Luego se modificaron los porta muestras para introducir y analizar materiales geológicos, arqueológicos, forenses y objetos artísticos donde es importante no alterar la muestra, y no requiere vacío. Esta técnica se usa para analizar esos materiales porque es sensible, rápida (Johansson *et al.*, 1995) y también puede complementarse con otras técnicas. Las aplicaciones para el estudio de procesos fisiológicos en plantas vivas se desarrollaron después (van der Ent *et al.*, 2018).

Mesjasz-Przybyłowicz y Przybyłowicz (2002) usaron micro-PIXE para estudiar en plantas procesos fisiológicos a nivel celular, y determinaron nutrientes esenciales y elementos tóxicos. Micro-PIXE es una técnica de análisis de microsonda que consiste en aplicar el haz estable y enfocado de protones sobre micro muestras o micro áreas de especímenes más grandes. Las microsondas usan microscopios ópticos modificados para ubicar el área a analizar, dirigir el haz de la sonda y recoger la señal analítica. Con este procedimiento se obtienen imágenes de una y dos dimensiones de la distribución de elementos químicos en la muestra. Micro-PIXE tiene potencial para estudiar la distribución de elementos químicos en diversos materiales y para vegetales de interés en este ensayo. El progreso en la aplicación de esta técnica estará sujeto, en parte, a una colaboración más estrecha entre los biólogos que investigan las plantas y la comunidad de los estudiosos de PIXE para abordar los problemas de: preparación de muestras, refinamiento de

and EDXRF, Energy dispersive X-ray fluorescence) to determine macro, micro and trace elements in old glass. The detection limits of EDXRF, WDXRF, and PIXE for that materials were 0.1, 0.01, and 1 to 10 mg kg⁻¹, respectively.

X-ray fluorescence spectrometry (XRF)

The basis of X-ray fluorescence is the fluorescence emissions generated by the excitation of the atoms in a sample using an X-ray source. X-rays (primary radiation) affect the internal electrons of the atoms that make up the sample (Fernández-Ruiz, 2008), and an electron of the internal layers is delocalized. Another electron of a more external level occupies the vacancy and emits an X-ray (secondary radiation) photon characteristic of the atom from which it comes (Goldstein *et al.*, 1981; Fernández-Ruiz, 2008). The energy of the emitted X-ray photon (E_{photon}) is equal to the energy difference of the states of higher (E_i) and lower energy (E_j). Another more external electron fills the new vacancy generated in the outer layer, with the emission of a new photon of lower energy. This process continues occurring until a free-electron occupies the last vacancy of the valence electron and the atom returns to its state of minimum energy (Figure 4). Because the energy states of electrons are quantized and distinctive of each element, the emitted (secondary) X-ray photons are characteristic of the atoms that generate them. The radiation that comes from all the photons emitted from the K, L, or even M layers (Ruvalcaba, 2013), generates an X-ray spectrum (Towett *et al.*, 2016). A spectrometer measures the intensity or energy of the spectral lines (Sanjeeva and Reidinger, 1996).

The XRF spectrometers classify into two categories according to the method used to separate energies from emitted radiation. The energy dispersion spectrometer (EDXF or EDXRF) uses a solid-state detector that separates the energies without any mechanical movement. The wavelength dispersion spectrometer (WDXF or WDXRF) uses a glass grid to separate energies and a conventional X-ray detector measures the intensities. The EDXRF spectrometer is fast and, in general, has lower sensitivity and resolution than the WDXRF spectrometer (Sanjeeva and Reidinger, 1996; Guerra *et al.*, 2014; Margui *et al.*, 2011). The essential components of the EDXRF and WDXRF spectrometers are an ultra-high vacuum chamber, a primary radiation source, a

los protocolos analíticos, principalmente en el mapeo elemental cuantitativo e interpretación de resultados. El presente ensayo busca potenciar este tipo de interacciones.

Como ejemplo de lo anterior, Cvitanich *et al.* (2010) usaron ICP y PIXE para estudiar la acumulación de Fe y la ferritina en la testa y el cotiledón de semillas de *Phaseolus*. Estos estudios son útiles en la biofortificación de micronutrientes en este cultivo. Romero-Dávila *et al.* (2018) midieron las concentraciones totales de P, S, Cl, K y Ca con PIXE (1.7 MeV) en cereales fortificados consumidos en México y con fluorescencia de rayos X (XRF, 35 kV) Fe, Cu, Mn y Zn. Ellos usaron materiales de referencia para el control de calidad y un material certificado de cereal fortificado para verificar la precisión analítica, y reportaron sobreestimación en algunos contenidos de estos elementos en las etiquetas de los cereales.

PIXE puede combinarse con otras técnicas, como la espectrometría de retrodispersión elástica de Rutherford (RBS, Rutherford backscattering spectrometry), la emisión de rayos gama inducida por partículas (PIGE, Particle-induced gamma emission) (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). Kuisma-Kursula (2000) combinó PIXE con rayos X (WDXRF, Wavelength dispersive X-ray fluorescence; y EDXRF, Energy dispersive X-ray fluorescence) para determinar macro, micro y elementos traza en vidrio antiguo. Los límites de detección de EDXRF, WDXRF y PIXE para ese estudio fueron 0.1, 0.01 y 1 a 10 mg kg⁻¹.

Espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF)

La base de la fluorescencia de rayos X son las emisiones de fluorescencia generadas por la excitación de los átomos de una muestra mediante una fuente de rayos X. Los rayos X (radiación primaria) inciden sobre los electrones internos de los átomos que componen la muestra (Fernández-Ruiz, 2008) y un electrón de las capas internas es deslocalizado. Otro electrón de un nivel más externo ocupa la vacante y emite un fotón de rayos X (radiación secundaria) característico del átomo del que procede (Goldstein *et al.*, 1981; Fernández-Ruiz, 2008). La energía del fotón de rayos X (radiación secundaria) emitido ($E_{\text{fotón}}$) es igual a la diferencia energética de los estados de mayor (E_i) y menor energía (E_f). La nueva vacante generada en la

photon analyzer, a detector, and a quantifier (Figure 5). The primary radiation comes from an X-ray tube, and sometimes a synchrotron (a particular type of cyclic particle accelerator) or a radioactive material (Goldstein *et al.*, 1981; Towett *et al.*, 2016) is used. An X-ray tube with an anode of Rh, Ag, Mo, Cr, or W emits the photons. The detector is a solid-state cooled by a Peltier current. Secondary photons are identified as counts and are converted by a computer into an energy spectrum, where the peaks correspond to the elements to be quantified (Towett *et al.*, 2016).

The XRF spectrometers can be of two types: field or laboratory (Towett *et al.*, 2016). The EDXRF mode is more used in portable or field equipment, but it can also be used in laboratory equipment, while WDXRF is more frequent in the latter (Kouichi *et al.*, 2004; van der Ent *et al.*, 2018). Portable devices are faster to assess the composition of samples and are less expensive, although the detection limits are lower than those of laboratory equipment. The WDXRF technique is more expensive than EDXRF.

The XRF is used for performing microanalysis (micro-XRF) and elementary mapping, for which the detectors require optical systems, as well as, exact displacement systems, to make surface sweeps with the spatial resolution of nanometers. *Ad hoc* procedures are necessary to study the distribution of elements with micro-XRF, to prepare the sample and to preserve the sample in its natural state. The cost of this microanalysis and mapping equipment is higher than the other configurations of XRF equipment (Ruvalcaba, 2013).

The limitation of the XRF techniques is the interference coming from the matrix of the materials. Therefore, to know the chemical elements of the sample references similar to the latter are necessary for calibration purposes (Goldstein *et al.*, 1981; Towett *et al.*, 2016). It is possible to analyze powders, pellets, films, fibers or pieces of material, as well as liquids and suspended solids. For quantitative analysis, the sample preparation is minimal and must be finely ground to ensure homogeneity (Sanjeeva and Reidinger, 1996). It is the case of samples of plant material that Towett *et al.* (2016) studied with XRF equipment: direct analysis or with sample protection, application of vacuum or not, use of different plant matrices.

The XRF is a non-destructive surface spectrometry suitable for qualitative and quantitative multi-

capa externa puede rellenarse por otro electrón más externo, un nuevo fotón de menor energía es emitido y los electrones ocupan los espacios energéticos vacíos de acuerdo con la teoría cuántica. Este proceso se produce sucesivamente hasta que un electrón libre ocupa la última vacante del electrón de valencia y el átomo regresa a su estado de mínima energía (Figura 4). Debido a que los estados de energía de los electrones están cuantizados y son característicos de cada elemento, los fotones de rayos X (secundarios) emitidos son característicos de los átomos que los generan. La radiación que proviene de todos los fotones emitidos procedentes de las capas K, L o incluso M (Ruvalcaba, 2013) generan un espectro de rayos X (Towett *et al.*, 2016). La intensidad o la energía de las líneas espectrales se miden con un espectrómetro (Sanjeeva and Reidinger, 1996).

Los espectrómetros de XRF se clasifican en dos categorías según el método usado para separar las energías de las radiaciones emitidas. El espectrómetro de dispersión de energía (EDXF o EDXRF) usa un detector de estado sólido que separa las energías sin ningún movimiento mecánico. El espectrómetro de dispersión de longitud de onda (WDXF o WDXRF) utiliza una rejilla de cristal para separar las energías y las intensidades se miden mediante un detector de rayos X convencional. El espectrómetro EDXRF es más rápido y, en general, tiene menor sensibilidad y resolución que el espectrómetro WDXRF (Sanjeeva and Reidinger, 1996; Guerra *et al.*, 2014; Margui *et al.*, 2011). Los componentes básicos

element analysis in plants. In studies of pollution, agriculture, forestry, element chemistry of medicinal plants, and their extracts, XRF is used (Queralt *et al.*, 2005; Margui *et al.*, 2011; Tezotto *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2015). Dumlapinara *et al.* (2007) used WDXRF to measure P, K, Ca, Mg, Cl, S, Cu in bean seedlings subjected to cold stress for the study of nastics movements, whereas Margui *et al.* (2011) studied the dispersion of metals in mining areas with EDXR and WDXRF to determine macro, micro and trace elements in bioindicators plant species.

Tezotto *et al.* (2013) used EDXRF to measure Ni and Zn in coffee leaves; the concentrations measured were higher than those obtained with ICP, and their cost was lower. Sosa *et al.* (2018) evaluated concentrations of Fe (30 clones) and Zn (12 clones) with this same technique in potato breeding studies. The comparison of P, K, Ca, S, Fe, Mn, and Si in sugarcane measured with portable and laboratory EDXRF devices showed a close correlation ($P > 0.9$) (Guerra *et al.*, 2014). De Carvalho *et al.* (2018) diagnosed the nutritional status in vegetables, in solid samples, with the combination of XRF, ICP-MS, and laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), and created protocols for the use of XRF in direct analyzes in the field. Guerra *et al.* (2015) analyzed *in situ* P, K, Ca, S, Fe, Mn, and Si on sugarcane leaves directly in the field by using EDXRF and LIBS.

Although XRF applications are increasingly frequent in plant analysis, detection and quantification processes must be optimized to make this technique as reliable as conventional techniques. Calibration

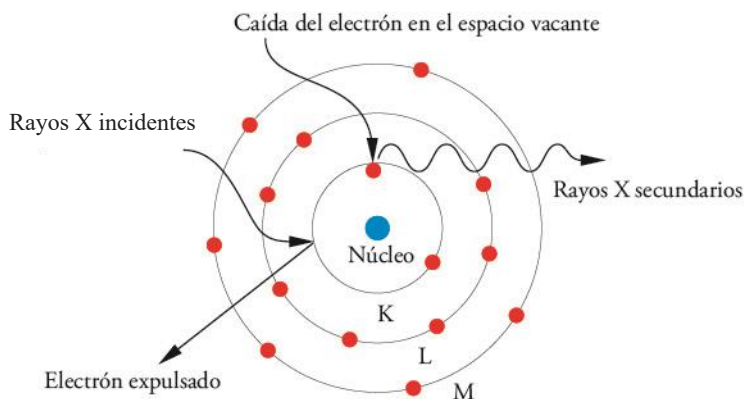


Figura 4. Esquema de la emisión de fotones en XRF (Fundamento de fluorescencia de rayos X en imágenes. s.f. <https://helioza.com/wp-content/uploads/2015/07/xrf-principle-300x232.gif>).

Figure 4. Scheme of the emission of photons in XRF (Foundation of X-ray fluorescence in images <https://helioza.com/wp-content/uploads/2015/07/xrf-principle-300x232.gif>).

de los espectrómetros EDXRF y WDXRF son una cámara de ultra alto vacío, una fuente de radiación primaria, un analizador de fotones, un detector y un cuantificador (Figura 5). La radiación primaria procede de un tubo de rayos X, aunque también puede usarse un sincrotrón (tipo particular de acelerador cíclico de partículas) o un material radioactivo (Goldstein *et al.*, 1981; Towett *et al.*, 2016). Para emitir los fotones (radiación primaria) se usa un tubo de rayos X con ánodo de Rh, Ag, Mo, Cr o W. El detector es de estado sólido refrigerado por una corriente de Peltier. Los fotones secundarios son identificados como cuentas y son convertidos por una computadora en un espectro de energía, donde los picos corresponden a los elementos que se quiere cuantificar (Towett *et al.*, 2016).

Los espectrómetros de XRF pueden ser de campo o de laboratorio (Towett *et al.*, 2016). La modalidad EDXRF es más usado en equipos portátiles o de campo, aunque también se puede usar en equipos de laboratorios, mientras que WDXRF es más frecuente en estos últimos (Kouichi *et al.*, 2004; van der Ent *et al.*, 2018). Los dispositivos portátiles son más rápidos para evaluar la composición de las muestras y su costo es menor, aunque los límites de detección son inferiores a los de equipos de laboratorio.

with matrix standards coinciding with those of the analyzed samples is still a critical problem that must be solved (de Carvalho *et al.*, 2018; Romero-Dávila *et al.*, 2018; Sawisza *et al.*, 2011). In soils, this technique is used in combination with the ICP-MS to analyze heavy elements in low concentrations since their detection limits are parts per million.

X-ray dispersive energy spectrometry (EDS) and dispersive wavelength (WDS)

The EDS spectrometry, also called EDX, is a non-destructive surface technique for qualitative and quantitative multi-element analysis of a wide variety of materials and plants. Its fundamental principle is the dispersive energy of X-rays. The XRF spectrometers couple to scanning electron microscopes (SEM) or transmission electron microscopy (TEM) or a combination of both (STEM, Scanning transmission electron microscopy). This equipment allows obtaining the concentration of chemical elements, and high-resolution images. These techniques correspond to X-ray fluorescence microscopy (XFM) (van der Ent *et al.*, 2018).

The general components of EDS spectrometers are a source of electrons, an X-ray detector, and a pulse processor-analyzer. The detector converts X-ray energy to voltage and this information is sent to a

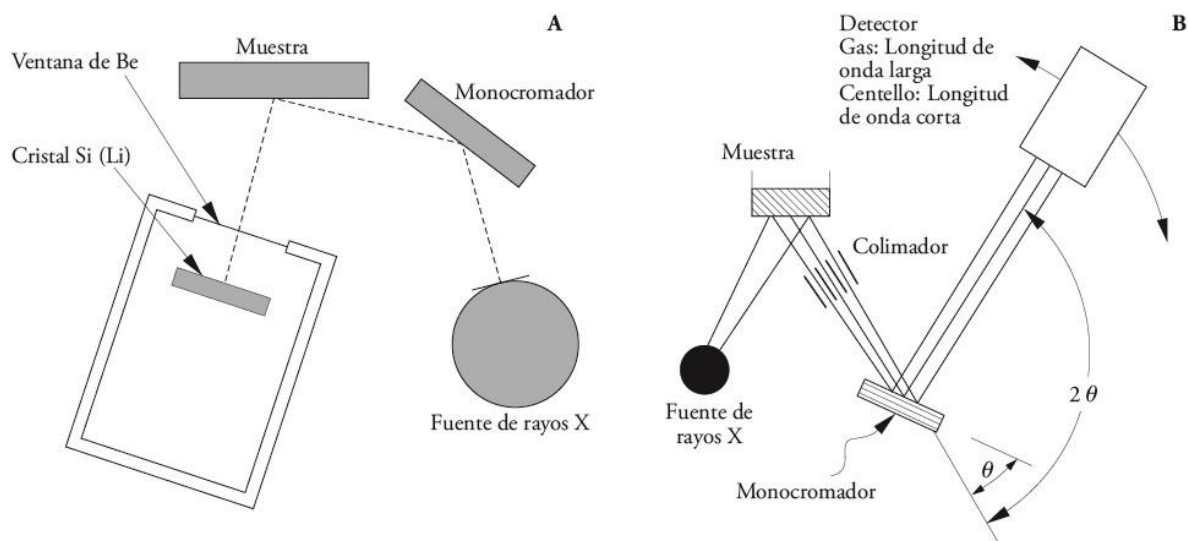


Figura 5. Espectrofotómetros EDXRF (A) y WDXRF (B) (Sanjeeva and Reidinger, 1996).
Figure 5. EDXRF (A) and WDXRF (B) spectrophotometers (Sanjeeva and Reidinger, 1996).

WDXRF es una técnica más costosa que EDXRF.

La XRF permite hacer microanálisis (micro-XRF) y mapeos elementales, para lo cual los detectores requieren sistemas ópticos, así como sistemas de desplazamiento muy precisos para hacer los barridos de superficie con resolución espacial del orden de nanómetros. Para estudiar la distribución de elementos con micro-XRF se usan procedimientos *ad hoc* para preparar la muestra y preservar su estado natural. El costo de estos equipos de microanálisis y de hacer mapeo es mayor al de las otras configuraciones de equipos de fluorescencia de rayos X (Ruvalcaba, 2013).

La limitante de las técnicas XRF son las interferencias provenientes de la matriz de los materiales. Por lo cual, para conocer los elementos químicos de la muestra se requieren referencias similares a ésta para calibrar (Goldstein *et al.*, 1981; Towett *et al.*, 2016). Es posible analizar polvos, pellets, películas, fibras o trozos de material, así como líquidos y sólidos en suspensión. Para el análisis cuantitativo la preparación de las muestras es mínima y se muelen muy fino para asegurar la homogeneidad (Sanjeeva y Reidinger, 1996). Este es el caso de muestras de material vegetal que Towett *et al.* (2016) estudiaron con equipos XRF: análisis directo o con protección de la muestra, aplicación o no de vacío, uso de diferentes matrices vegetales.

La XRF es una espectrometría de superficie, no destructiva, apropiada para el análisis cualitativo y cuantitativo multielemental en vegetales. Se usa en estudios de contaminación, agricultura, forestería, química elemental de plantas medicinales y sus extractos (Queralt *et al.*, 2005; Marguí *et al.*, 2011; Tezotto *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2015). Dumlupınara *et al.* (2007) usaron WDXRF para medir P, K, Ca, Mg, Cl, S, Cu en plántulas de frijol sometidas a estrés de frío para el estudio de movimientos násticos, mientras que Marguí *et al.* (2011) estudiaron la dispersión de metales en áreas mineras con EDXR y WDXRF para determinar elementos macro, micro y trazas en especies vegetales utilizadas como bioindicadores.

Tezotto *et al.* (2013) usaron EDXRF para medir Ni y Zn en hojas de café; las concentraciones medidas fueron más altas que las obtenidas con ICP y su costo fue menor. Sosa *et al.* (2018) evaluaron concentraciones

pulse processor that measures them. Each pulse corresponds to a current proportional to the energy of the X-ray that arrives. The current is amplified and stored according to its amplitude by a multichannel analyzer. After “counting” a sufficient number of X-rays, the output of the multichannel constitutes the X-ray spectrum of the sample (Zavaleta-Mancera and Arenas-Alatorre, 2013). The new systems have a solid-state *silicon drift detector* or SDD devices (Towett *et al.*, 2016). The accuracy of the EDS spectra can be affected by the overlapping of peaks (for example, Ti-K and V-K, Mn-K and Fe-K), the nature of the sample and the generation of X-rays by other atoms of the sample excited by the radiation beam (Goldstein *et al.*, 1981; Goldstein *et al.*, 2018).

The concentrations of the chemical elements to be quantified must be at least 100 mg kg⁻¹ (Zavaleta-Mancera and Arenas-Alatorre, 2013), but lower concentrations can be measured with a modification of the working conditions of the equipment. According to the last authors mentioned, this technique is fast, as low as 3 min in modern equipment, and gives information about the relative abundance of chemical elements with atomic numbers higher than Na (Z=11).

To measure elements with the atomic number from 40 to 80 with EDS, a potential of 10 to 40 KeV is required. The detection limits of the most massive elements with EDS are low (especially at concentrations <100 mg g⁻¹), and the depth of analysis is less than 2 mm (Ruvalcaba, 2013). This technique may be used to obtain heavy element mapping with low or medium vacuums. Modi *et al.* (2004) compared measurements made with EDS and AAS in *Phaseolus vulgaris* seeds. The first one overestimated the concentration of Ca, but those results can be useful in semi-quantitative studies. The EDS coupled to SEM/TEM microscopes was used by van der Ent *et al.* (2018) to study homeostasis of hyper accumulative plants and the coordination of metals in plant tissues.

The configuration WDS coupled to microscopes (Figure 6) (Tanaka *et al.*, 2008) has a higher spectral resolution than EDS, and avoids the problems of false peaks and noise of amplifiers associated with EDS. However, WDS has a low sensitivity to measure elements with atomic numbers less than Na (Z=11) and trace elements (Goldstein *et al.*, 2018). WDS detection limits are 0.01% by weight (Kuisma-Kursula, 2000).

de Fe (30 clones) y Zn (12 clones) con esta misma técnica en estudios de fitomejoramiento de papa. La comparación de P, K, Ca, S, Fe, Mn y Si en caña de azúcar medidos con dispositivos EDXRF portátiles y de laboratorio mostró una correlación estrecha ($P > 0.9$) (Guerra *et al.*, 2014). De Carvalho *et al.* (2018) diagnosticaron el estado nutricional en vegetales en muestras sólidas, con la combinación de XRF, ICP-MS y la ruptura inducida por láser (LIBS, laser-induced breakdown spectroscopy), y crearon protocolos para el uso de XRF en análisis directos en el campo. Guerra *et al.* (2015) analizaron *in situ* P, K, Ca, S, Fe, Mn y Si directo en campo en las hojas de caña de azúcar por EDXRF y LIBS.

Aunque las aplicaciones de XRF son cada vez más frecuentes en el análisis vegetal, se debe optimizar los procesos de detección y cuantificación para que esta técnica sea tan confiable como las técnicas convencionales. La calibración con estándares de matrices coincidente con las de las muestras analizadas es un problema crítico todavía y debe ser resuelto (de Carvalho *et al.*, 2018; Romero-Dávila *et al.*, 2018; Sawisza *et al.*, 2011). En suelos esta técnica se usa en combinación con ICP-MS para analizar elementos pesados en bajas concentraciones ya que sus límites de detección son de partes por millón.

Espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDS) y de longitud de onda dispersiva (WDS)

La espectrometría EDS, también llamada EDX, es una técnica de superficie no destructiva para el análisis cualitativo y cuantitativo multielemental de una amplia variedad de materiales y de plantas. Su principio fundamental es la energía dispersiva de rayos X. Los espectrómetros XRF se acoplan a microscopios electrónicos de barrido (SEM, Scanning electron microscopy) o de transmisión (TEM, Transmission electron microscopy) o a una combinación de ambos (STEM, Scanning transmission electron microscopy). Con estos equipos se obtiene la concentración de elementos químicos y se adquieren imágenes de alta resolución. Estas técnicas corresponden a microscopía de fluorescencia de rayos X (XFM, X-ray fluorescence microscopy) (van der Ent *et al.*, 2018).

Los componentes generales de los espectrómetros EDS son una fuente de electrones, un

Queralta *et al.* (2005) proposed a protocol to control the nutritional quality of medicinal plants *in situ* to analyze P, S, K, Ca, Mg, Na, Al, Si, and Ti using WDS, and of Fe, Cu, Mn, Zn, As, Rb, Sr, and Pb with EDS (mg kg^{-1} in both cases). The protocol included measuring in infusions of these plants P, S, K, Ca, Mg, Na, Al, Si, and Fe with ICP, and Cu, Mn, Zn, As, Rb, Sr, and Pb with ICP-MS (mg L^{-1} in both cases). The combination of these techniques performed well to classify these medicinal plants for nutrient supply purposes.

Final comments

The techniques ICP, ICP-MS, XPS, PIXE, XRF (EDXRF, WDXRF), EDS and WDS, are used to make multi-element analysis of total contents of elements present in plant and soil samples, including those essential for plant growth and some toxic elements. In contrast, conventional AES and AAS spectrometry are for non-simultaneous analysis of these elements. A disadvantage of ICP-MS, ICP, AES, and AAS is that they require samples solubilization. In the case of XPS, PIXE, XRF (EDXRF, WDXRF), EDS and WDS, no solubilization or physical processing of the samples is necessary, and the analysis is punctual, so it does not include the average value of the sample. The XPS technique allows the analysis of ionic fractions for studies of the oxidation states of the elements. ICP-MS, XRF are versatile and have similar levels of sensitivity. PIXE, EDS, WDS need that the base instrument be coupled to a microscope, and the samples require an *ad hoc* preparation. The most frequent use of XRF is to make measurements *in situ* of total elements in vegetables and living tissues. In turn, PIXE has more restricted applications for routine elementary plant analysis, and EDS and WDS are useful in the morphological study of plant surfaces.

The methodologies analyzed in this essay provide complementary information to conventional techniques and describe its basic principles; however, the use of these non-conventional technique is scarce in the agronomic field. This essay aims to contribute to diffusion of the potential of these methodologies among professionals and researchers of plant nutrition, food quality, and the environment.

—End of the English version—



detector de rayos X y un procesador-analizador de pulsos. El detector convierte la energía de los rayos X a voltaje y esta información se envía a un procesador de pulsos que las mide. A cada pulso le corresponde una corriente proporcional a la energía del rayo X que llega. La corriente se amplifica y almacena de acuerdo con su amplitud por un analizador multicanal. Después del “conteo” de un número suficiente de rayos X, la salida del multicanal constituye el espectro de rayos X de la muestra (Zavaleta-Mancera y Arenas-Alatorre, 2013). Los nuevos sistemas están equipados con dispositivos de estado sólido tipo *silicon drift detector* o SDD (Towett *et al.*, 2016). La precisión de los espectros EDS puede ser afectada por: solapamiento de picos (por ejemplo, Ti-K y V-K, Mn-K y Fe-K), la naturaleza de la muestra y la generación de rayos X por otros átomos de la muestra excitados por el haz de radiación (Goldstein *et al.*, 1981; Goldstein *et al.*, 2018).

Las concentraciones de los elementos químicos a cuantificar deben ser al menos 100 mg kg⁻¹ (Zavaleta-Mancera y Arenas-Alatorre, 2013) y concentraciones menores se pueden medir con una modificación de las condiciones de trabajo del equipo. Según los últimos autores mencionados, esta técnica es rápida, 3 min en equipos recientes, y da información de la abundancia relativa de elementos químicos con número atómico mayor al Na (Z=11).

Para medir elementos con número atómico de 40 a 80 con EDS, se requiere un potencial de 10 a 40 KeV. Los límites de detección de los elementos más pesados con EDS es baja (sobre todo a concentraciones <100 mg g⁻¹) y la profundidad de análisis es menor a 2 mm (Ruvalcaba, 2013). Esta técnica se puede usar para obtener mapeos de elementos pesados con vacíos bajos o medios. Modi *et al.* (2004) compararon mediciones hechas con EDS y AAS para analizar semillas de *Phaseolus vulgaris*. La primera de ellas sobreestimó la concentración de Ca, pero esos resultados se pueden usar en estudios semicuantitativos. La EDS acoplada a microscopios SEM/TEM se usó por van der Ent *et al.* (2018) para estudiar la homeostasis de plantas hiperacumuladoras y la coordinación de metales en los tejidos vegetales.

La configuración WDS acoplada a microscopios (Figura 6) (Tanaka *et al.*, 2008) presenta una mayor resolución espectral que EDS, evita los problemas de picos falsos y ruido de los amplificadores asociados con EDS. Pero WDS tiene una baja sensibilidad para medir elementos con número atómico menor al Na (Z=11) y elementos traza (Goldstein *et al.*, 2018). Los límites de detección de WDS son 0.01% en peso (Kuisma-Kursula, 2000).

Queralt *et al.* (2005) propusieron un protocolo para controlar la calidad nutrimental de plantas medicinales *in situ* con el análisis de P, S, K, Ca, Mg, Na, Al, Si y Ti con WDS, y de Fe, Cu, Mn, Zn, As, Rb, Sr y Pb con EDS (mg kg⁻¹ en ambos casos). El protocolo incluyó medir en infusiones de estas plantas P, S, K, Ca, Mg, Na, Al, Si y Fe con ICP, y de Cu, Mn, Zn, As, Rb, Sr y Pb con ICP-MS (mg L⁻¹ en ambos casos). La combinación de estas técnicas tuvo un buen desempeño para la clasificación nutrimental de estas plantas medicinales.

Comentarios finales

ICP, ICP-MS, XPS, PIXE, XRF (EDXRF, WDXRF), EDS y WDS se emplean para hacer análisis multielemental de contenidos totales de elementos presentes en muestras vegetales y de suelos, entre ellos, los esenciales para el crecimiento de los vegetales y algunos tóxicos. En contraste, las espectrometrías convencionales AES y AAS son para realizar análisis no simultáneos de estos elementos. Una desventaja de ICP-MS, ICP, AES y AAS es que demandan la solubilización de las muestras. En el caso de XPS, PIXE, XRF (EDXRF, WDXRF), EDS y WDS no se requiere solubilización ni procesamiento físico de las muestras y el análisis es puntual, por lo cual no comprende el valor medio de la muestra. La técnica XPS permite el análisis de fracciones iónicas para estudios de los estados de oxidación de los elementos. ICP-MS, XRF son versátiles y poseen niveles similares de sensibilidad. Las técnicas PIXE, EDS, WDS necesitan que el instrumento base se acople a un microscopio y las muestras requieren una preparación *ad hoc*. El uso más frecuente de XRF es para hacer mediciones *in situ* de elementos totales en vegetales y tejidos vivos. Por su parte, PIXE tiene aplicaciones más restringidas para el análisis elemental rutinario de vegetales, y EDS y WDS son útiles en el estudio morfológico de la superficie de las plantas.

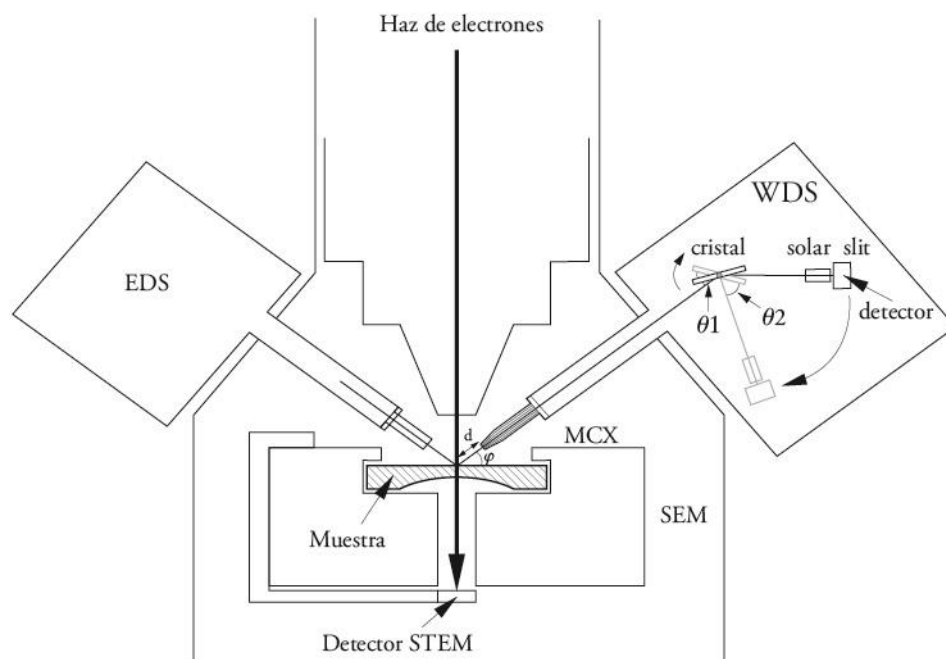


Figura 6. Esquema de un Sistema STEM-WDS (Tanaka *et al.*, 2008).

Figure 6. Scheme of a STEM-WDS System (Tanaka *et al.*, 2008).

Las metodologías discutidas en este ensayo proporcionan información complementaria a las técnicas convencionales y describen sus principios básicos, pero el uso de estas técnicas no convencionales es escaso en el ámbito agronómico. El presente ensayo es una contribución a la difusión de la potencialidad de esas técnicas entre los profesionales e investigadores de la nutrición de las plantas, la calidad de los alimentos y el medioambiente.

LITERATURA CITADA

- Abián, J., M. Carrascal, y M. Gay M. 2008. Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en proteómica. *Proteómica* 2: 16-64.
- Barr, T. L., E. E. Hoppe, S. Hardcastle, and S. Seal. 1999. X-ray photoelectron spectroscopy investigations of the chemistries of soils. *J. Vac. Sci. Technol. A* 17: 1079-1085.
- Caughlin, B.L. 2010. Developments in analytical technology. *Geochem-Explor. Env. A* 10: 137-141.
- Chirinos J., D. Oropeza, J. González, V. Zorba, and R. E. Russo. 2017. Analysis of plant leaves using laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry: use of carbon to compensate for matrix effects. *Appl. Spectrosc.* 7: 709-720.
- Cvitanich, C., W. J. Przybylowicz, D. F. Urbanski, A. M. Jurkiewicz, J. Mesjasz-Przybylowicz, M. W. Blair, C. Astudillo, E. O. Jensen, and J. Stougaard. 2010. Iron and ferritin accumulate in separate cellular locations in *Phaseolus* seeds. *BMC Plant Biol.* 10: 26 p.
- de Carvalho, G. G. A., M. B. B. Guerra, A. Adame, C. S. Nomura, P. V. Oliveira, H. W. P. de Carvalho, D. S. Júnior, L. C. Nunes, and F. J. Krug. 2018. Recent advances in LIBS and XRF for the analysis of plants. (Review). *J. Anal. Atom. Spectrom.* 33: 919-944.
- Dumlupinar, R., F. Demir, G. Budak, A. Karabulut, N. Kadi, H. Karakurt, and S. Erdal. 2007. Determination of replacement of some inorganic elements in pulvinus of bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Gina 2004) at chilling temperature by the WDXRF spectroscopic technique. *J. Quant. Spectrosc. Ra.* 103: 331-339.
- Fadley, C. S. 2010. X-ray photoelectron spectroscopy: Progress and perspectives. *J. Electron. Spectrosc.* 178-179: 2-32.
- Fernández-Ruiz, R. 2008. Seminarios. La espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF). <http://ramontxrf.260mb.net/icpms.html>. (Consulta: junio 2018).
- Fundamento de fluorescencia de rayos X en imágenes. <https://helioza.com/wp-content/uploads/2015/07/xrf-principle-300x232.gif> (Acceso: julio 2019).
- Guelke, S., and F. von Blanckenburg. 2012. Fe isotope fractionation caused by translocation of iron during growth of bean and oat as models of strategy I and II plants. *Plant Soil* 352: 217-231.

- Grieken, R. Van. 2004. Considering the role of X-ray spectrometry in chemical analysis and outlining the volume. *In*: Tsuji, K., J. Inuk and R. V. Grieken (eds). X-ray Spectrometry: Recent Technological Advances. John Wiley and Sons, Ltd. pp: 1-11.
- Guerra M., B. B., E. de Almeida, G. G. A. Carvalho, P. F. Souza, L. C. Nunes, D. S. Júnior, and F. J. Krug. 2014. Comparison of analytical performance of benchtop and handheld energy dispersive X-ray fluorescence systems for the direct analysis of plant materials. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 29: 1667-1674.
- Guerra, M. B. B., A. Adame, E. de Almeida, G. G. A. de Carvalho, D. Santos Jr., and V. Krug. 2015. Direct analysis of plant leaves by EDXRF and LIBS: microsampling strategies and cross-validation. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 30: 1646-1654.
- Goldstein, J. I., D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. Ritchie, J. H. J. Scott, and D. C. Joy. 2018. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *In*: Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. Fourth Edition. Springer. New York, NY, USA. pp: 65-92.
- Hofmann, S. 2012. Auger-and X-ray Photoelectron Spectroscopy in Materials Science: A User-oriented Guide. Springer Science & Business Media. Vol. 49.
- Johansson, S. A. E., J. L. Campbell, and K. G. Malmqvist. 1995. Particle-induced X-Ray emission spectrometry (PIXE). https://books.google.com.mx/booksid=zKgFMQrfiIH8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false (Acceso: julio 2019).
- Kuisma-Kursula, P. 2000. Accuracy, precision and detection limits of SEM-WDS, SEM-EDS and PIXE in the multi-elemental analysis of medieval glass. *X-Ray Spectrom.* 29: 111-118.
- Masson P., T. Dalix, and S. Bussière. 2010. Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 41: 231-243.
- Mesjasz-Przybyłowicz, J., and W. J. Przybyłowicz. 2002. Beam interaction with material and atoms. Micro-PIXE in plant sciences: present status and perspectives. *Nucl. Instrum. Meth B.* 189: 470-481.
- Metzner R., H. U. Schneider, U. Breuer, and W. H. Schroeder. 2008. Imaging nutrient distributions in plant tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry and scanning electron microscopy. *Plant Physiol.* 147: 1774-1787.
- Modi, A. T., T. A. Kjonstad, B. J. White, and P. Berjak. 2004. Comparison of EDX and AA to determine distribution of Ca²⁺ in *Phaseolus vulgaris* (L) seed parts following osmopriming. *S. Afr. J. Bot.* 70: 298-302.
- Queralto, I., M. Ovejero, M. L. Carvalho, A. F. Marques, and J. M. Llabres. 2005. Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP techniques *X-Ray Spectrom.* 34: 213-217. DOI: 10.1002/xrs.795.
- Reyes-Moreno, C., O. Paredes-López, and E. González. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans —A review. *Crit. Rev. Food Sci.* 33: 227-286.
- Romero-Dávila, E., J. Miranda, O. G. de Lucio, and J. C. Pineda. 2018. PIXE and XRF elemental analysis of breakfast cereals consumed in Mexico. *J. Radioanal. Nucl. CH.* 318: 887-895.
- Rubinson, A. K., and J. F. Robinson. 2001. Análisis Instrumental. Pearson Educación, S. A., Madrid. España. Editor. Isabel Capella. 839 p.
- Ruvalcaba S. J. L. 2013. Métodos analíticos para la determinación metales orgánicos. *In*: Alarcón A., y R. Ferrera-Cerrato (eds). Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas con Compuestos Orgánicos e Inorgánicos. Primera edición. Trillas. México. pp: 279-304.
- Sanjeeva, N. M., and F. Reidinger. 1996. *In*: Sibilia, J. P. (ed). A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis. John Wiley & Sons. pp: 143-164.
- Sedgwick, R. D., and D. M. Hindenlang. 1996. Mass spectrometry. *In*: Sibilia, J. P. (ed). A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis. John Wiley & Sons. Pp: 61-82.
- Soltanpour, P. N., G. W. Johnson, S. M. Workman, J. Benton J, Jr., and R. O. Miller. 1996. Inductively coupled plasma emission spectrometry and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *In*: Sparks, D. L. (ed). Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods. SSSA. Book Series No. 5. pp: 91-140.
- Sosa P., G. Guild, G. Burgos, M. Bonierbale, and T. Zum Felder. 2018. Potential and application of X-ray fluorescence spectrometry to estimate iron and zinc concentration in potato tubers. *J. Food Compos. Anal.* 70: 22-27.
- Tanaka, M., M. Takeguchi, and K. Furuya. 2008. X-ray analysis and mapping by wavelength dispersive X-ray spectroscopy in an electron microscope. *Ultramicroscopy.* 108: 1427-1431.
- Thyssen, G. M., C. Keil, M. Wolff, M. Sperling, D. Kadow, H. Haase, and U. Karst. 2018. Bioimaging of the elemental distribution in cocoa beans by means of LA-ICP-TQMS. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 33: 187-194.
- Tezotto, T., J. L. Favarin, A. P. Neto, P. L. Gratao., R. A. Azevedo, and P. Mazzafera. 2013. Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). *Sci. Agric.* 70: 263-267.
- Towett E. K., K. D. Shepherd, and B. Lee. Drake. 2016. Plant elemental composition and portable X-ray fluorescence (pXPF) spectroscopy: quantification under different, analytical parameters. *X-ray Spectrom.* 45:117-124.
- van der Ent, A., W. J. Przybyłowicz, M. D. de Jonge, H. H. Harris, C. G. Ryan, G. Tylko, D. J. Paterson, A. D. Barnabas, P. M. Kopittke, and J. Mesjasz-Przybyłowicz. 2018. X-ray elemental mapping techniques for elucidating the ecophysiology of hyperaccumulator plants (Review). *New Phytol.* 218: 432-452.
- Vempati R. K., T. R. Hess, and D. L. Cocke. 1996. X ray photoelectron spectroscopy. *In*: Sparks, D. L. (ed). Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical methods. SSSA. Book Series No. 5. pp: 357-376.
- Zavaleta-Mancera, H. A., y J. A. Arenas-Alatorre. 2013. Microscopía electrónica y detección de metales pesados en estudios de biorremediación. *In*: Alarcón A., y R. Ferrera-Cerrato (eds). Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas con Compuestos Orgánicos e Inorgánicos. Primera edición. Trillas. México. pp: 305-318.
- Zheng, M. Z., G. Li, G. X. Sun, H. Shim, and C. Cai. 2013. Differential toxicity and accumulation of inorganic and methylated arsenic in rice. *Plant Soil* 365: 227-238.

LIBERACIÓN DE *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) Y MANEJO PARA EL CONTROL DE *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae) EN CULTIVO DE SORGO

RELEASE OF *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) AND MANAGEMENT TO CONTROL *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae) IN SORGHUM

Martín Palomares-Pérez*, Manuel Bravo-Núñez, Hugo C. Arredondo-Bernal

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Km 1.5 Carretera Tecomán-Estación
FFCC, Colonia Tepeyac, Colima México. C.P. 28110. (mpalomares@colpos.mx), (menobra-
vo81@gmail.com), (hcesar_64@yahoo.com.mx)

RESUMEN

Melanaphis sacchari es una plaga de reciente introducción en México y puede causar hasta 100% de pérdidas al cultivo de sorgo (*Sorghum vulgare*). La estrategia del manejo integrado de este pulgón incluye el uso de enemigos naturales, por tal motivo, para colaborar en la problemática ocasionada por este insecto, se planteó el objetivo de evaluar el efecto de la liberación de *Chrysoperla externa* sobre la población de *M. sacchari* en el cultivo de sorgo en ambiente natural de cultivo e invernadero. La hipótesis es que la densidad poblacional de *M. sacchari* y el número de plantas de sorgo infestadas es menor al liberar a *C. externa*. La liberación de *C. externa* se evaluó en el cultivo de sorgo en condiciones naturales (campo) y condiciones semicontroladas (invernadero). La densidad inicial en campo fue 20 y la final 153.29 ± 44.52 y 568.26 ± 151.87 pulgones por planta en el tratamiento con *C. externa* y en el tratamiento sin liberación. La diferencia entre los tratamientos fue significativa ($p \leq 0.012$ y $p = 0.023$). El promedio de plantas infestadas en campo fue menor al testigo 8.71 ± 2.28 y 19.35 ± 4.65 . La densidad poblacional en invernadero inició con 15 pulgones por planta y aumentó exponencialmente hasta $10\,716 \pm 3961$, $16\,136 \pm 1092$, $11\,819 \pm 496$, y $20\,612 \pm 520$ en los tratamientos con *C. externa* y $2\,290\,680 \pm 1693$, y $3\,632\,040 \pm 3179$ en los tratamientos sin *C. externa*. El número de plantas infestadas fue menor en los tratamientos con *C. externa* (139, 221, 128 y 156) que en los tratamientos sin *C. externa* (3240 ambos tratamientos). Hubo diferencia significativa entre las densidades poblacionales ($p \leq 0.001$) y entre el número de plantas infestadas ($p = 0.0001$). Por lo tanto, *C. externa* controla

ABSTRACT

Melanaphis sacchari is a pest recently introduced in Mexico and can cause up to 100% of losses to the sorghum crop (*Sorghum vulgare*). The integrated management strategy of this aphid includes the use of natural enemies, for this reason, in order to contribute to solve the problems caused by this insect, the objective was to evaluate the effect of the release of *Chrysoperla externa* on the population of *M. sacchari* in the cultivation of sorghum under natural environments of cultivation and greenhouse. The hypothesis is that the population density of *M. sacchari* and the number of infested sorghum plants is lower when *C. externa* is released. The release of *C. externa* was evaluated in sorghum cultivation under natural conditions (field) and semi-controlled conditions (greenhouse). The initial field density was 20 and final density was 153.29 ± 44.52 and 568.26 ± 151.87 aphids per plant in the treatment with *C. externa* and in the treatment without release. The difference between the treatments was significant ($p \leq 0.012$ and $p = 0.023$). The average number of infested plants in the field was less than the control 8.71 ± 2.28 and 19.35 ± 4.65 . Greenhouse population density started with 15 aphids per plant and increased exponentially to $10\,716 \pm 3961$, $16\,136 \pm 1092$, $11\,819 \pm 496$, and $20\,612 \pm 520$ in the treatments with *C. externa* and $2\,290\,680 \pm 1693$, and $3\,632\,040 \pm 3179$ in the treatments without *C. externa*. The number of infested plants was lower in the treatments with *C. externa* (139, 221, 128 and 156) than in the treatments without *C. externa* (3240 both treatments). There was a significant difference between the population densities ($p \leq 0.001$) and between the number of infested plants ($p = 0.0001$). Therefore, *C. externa* controls *M. sacchari* only when combined with crop management. These results provide information for the integrated management of this pest and establish the problem of its control due to its great reproductive capacity.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 54: 435-444. 2020.

a *M. sacchari* sólo cuando se combina con el manejo del cultivo. Estos resultados aportan información para el manejo integrado de esta plaga y establecen la problemática de su control debido a su gran capacidad reproductiva.

Palabras clave: pulgón amarillo, control biológico, sorgo, manejo del cultivo, crisópido depredador, *Chrysoperla externa*.

INTRODUCCIÓN

El pulgón amarillo *Melanaphis sacchari* (Zehntner 1897) (Hemiptera: Aphididae) del sorgo (*Sorghum vulgare* L.) es una especie que se introdujo a México en el 2013 (SENASICA, 2014). El problema del pulgón se debe principalmente a la reducción de la calidad de sorgo en cultivo (Peña-Martínez *et al.*, 2015), y afecta el rendimiento entre 78 y 100% (López-Gutiérrez *et al.*, 2016). Esta especie puede desarrollar resistencia a diferentes productos químicos como Imidacloprid, Sulfoxaflor, Spirotetramat, Thiametoxam y Metamidofos, por lo cual el control biológico es una alternativa viable contra el pulgón (Hernández-Bautista *et al.*, 2016).

En el 2015 en Colima, México, se confirmó la presencia del pulgón *M. sacchari* sobre los cultivos de sorgo y, además, la actividad del insecto *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) (Hagen, 1861). Este insecto es un depredador con amplia distribución, presencia de adultos todo el año, potencial para adaptarse a varios ambientes de cultivo, resistencia a numerosos plaguicidas y fácil de criar en cautiverio (Medina *et al.*, 2003); presenta voracidad en estado larval y consume una amplia variedad de insectos de cuerpo blando, especialmente áfidos (Soto e Iannaccone, 2008). *C. externa* en sus estadios larva 3 y larva 2, tiene la capacidad de consumir en promedio cerca de 80 individuos de *M. sacchari* en 24 h y completar su ciclo biológico al alimentarse únicamente con este pulgón (Palomares-Pérez *et al.*, 2019).

Las estrategias del manejo integrado de *M. sacchari*, incluyen el uso de enemigos naturales y, por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la liberación de *C. externa* sobre la población de *M. sacchari* en el cultivo de sorgo en ambiente natural de cultivo e invernadero. La hipótesis fue que la densidad poblacional de *M. sacchari*, y el número de plantas de sorgo (*Sorghum vulgare* L.) infestadas disminuye al liberar a *C. externa*.

Key words: sugarcane aphid, biologic control, sorghum, crop management, predator chrysopid, *Chrysoperla externa*.

INTRODUCTION

The sugarcane aphid *Melanaphis sacchari* (Zehntner 1897) (Hemiptera: Aphididae) of sorghum (*Sorghum vulgare* L.) is a species that was introduced to Mexico in 2013 (SENASICA, 2014). The problem of the aphid is mainly due to the reduction in the quality of sorghum in cultivation (Peña-Martínez *et al.*, 2015), and affects yields between 78 and 100% (López-Gutiérrez *et al.*, 2016). This species can develop resistance to different chemical products such as Imidacloprid, Sulfoxaflor, Spirotetramat, Thiametoxam and Methamidophos, so biological control is a viable alternative against the aphid (Hernández-Bautista *et al.*, 2016).

In 2015 in Colima, Mexico, the presence of the *M. sacchari* aphid was confirmed on sorghum crops and, in addition, the activity of the *Chrysoperla externa* insect (Neuroptera: Chrysopidae) (Hagen, 1861). This insect is a predator with a wide distribution, presence of adults all year round, potential to adapt to several cultivation environments, resistance to numerous pesticides and easy to breed in captivity (Medina *et al.*, 2003). It has voracity in the larval stage and consumes a wide variety of soft-bodied insects, especially aphids (Soto and Iannaccone, 2008). *C. externa* in stages larva 3 and larva 2 has the capacity to consume an average of about 80 individuals of *M. sacchari* in 24 h and complete their life cycle by feeding only on this aphid (Palomares-Pérez *et al.*, 2019).

Integrated management strategies for *M. sacchari* include the use of natural enemies and, therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the release of *C. externa* on the population of *M. sacchari* in the cultivation of sorghum in a natural growing environment and greenhouse. The hypothesis was that the population density of *M. sacchari*, and the number of infested sorghum plants (*Sorghum vulgare* L.) decreases when *C. externa* is released.

MATERIALS AND METHODS

The collection of *C. externa* and *M. sacchari* was carried out in sorghum plots located in the community of Tecuanillo,

MATERIALES Y MÉTODOS

La recolecta de *C. externa* y *M. sacchari* se efectuó en parcelas de sorgo localizadas en la comunidad de Tecuanillo, municipio de Tecomán, Colima, México (18° 51' 30.37" N, 103° 52' 52.03" O y 15 m de altitud). Por medio de caracteres morfológicos externos e internos se identificó a *C. externa* usando las claves dicotómicas correspondientes (Brooks y Barnard, 1990; Brooks, 1994). La identificación de *M. sacchari* se realizó con el análisis molecular por medio de la extracción de ADN genómico con el kit DNeasy® Blood Tissue (QIAGEN®, CA, USA). Los insectos identificados se depositaron en la Colección de Insectos Entomófagos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CIE-CNRCB). Ya confirmada la especie, se estableció la colonia de *C. externa* con la metodología implementada en el departamento de Insectos Entomófagos (IE) del CNRCB (Palomares-Pérez *et al.*, 2017).

El estudio se realizó con dos pruebas; la primera en condiciones naturales (campo) y la segunda en condiciones semicontroladas (invernadero). Los pulgones utilizados en condiciones semicontroladas se criaron en plantas de *S. vulgare* sembradas en macetas de 5 L ubicadas en los invernaderos del CNRCB.

Condiciones naturales

La evaluación de campo se realizó del 21 de enero al 12 de mayo del 2016 en un terreno recién sembrado de *S. vulgare* ubicado en el municipio Tecomán, Colima, México (18° 46' 14.92" N, 103° 47' 01.98" O y 6 m de altitud). El terreno presentó una barrera natural de bugambillas (*Bougainvillea* sp.) de 1.5m de altura que lo divide en dos superficies de 0.25 ha cada una. La primera se utilizó para el tratamiento con liberación de larvas del segundo instar de *C. externa* (Palomares-Pérez *et al.*, 2016) y la segunda, como tratamiento sin liberación.

El monitoreo poblacional de *M. sacchari* se realizó en 100 plantas seleccionadas al azar. El monitoreo fue cada 8 d durante todo el ciclo del cultivo, con datos de la Dirección General de Sanidad Vegetal, que estableció el umbral económico en 50 pulgones por planta (Calero-Hortelano, 2018). Al considerar el potencial reproductivo de *M. sacchari* (Rensburg, 1973) se decidió evaluar el umbral siguiente: contabilizar $\geq 5\%$ plantas infestadas con > 10 pulgones por planta. Por lo tanto, las liberaciones de los crisópidos se hicieron por semana con 1000 larvas del segundo instar de *C. externa* en el foco de infestación (Palomares-Pérez *et al.*, 2016).

La liberación se realizó durante todo el ciclo del cultivo hasta completarse el llenado del grano. Las larvas se distribuyeron en forma radial a razón de 20 individuos cada 4 m (Palomares-Pérez *et al.*, 2016), hacia los cuatro puntos cardinales. La densidad de

municipality of Tecomán, Colima, Mexico (18° 51' 30.37" N, 103° 52' 52.03" W and 15 m altitude). By means of external and internal morphological characters, *C. externa* was identified using the corresponding dichotomous keys (Brooks and Barnard, 1990; Brooks, 1994). The identification of *M. sacchari* was performed by molecular analysis through genomic DNA extraction with the DNeasy® Blood Tissue Kit (QIAGEN®, CA, USA). The identified insects were deposited in the entomophagous insect collection (CIE) under the Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB). Once the species was confirmed, the colony of *C. externa* was established with the methodology implemented in the department of Entomophagous Insects (IE) under the CNRCB (Palomares-Pérez *et al.*, 2017).

The study was carried out with two tests: the first in natural conditions (field) and the second in semi-controlled conditions (greenhouse). Aphids used in semi-controlled conditions were raised in *S. vulgare* plants planted in 5 L pots located in the CNRCB greenhouses.

Natural conditions

The field evaluation was conducted from January 21 to May 12, 2016, in a newly planted *S. vulgare* field located in the municipality of Tecomán, Colima, Mexico (18° 46' 14.92" N, 103° 47' 01.98" W and 6 m altitude). The terrain presented a natural barrier of bougainvillea (*Bougainvillea* sp.) of 1.5m high that divides the whole in two surfaces each of 0.25 ha. The first one was used for the treatment with larvae release of the second instar of *C. externa* (Palomares-Pérez *et al.*, 2016) and the second one, as a treatment without release.

Population monitoring of *M. sacchari* was carried out on 100 plants selected randomly. Monitoring was done every 8 d during the whole crop cycle, with data from the Dirección General de Sanidad Vegetal, which operates plant health regulation in Mexico, and established the economic threshold at 50 aphids per plant (Calero-Hortelano, 2018). After considering the reproductive potential of *M. sacchari* (Rensburg, 1973) it was decided to evaluate the following threshold: count $\geq 5\%$ infested plants with > 10 aphids per plant. Therefore, the releases of chrysopids were made per week with 1000 larvae of the second instar of *C. externa* in the infestation focus (Palomares-Pérez *et al.*, 2016).

Release was made during the whole crop cycle until grain filling was completed. The larvae were distributed in a radial pattern at a rate of 20 individuals every 4 m (Palomares-Pérez *et al.*, 2016), towards the four cardinal points. The density of aphids was recorded before each release using the scale proposed by Bowling *et al.* (2015).

pulgones se registró antes de cada liberación con el uso de la escala propuesta por Bowling *et al.* (2015).

El manejo del cultivo fue adelantar 15 d la fecha de siembra, eliminar residuos anteriores de cosecha, una aplicación de productos químicos (Diazinon, Permetrina e Imidacloprid) contra el pulgón amarillo y registrar la presencia de los enemigos naturales de *M. sacchari*.

El estadístico Shapiro-Wilk ($p \leq 0.0029$) indicó que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad; por lo tanto, el análisis estadístico para determinar diferencia entre los tratamientos incluyó la prueba de Wilcoxon y la prueba de comparación de medias.

Condiciones semicontroladas

El estudio se realizó del 1 de agosto al 20 de septiembre del 2017, en un invernadero del CNRCB Tecomán, Colima México. El invernadero se dividió en seis parcelas por igual de 36 m². Cuatro se usaron como tratamiento con liberación de *C. externa* y dos sin liberación. En cada área se sembraron 3240 plantas de *S. vulgare*. Cuando las plantas tenían 30 cm de altura, se infestó una planta por área con 15 individuos del primero al cuarto instar de *M. sacchari*, y 24 h después se liberaron en el foco de infestación 30 larvas del segundo instar distribuidas en un arreglo cinco de oros. La distancia entre cada punto fue 1 m con seis larvas en cada punto. Las liberaciones se realizaron cada 8 d. La densidad de pulgones por planta y el número de plantas infestadas se registró con la escala antes mencionada.

Desde la siembra, hasta el llenado de grano, se liberaron 10 adultos cada 8 d. Para evitar la emigración, se colocó dieta artificial (miel, levadura de cerveza, polen, ácido ascórbico y espirulina) (Palomares-Pérez *et al.*, 2017) sobre una cartulina de papel bond de 25 cm² en la parte superior de una estaca de 40 cm de altura y ubicada en la orilla de un surco.

Las labores culturales fueron adelantar la fecha de siembra, dos riegos superficiales por semana, aplicación de urea como fertilizante y dos aplicaciones de Previcur-N®.

El diseño experimental fue bloques al azar con cuatro tratamientos y dos testigos. La variable respuesta fue la densidad población de *M. sacchari* y el número de plantas infestadas.

El estadístico Shapiro-Wilk ($p \leq 0.0001$) indicó que los datos no se ajustaron a la condición de normalidad, por lo cual se usó el

The crop management was to set the planting date 15 d in advance, to eliminate previous harvest residues, an application of commercial chemicals (Diazinon, Permethrin and Imidacloprid) against the sugarcane aphid and to record the presence of the natural enemies of *M. sacchari*.

The statistic Shapiro-Wilk ($p \leq 0.0029$) indicated that the data did not meet the assumptions of normality; therefore, statistical analysis to determine difference between treatments included the Wilcoxon test and the mean comparison test.

Semi-controlled conditions

The study was conducted from August 1 to September 20, 2017, in a greenhouse belonging to the CNRCB Tecomán, Colima Mexico. The greenhouse was divided into six equal plots of 36 m². Four were used as treatment with *C. externa* release and two without release. In each area 3240 plants of *S. vulgare* were planted. When plants were 30 cm high, one plant per area was infested with 15 individuals from the first to the fourth instar of *M. sacchari*, and 24 h later 30 larvae of the second instar were released in the infestation focus distributed in a quincuncial arrangement. The distance between each point was 1 m with six larvae at each point. The releases were made every 8 d. The density of aphids per plant and the number of infested plants was recorded with the above-mentioned scale.

From planting to grain filling, 10 adults were released every 8 d. In order to avoid migration, artificial diet (honey, beer yeast, pollen, ascorbic acid and spirulina) (Palomares-Pérez *et al.*, 2017) was placed on a 25 cm² bond paper cardboard on top of a 40 cm high stake placed at the edge of a furrow.

Cultivation practices were to set the planting date in advance, two surface irrigations per week, application of urea as fertilizer and two applications of Previcur-N®.

The experimental design was based on randomized blocks with four treatments and two controls. The response variable was the population density of *M. sacchari* and the number of infested plants.

The statistic Shapiro-Wilk ($p \leq 0.0001$) indicated that the data did not adjust to the condition of normality, so the Friedman non-parametric statistical analysis was used, with an error probability $\alpha=0.05$ and, according to significant difference, the mean value separation test ($p \leq 0.05$) was used.

análisis estadístico no paramétrico de Friedman, con una probabilidad de error $\alpha=0.05$ y, de acuerdo con diferencia significativa, se utilizó la prueba de separación de valores medios ($p\leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones naturales

Los insectos identificados como enemigos naturales de *M. sacchari* se presentaron de forma natural en los tratamientos. Esto coincidió con lo documentado por Rodríguez-Vélez *et al.* (2016). Ellos registraron la presencia de *Chrysoperla externa*, *Ceraeochrysa valida* (Banks, 1895) (Neuroptera: Chrysopidae), *Cycloneda sanguinea* L. 1763, *Coleomegilla maculata* (De Geen, 1775) y *Diomus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae).

Chrysoperla externa se presenta de manera natural en la zona de estudio, por tal motivo y con la intención de que su progenie ejerciera depredación sobre la población de *M. sacchari*, la población adulta de *C. externa* se conservó desde la fecha de siembra (21 enero) hasta el llenado de grano (28 abril); para la evaluación de ≥ 30 adultos de *C. externa* en el tratamiento con liberación, la cantidad se ajustó con adultos criados en la colonia establecida.

El primer brote de *M. sacchari* se presentó el 11 de febrero en el tratamiento con liberación y 14 d después en el tratamiento sin liberación. La liberación de las larvas de *C. externa* inició desde el 25 de febrero hasta el llenado de grano, el 28 abril (Cuadro 1).

Un aumento de la población de *M. sacchari* ocurrió entre el 17 y 24 de marzo en ambos tratamientos (Cuadro 1), y 21 d después la población comenzó a decrecer. Entre el 28 de abril y 5 de mayo (después del llenado de grano), la densidad aumentó de nuevo, y el tratamiento con liberación presentó cantidad menor de individuos por planta y cantidad menor de plantas infestadas.

Este comportamiento se presentó de manera similar en ambos tratamientos (Figura 1) y también lo documentaron Vázquez-Navarro *et al.* (2017), quienes mencionaron dos aumentos de la población de *M. sacchari* con intervalos de 5 semanas uno del otro y con un decremento entre ellos. Esta conducta puede ser característica de los áfidos (Barrios-Díaz *et al.*, 2004) porque la temperatura y el incremento del área foliar de las plantas son factores que favorecen el desarrollo del pulgón amarillo (Salas-Araiza *et al.*, 2017), y es probable que el hacinamiento, las condi-

RESULTS AND DISCUSSION

Natural conditions

The insects identified as natural enemies of *M. sacchari* occurred naturally in the treatments. This coincided with that documented by Rodríguez-Vélez *et al.* (2016). They recorded the presence of *Chrysoperla externa*, *Ceraeochrysa valida* (Banks, 1895) (Neuroptera: Chrysopidae), *Cycloneda sanguinea* L. 1763, *Coleomegilla maculata* (De Geen, 1775) and *Diomus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae).

Chrysoperla externa occurs naturally in the study area, for this reason and with the intention that its progeny would prey on the population of *M. sacchari*, the adult population of *C. externa* was conserved from the date of planting (January 21) until grain filling (April 28); for the evaluation of ≥ 30 adults of *C. externa* in the release treatment, the quantity was adjusted by the adults raised in the established colony.

The first outbreak of *M. sacchari* occurred on February 11 in the treatment with release and 14 d later in the treatment without release. The release of *C. externa* larvae started from February 25 until grain filling on April 28 (Table 1).

An increase in the population of *M. sacchari* occurred between March 17 and 24 in both treatments (Table 1), and 21 d after the population started to decrease. Between April 28 and May 5 (after grain filling), population density increased again, and the treatment with release showed lower number of individuals per plant and lower number of infested plants.

This behavior was similar in both treatments (Figure 1) and was also documented by Vázquez-Navarro *et al.* (2017), who mentioned two increases in the population of *M. sacchari* with intervals of 5 weeks from each other and with a decrease between them. This behavior may be characteristic of aphids (Barrios-Díaz *et al.*, 2004) because temperature and the increase in leaf area of the plants are factors promoting the development of sugarcane aphid (Salas-Araiza *et al.*, 2017); it is likely that overpopulation, natural conditions and the activity of natural enemies cause the decrease in population. Wilcoxon's statistical test, $\alpha=0.05$, showed a difference in *M. sacchari* population density between both treatments ($p=0.012$ and 0.024), which indicates that the

Cuadro 1. Densidad poblacional de *Melanaphis sacchari* por planta y cantidad de plantas infestadas en los tratamientos con y sin liberación de *Chrysoperla externa* en condiciones naturales en el cultivo de sorgo en el municipio Tecomán, Colima, México.

Table 1. Population density of *Melanaphis sacchari* per plant and quantity of infested plants in treatments with and without release of *Chrysoperla externa* under natural conditions in sorghum at the municipality of Tecomán, Colima, Mexico.

Fecha de evaluación	No. de pulgones		Plantas infestadas	
	Con liberación	Sin liberación	Con liberación	Sin liberación
21/01/2016	0	0	0	0
28/01/2016	0	0	0	0
04/02/16	0	0	0	0
11/02/16	3	0	1	0
18/02/16	7	0	1	0
25/02/16	23	15	7	1
03/03/16	22	24	5	3
10/03/16	34	28	7	5
17/03/16	120	40	6	8
24/03/16	223	50	7	9
31/03/16	425	1022	9	15
07/04/16	421	1378	7	40
14/04/16	141	1478	8	40
21/04/16	27	1122	5	35
28/04/16	50	707	8	30
05/05/16	200	807	15	35
12/05/16	450	850	36	50
Promedio	153.29 ± 44.52	537.21 ± 151.87	8.71 ± 2.28	19.35 ± 4.65

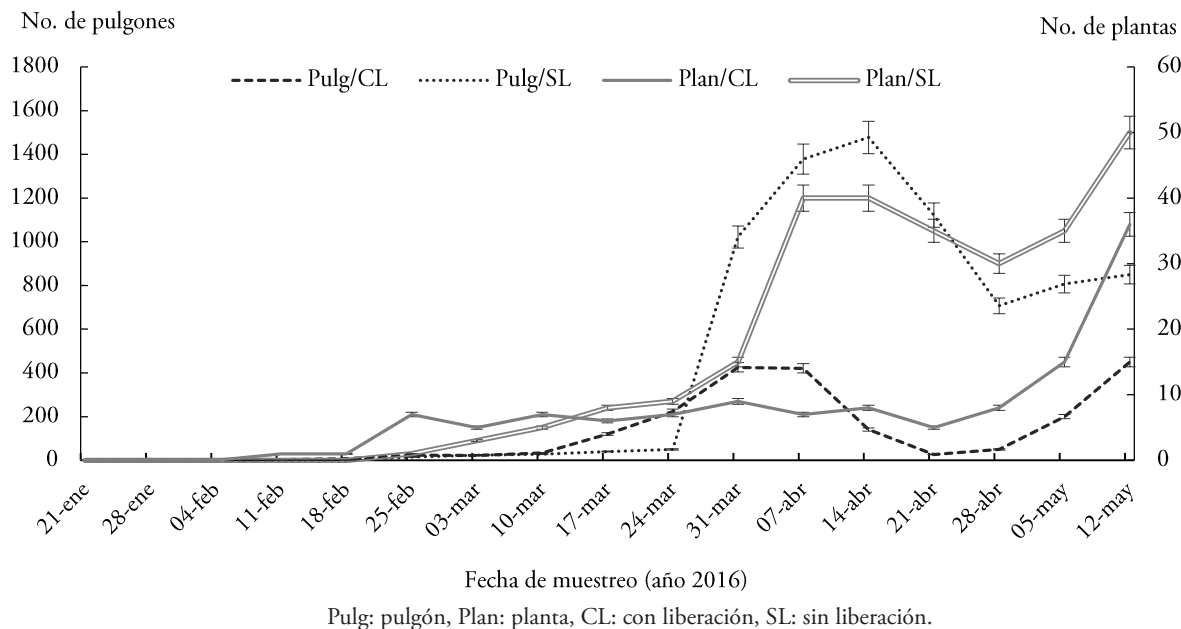


Figura 1. Densidad poblacional de *Melanaphis sacchari* con y sin liberación de *Chrysoperla externa* en el cultivo de sorgo en condiciones naturales.

Figure 1. Population density of *Melanaphis sacchari* with and without release of *Chrysoperla externa* in sorghum under natural conditions.

ciones naturales y la actividad de los enemigos naturales originen la disminución de la población.

La prueba estadística de Wilcoxon con $\alpha=0.05$ indicó diferencia en la densidad de la población de *M. sacchari* entre ambos tratamientos ($p=0.012$ y 0.024), lo cual indica que la liberación semanal de 1000 larvas del segundo instar de manera directa en el foco de infestación, así como mantener 30 adultos de *C. externa* durante todo el ciclo del cultivo, redujeron la población de *M. sacchari*, en un efecto combinado de los enemigos naturales registrados y las labores realizadas. White *et al.* (2001) mencionaron que *M. sacchari* en la caña de azúcar está sujeto al control biológico por patógenos, depredadores y parasitoides y, junto con los factores ambientales, a menudo pueden ser los responsables de la disminución inicial de la población.

Además, Lastra y Gómez (1997) citaron que la caña de azúcar posee una numerosa fauna benéfica que evita que las poblaciones de este pulgón alcancen niveles de daño económico. Sin embargo, ya que las poblaciones de *M. sacchari* en la caña de azúcar son menos abundantes (López-Gutiérrez *et al.*, 2016), Cortez-Mondaca (2016) señaló que la diversidad y abundancia elevada de enemigos naturales en el cultivo del sorgo, no reducen la población de este pulgón ni evitan el daño que provoca, y sugirió desarrollar estudios enfocados en implementar el control biológico por aumento, de alguna o varias especies de sus enemigos naturales, tal como se realizó en el presente estudio.

Condiciones semicontroladas

En los tratamientos con liberación se observa que la densidad poblacional de *M. sacchari* se concentra en los focos de infestación. En los tratamientos sin liberación, la infestación se distribuye en toda la superficie. Entonces, el confinamiento de los pulgones por parte de los crisópidos permite usar métodos de control complementarios al control biológico.

A los 21 d de evaluación, la densidad de *M. sacchari* creció de manera exponencial, hubo diferencias estadísticas en la densidad poblacional ($p\leq 0.05$) y en el número de plantas infestadas ($p\leq 0.05$); los tratamientos con *C. externa* presentaron las cantidades más bajas en ambas evaluaciones (Cuadro 2).

Aunque el análisis estadístico mostró diferencias, se debe considerar que los tratamientos con y sin

weekly release of 1000 larvae from the second instar directly at the infestation focus as well as maintaining 30 adults of *C. externa* throughout the crop cycle, reduced the *M. sacchari* population, in a combined effect of the natural enemies present and cultivation practices. White *et al.* (2001) mentioned that *M. sacchari* in sugarcane is subject to biological control by pathogens, predators and parasitoids and, along with environmental factors, those organisms can often be responsible for the initial population decline.

In addition, Lastra and Gómez (1997) cited that sugarcane has numerous beneficial fauna that prevents this aphid populations from reaching levels of economic damage. However, since the populations of *M. sacchari* in sugarcane are less abundant (López-Gutiérrez *et al.*, 2016), Cortez-Mondaca (2016) pointed out that the diversity and high abundance of natural enemies in the cultivation of sorghum do not reduce the population of this aphid nor avoid the damage it causes, and suggested developing studies focused on implementing biological control by increasing, one or some species of its natural enemies, as it was done in this study.

Semi-controlled conditions

In the treatments with release it is observed that the population density of *M. sacchari* is concentrated in the infestation foci. In treatments without release, the infestation is distributed over the entire surface. Thus, the confinement of aphids by chrysopids allows the use of other control methods in addition to biological control.

At 21 d of evaluation, the density of *M. sacchari* grew exponentially, there were statistical differences in population density ($p\leq 0.05$) and in the number of infested plants ($p\leq 0.05$); treatments with *C. externa* presented the lowest quantities in both evaluations (Table 2).

Although statistical analysis showed differences, it should be considered that treatments with and without release are above the economic threshold (Calero-Hortelano, 2018), due to the high reproductive capacity of *M. sacchari* that can reach up to 30 thousand individuals per plant (López-Gutiérrez, *et al.*, 2016). According to Rodríguez and Terán (2015), natural enemies do not reduce the population of *M. sacchari* below this threshold, but Hernández-Arenas *et al.* (2016) indicated that

Cuadro 2. Poblacional total de *Melanaphis sacchari* y cantidad de plantas infestadas en los tratamientos con y sin liberación de *Chrysoperla externa* en condiciones semicontroladas en los invernaderos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Table 2. Total population of *Melanaphis sacchari* and quantity of infested plants in treatments with and without release of *Chrysoperla externa* under semi-controlled conditions in the greenhouses of Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB).

Tratamiento	Densidad de pulgones	Plantas infestadas
R1	10 716 ± 3 961	139 ± 59.80
R2	16 136 ± 1 092	221 ± 95.63
R3	11 819 ± 496	128 ± 55.26
R4	20 612 ± 520	156 ± 67.81
T1	2 290 680 ± 1 693	3 240 ± 1 443.92
T2	3 632 040 ± 3 179	3 240 ± 1 441.40

R = tratamiento con liberación de *C. externa*, T = tratamiento sin liberación de *C. externa*. ± desviación estándar ♦ R = treatment with release of *C. externa*, T = treatment without release of *C. externa*. ± standard deviation.

liberación están sobre el umbral económico (Calero-Hortelano, 2018), debido a la alta capacidad de reproducción de *M. sacchari* que puede alcanzar hasta 30 000 individuos por planta (López-Gutiérrez, *et al.*, 2016). De acuerdo con Rodríguez y Terán (2015), los enemigos naturales no disminuyen la población de *M. sacchari* por debajo de este umbral, pero Hernández-Arenas *et al.* (2016) indicaron que el control biológico, con el uso de enemigos naturales, es un método menos eficiente contra *M. sacchari*, pero que puede reducir su población, tal como se registró en nuestro estudio. Los tratamientos con liberación presentaron la densidad poblacional menor del áfido y la cantidad menor de plantas infestadas (Figura 2).

CONCLUSIONES

En condiciones naturales, la población del pulgón amarillo (*Melanaphis sacchari*) en sorgo puede regularse por los enemigos naturales. Esto se debe ejercer con cuidado porque, según las condiciones del ambiente y el manejo del cultivo, las poblaciones del patógeno pueden no afectarse en época temprana, y en su lugar afectar el cultivo.

La reproducción alta del pulgón evita que el crisópido depredador (*Chrysoperla externa*) lo controle cuando actúa de manera aislada. Por tal razón se recomienda el control biológico y el manejo del cultivo.

biological control, with the use of natural enemies, is a less efficient method against *M. sacchari*, but it can reduce its population, as it was recorded in our study. Treatments with release presented the lowest population density of the aphid and the lowest quantity of infested plants (Figure 2).

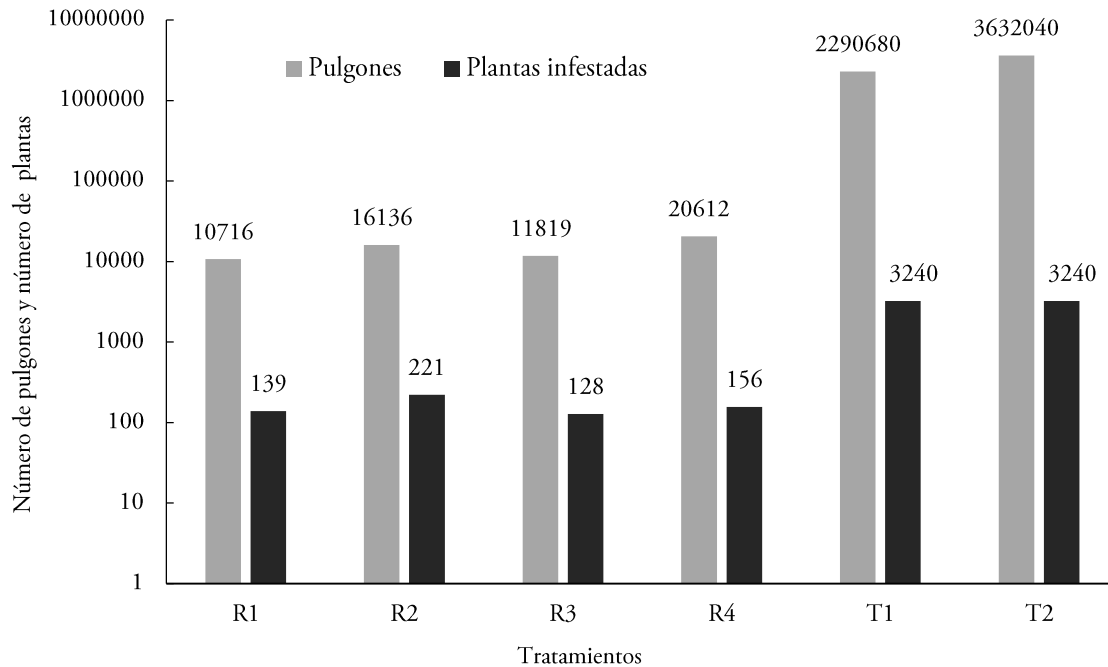
CONCLUSIONS

Under natural conditions, the population of the sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari*) in sorghum can be regulated by natural enemies. This should be practiced with care because, depending on environmental conditions and crop management, populations of the pathogen may not be affected at early stages, but affect the crop instead.

Aphids high reproduction prevents the predatory chrysopid (*Chrysoperla externa*) from controlling them when chrysopid acts in isolation. This is the reason why biological control and crop management is recommended.

Release of the second instar of the chrysopid in the infestation foci stops the population growth of the aphid; so this biological instar is preferential for the release.

If the predator-prey relationship, the release schedule and the adequate release proportion are established on each agricultural area, *C. externa* can



R = tratamiento con liberación de *C. externa*, T = tratamiento sin liberación de *C. externa*.

§ Gráfico en escala logarítmica, base 10.

Figura 2. Estructura poblacional total de *Melanaphis sacchari* y cantidad de plantas infestadas en los tratamientos con y sin liberación de *Chrysoperla externa* en condiciones semicontroladas en los invernaderos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Figure 2. Total population structure of *Melanaphis sacchari* and quantity of infested plants in treatments with and without release of *Chrysoperla externa* under semi-controlled conditions in the greenhouses of Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB).

La liberación del segundo ínstar del crisópido en los focos de infestación detiene el crecimiento poblacional del pulgón; de modo que este ínstar biológico es el preferente para su liberación.

Si la relación depredador-presa, el calendario de liberaciones y la proporción adecuada de liberación se establecen en cada zona agrícola, *C. externa* puede actuar como agente reductor de la población de *M. Sacchari*; y eso permitirá usar otro método complementario de control.

LITERATURA CITADA

- Barrios-Díaz, B., R. Alatorre-Rosas, H. G. Calyecac-Cortero, y N. Bautista-Martínez. 2004. Identificación y fluctuación poblacional de plagas de col (*Brassica oleracea* var. capitata) y sus enemigos naturales en Acatzingo, Puebla. Agrociencia 38: 239 - 248.
- Bowling, R., M. Brewer, A. Knutson, S. Biles, M. Way, y D. Sekula-Ortiz. 2015. Monitoreo del pulgón Amarillo en sorgo en el sur, centro y oeste de Texas. Texas A & M Agrilife. NTO-043S. 2/16.

act as a reducing agent on *M. Sacchari* population; and that will allow using another complementary control method.

—End of the English version—



- Brooks, S. J. 1994. A taxonomic review of the common green lacewing genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). The Bulletin of the British Museum Natural History (Entomology) 63: 137 - 210.
- Brooks, S. J., and P. Barnard C. 1990. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). The Bulletin of the British Museum Natural History (Entomology) 59: 117 - 286.
- Calero-Hortelano, M. E. 2018. Manejo integrado de plagas del sorgo. Comité Estatal de Sanidad Vegetal en el Estado de Guanajuato (CESAVEG). <http://www.cesaveg.org.mx/new/presentaciones/PlaticasCBJul15/Manejo%20Integrado%20de%20Plagas%20del%20Sorgo.pdf> (Consulta: octubre 2018)

- Cortez-Mondaca, E., J. Pérez-Márquez, y F. A. Valenzuela-Escoboza. 2016. Relación de enemigos naturales del pulgón amarillo del sorgo *Melanaphis sacchari* (Zehntner) en el norte de Sinaloa. https://www.researchgate.net/publication/314793630_RELACION_DE_ENEMIGOS_NATURALES_DEL_PULGON_AMARILLO_DEL_SORGO_Melanaphis_sacchari_Zehntner_EN_EL_NORTE_SINALOA (Consulta: enero 2019).
- Hernández-Arenas, M., A. Trujillo-Campos, L. Hernández-Vázquez, E. J. Barrios-Gómez, y S. G. Ramírez-Rojas. 2016. Incidencia y densidad de población de pulgón amarillo (*Melanaphis sacchari* Zehntner) en híbridos de sorgo en Morelos, México. *Investigación Agropec.* 13: 132 - 140.
- Hernández-Bautista, O., M.A. Arredondo-Pérez, E. Cerna-Chávez, Y. M. Ochoa-Fuentes, y F. E. Navarro-Campos. 2016. Cuantificación de enzimas detoxificativas en pulgón amarillo del sorgo (*Melanaphis sacchari*) en Saltillo, México. *Rev. Ciencias Natur. Agropec.* 3: 5 - 12.
- Lastra, L. A., y L. A. Gómez. 1997. Observaciones del ciclo de vida de la escama blanca *Duplacionaspis divergens* (Green) (Homoptera: Diaspididae) y reconocimiento de enemigos naturales *In*: Bustillo-Pardey A. E. 2011. Parasitoides, depredadores y entomopatógenos que afectan las plagas de la caña de azúcar. Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar en Colombia (CENICANA). Santiago de Cali, Colombia. http://www.cenicana.org/pdf_privado/no_clasificacion/6481.pdf (Consulta: enero 2019).
- López-Gutiérrez, D. R., M. D. Salas-Araiza, O. A. Martínez-Jaime, y E. Salazar-Solis. 2016. Géneros de Aphididae (Hymenoptera) parasitando al pulgón amarillo de la caña de azúcar *Melanaphis sacchari* Zehntner, 1897 (Hemiptera: Aphididae) en Irapuato, Guanajuato, México. *Entomol. Mex.* 3: 365 - 368.
- Medina, P., F. Budia, P. Del Estal, and E. Viñuela. 2003. Effects of three modern insecticides, pyriproxifen, spinosad and tebufenozide, on survival and reproduction of *Chrysoperla carnea* adults. *Ann. Appl. Biol.* 142: 55 - 61.
- Palomares-Pérez, M., M. A. Ayala-Zermeño, B. Rodríguez-Vélez Belez, J. J. De la Cruz-Llanas, J. A. Sánchez-González, H. C. Arredondo-Bernal, y E. G. Córdoba-Urtiz. 2016. Abundancia y depredación de *Ceraeochrysa valida* (Neuroptera: Chrysopidae) sobre *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México. *Chil. J. Agric. & Anim. Sci., ex Agro-Ciencia* 32: 234 - 243.
- Palomares-Pérez, M., M. I. Barajas-Romero, y H. C. Arredondo-Bernal. 2017. Producción masiva de *Ceraeochrysa valida* (Banks) (Neuroptera: Chrysopidae) a 30°C. *Chil. J. Agric. & Anim. Sci., ex Agro-Ciencia* 33: 187-191.
- Palomares-Pérez, M., M. Bravo-Núñez y H. C. Arredondo-Bernal. 2019. Functional Response of *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) Fed with *Melanaphis sacchari* (Zehntner 1897) (Hemiptera: Aphididae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 121(2): 256-264.
- Peña-Martínez, R., A. I. Muñoz-Viveros, Ma. G. Ramos-Espinoza, y R. Terrón-Sierra. 2015. Listado de plantas hospedantes del complejo *Melanaphis sacchari/sorghii* (Hemiptera: Aphididae), registros internacionales y potenciales en México. *Entomol. Mex.* 2: 582 - 587.
- Rensburg, N. J. V. 1973. Notes on the occurrence and biology of the sorghum aphid in South Africa. *J. Entomol. Soc. South. Afr.* 36: 293 - 298.
- Rodríguez-Vélez, J. M., B. Rodríguez-Vélez, M. A. Sarmiento-Cordero, M. Palomares-Pérez, y H. C. Arredondo-Bernal. 2016. Species of coccinellidae (Coleoptera: Cucujoidea) associated with *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae) in Tamaulipas Mexico. *Entomol. News* 126: 97 - 105.
- Rodríguez, del B., L. A., and A. P. Terán. 2015. *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae): A new sorghum insect pest in Mexico. *Southw. Entomol.* 40: 433 - 434.
- Salas-Araiza, M. D., O. A. Martínez-Jaime, R. Guzmán-Mendoza, J. J. Guzmán-González, E. Salazar-Solis, y D. Sanzón-Gómez. 2017. Fluctuación poblacional del pulgón amarillo de la caña de azúcar *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae) en Irapuato, Guanajuato. *Entomol. Mex.* 4: 295 - 299.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2014. Pulgón amarillo *Melanaphis sacchari* (Zehntner). Ficha técnica No. 43. SAGARPA. www.senasica.gob.mx/?doc=27915
- Soto, J., y J. Iannacone. 2008. Efecto de dietas artificiales en la biología de adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Chrysopidae: Neuroptera). *Acta Zool. Mex. (nueva serie)* 24: 1 - 22.
- Vázquez-Navarro, J. M., B. Alicia Cisneros-Flores, y J. C. Carrillo-Aguilera, P. Román-Quiroz, y V. M. Almaráz-Valle. 2017. Estudio de seguimiento a una población de pulgón amarillo del sorgo *Melanaphis sacchari* (Zehntner, 1897) durante un año en un predio de la comarca lagunera, México. *Agrofaz* 17: 101-114.
- White, W. H., T. E. Reagan, and D. G. Hall. 2001. *Melanaphis sacchari* (Homoptera: Aphididae), a sugarcane pest new to Louisiana. *Fla. Entomol.* 84: 435 - 436.

COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA RELATIVA PARA LA ESTRATIFICACIÓN ÓPTIMA EN LA TIPOLOGÍA DE PRODUCTORES AGROPECUARIOS

COMPARISON OF RELATIVE EFFICIENCY FOR OPTIMAL STRATIFICATION IN THE AGRICULTURAL PRODUCERS TYPOLOGY

Juan Ruiz-Ramírez¹, Felipe Gallardo-López^{2*}, Gabriela E. Hernández-Rodríguez², Carlos M. Hernández-Suárez³, Pedro Cisneros-Saguilán⁴, Héctor Chalate-Molina²

¹Facultad de Economía, Universidad Veracruzana. Avenida Xalapa s/n, esquina Ávila Camacho. 91020. Xalapa, Veracruz, México. ²Agroecosistemas Tropicales. Campus Veracruz. Colegio de Postgraduados. Carretera Federal Xalapa-Veracruz Km 88.5, 91700. Veracruz, México. (felipegl@colpos.mx). ³Facultad de Ciencias, Universidad de Colima. Bernal Díaz del Castillo no. 340, Colonia Villas San Sebastián. 28045, Colima, México. ⁴Departamento de Ciencias Agropecuarias, Tecnológico Nacional de México, Pinotepa Nacional, Oaxaca, México.

RESUMEN

La tipología de productores es una de las técnicas más utilizadas en el diseño de programas diferenciados para el sector agropecuario, su éxito depende de la eficiencia para la estratificación óptima. El objetivo del presente estudio fue comparar las técnicas de Dalenius y Hodges y K-medias en términos de la eficiencia relativa para la estratificación óptima en la tipología de productores agropecuarios en México. La hipótesis fue que la técnica de Dalenius y Hodges es más eficiente que la de K-medias. La información de dos encuestas se analizó y contrastó; una de ellas aplicada a productores de malanga (*Arum esculentum* L.) y otra a ganaderos con bovinos de doble propósito. La información se capturó y analizó en el software Statística v. 7. Las variables analizadas fueron: superficie, producción, jornales, e ingresos por la venta de malanga o ganado. Tres estratos o grupos se formaron, y por componentes principales se estratificaron con el primer componente principal y el método de Dalenius y Hodges, el cual se contrastó con la técnica de K-medias, ubicada en el módulo del análisis de conglomerados, en la misma interfaz de Statística. Para la comparación de la eficiencia relativa de las variables, superficie sembrada de malanga y tamaño del rancho (ha), se utilizó el cociente de las varianzas de ambas técnicas de acuerdo con la fórmula de eficiencia relativa. Los resultados mostraron que ambas técnicas coincidieron en 87.5% en los productores de malanga y 91.6% en los productores con bovinos. Sin embargo la tipología obtenida por la técnica de Dalenius y Hodges es más eficiente que la del método de K-medias con análisis de conglomerados, debido a que minimiza la varianza entre estratos. Esta

ABSTRACT

The typology of producers is one of the most used techniques in the design of differentiated programs for the agricultural sector, its success depends on efficiency for optimal stratification. The objective of this study was to compare Dalenius and Hodges' techniques and K-means in terms of relative efficiency for optimal stratification in the typology of agricultural producers in Mexico. The hypothesis was that the technique of Dalenius and Hodges is more efficient than that of K-means. Information from two surveys was analyzed and contrasted; one of them applied to malanga (*Arum esculentum* L.) producers and the other one to cattle farmers with dual-purpose cattle. The information was captured and analyzed in the Statística v. 7 software. The variables analyzed were area, production, wages, and income from the sale of malanga or cattle. Three strata or groups were formed, and by main components were stratified with the first main component and the technique of Dalenius and Hodges, which was contrasted with the of K-means method, located in the module of cluster analysis, at the same Statística interface. For the comparison of the relative efficiency of the variables, the area sown with malanga and size of the ranch (ha), the ratio of the variances of both techniques was used according to the relative efficiency formula. Results showed that both techniques coincided 87.5% in malanga producers and 91.6% in producers with cattle. However, the typology obtained by the Dalenius and Hodges technique is more efficient than that of the K-means method with cluster analysis because it minimizes the variance among strata. This situation is similar to what happens when stratified sampling is used, from which the Dalenius and Hodges technique is derived, aiming to study heterogeneous populations.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 445-457. 2020.

situación es similar a lo que ocurre cuando se utiliza el muestreo estratificado, del cual proviene la técnica de Dalenius y Hodges para estudiar poblaciones heterogéneas.

Palabras clave: eficiencia relativa, tipología de productores, Dalenius y Hodges, K-medias, *Arum esculentum*, bovinos de doble propósito.

INTRODUCCIÓN

En México existe una heterogeneidad de formas en la organización de la producción del sector agropecuario, inclusive en la misma región, principalmente en las características físicas, socioeconómicas y técnicas (Ávila, 2017). Por consecuencia, productores heterogéneos de una misma zona geográfica, no deben tratarse como homogéneos y deben diseñarse políticas agropecuarias diferenciadas. Para ello, se deben utilizar métodos eficientes en la elaboración de las tipologías de productores agropecuarios que identifiquen potenciales y limitaciones (Reyes *et al.*, 2019), además que sean útiles en el diagnóstico de la heterogeneidad de los productores agropecuarios (Leos-Rodríguez *et al.*, 2008) con el propósito de proponer estrategias que mejoren el desarrollo de la agricultura y optimicen la asignación de recursos públicos (Borja *et al.*, 2018).

La identificación de grupos (tipos) con características similares, de acuerdo con Merma y Julca (2012), deberá encontrar varianza mínima dentro de los grupos y varianza mayor entre ellos. La tipología se utiliza en diversas situaciones, por ejemplo para tipificar y caracterizar sistemas de producción como el de malanga efectuado por Gallardo-López *et al.* (2017)⁵, o bien para tipificar productores agrícolas en función del número de jornadas salariales contratadas (CEPAL-SARH, 1981)⁶. Leos-Rodríguez *et al.*, (2008) señalaron que en el ámbito económico-agrícola, las investigaciones de estratificación se conocen como tipología de productores. En cambio, para determinar grupos homogéneos de explotaciones lecheras, Defante *et al.* (2019) la llamaron “sistemas productivos”.

Key words: relative efficiency, typology of producers, Dalenius and Hodges, K-means, *Arum esculentum*, dual-purpose cattle.

INTRODUCTION

In Mexico there is a heterogeneity of forms in the organization of production in the agricultural sector, even in the same region, mainly in the physical, socioeconomic, and technical characteristics (Ávila, 2017). Consequently, heterogeneous producers in the same geographical area should not be treated as homogeneous and differentiated agricultural policies should be designed. To this end, efficient methods must be used to develop typologies of agricultural producers that identify potentials and limitations (Reyes *et al.*, 2019), as well as being useful in diagnosing the heterogeneity of agricultural producers (Leos-Rodríguez *et al.*, 2008) in order to propose strategies that improve agriculture development optimizing the allocation of public resources (Borja *et al.*, 2018).

The identification of groups (types) with similar characteristics, according to Merma and Julca (2012), should find minimal variance within the groups and greater variance between them. The typology is used in various situations, for example, to typify and characterize production systems such as that of malanga carried out by Gallardo-López *et al.* (2017)⁵, or to typify agricultural producers according to the number of wage days contracted (CEPAL-SARH, 1981)⁶. Leos-Rodríguez *et al.*, (2008) pointed out that in the economic-agricultural field, stratification research is known as typology of producers. In contrast, to determine homogeneous groups of dairy farms, Defante *et al.* (2019) called it “productive systems”.

Villa *et al.* (1996) found that when stratifying with cluster analysis, Ward's algorithm (hierarchical type), mean value and centroid, are efficient for the estimation of rare or low-occurrence characteristics. While MacQueen's (1967) algorithm, known as K-means, which is of the non-hierarchical type, tends

⁵ Gallardo-López, F., H. Chalate-Molina, J. Acosta-Jimeno y V. Moreno-Figueroa. 2017. Tipología y caracterización de los sistemas de producción de malanga en los estados de Oaxaca, Tabasco y Veracruz. Reporte técnico del proyecto clave 265427 financiado por el Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. México. 46 p.

⁶ Comisión Económica para América Latina – Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1981. Tipos de productores agropecuarios. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos - Comisión del Plan Nacional Hidráulico. México. 116 p. https://www.inecc.gob.mx/repositorio/ae3/ae_333.91110972_m495_a-b.pdf

Villa *et al.* (1996) encontraron que al realizar una estratificación con análisis de conglomerados, el algoritmo de Ward (tipo jerárquico), valor medio y centroide, son eficientes para la estimación de características raras o de poca ocurrencia. Mientras que el de MacQueen (1967), conocido como K-medias, el cual es de tipo no jerárquico, tiende a minimizar la variación dentro de estratos, y se asume que maximiza la variación entre los L estratos.

Para realizar la tipología hay diversas propuestas y “han sido comparadas entre sí con base tanto en distribuciones teóricas como empíricas, ninguna de ellas es en todos los casos más eficiente que las demás” (Dallas *et al.*, 1976). Estos mismos autores señalaron que para la estratificación de una sola variable, la propuesta de Dalenius y Hodges (1959) llamada regla $\sqrt{f}$ (donde f es la frecuencia relativa) y la de Ekman (1959), resultaron satisfactorias en la mayoría de los casos, pero la primera es de aplicación más fácil.

Para realizar tipología de productores agropecuarios hay diversos métodos. Unos se centran en las características económicas y sociopolíticas del campesinado latinoamericano (Wolf, 1977), el grado de tecnificación agrícola (Sánchez y Malillos, 1998), el índice de apropiación de tecnología agrícola (Turiján-Altamirano *et al.*, 2015), agrupación por estratos normativos, superficie sembrada y nivel socioeconómico (Córdova, **2009**)⁷, tipo de agricultura familiar con potencial productivo (Yúnez *et al.*, **2013**)⁸ y tipología de acuerdo a la eficiencia energética en los agroecosistemas (Purroy *et al.*, 2016).

En las tipologías de productores se han utilizado métodos multivariados: 1) análisis factorial de correspondencias múltiples para la tipología entre países de América Latina y el Caribe con indicadores estructurales (CEPAL, **1981**)⁹; 2) análisis factorial para identificar 18 tipos de agricultura a nivel municipal (González, 1990); 3) método de Ward (Borja-Bravo *et al.*, 2016); 4) método de K-medias (Chalate-Molina *et al.*, 2010; Carrillo *et al.*, 2011; Vargas-Leitón *et*

to minimize variation within layers, and is assumed to maximize variation among L strata.

There are several proposals for typology and “they have been compared with each other based on both theoretical and empirical distributions, none of which is in all cases more efficient than the others” (Dallas *et al.*, 1976). These same authors pointed out that for the stratification of a single variable, the proposal of Dalenius and Hodges (1959) called the $\sqrt{f}$ rule (where f is the relative frequency) and that of Ekman (1959), were satisfactory in most cases, but the first is easier to apply.

There are several methods to obtain a typology of agricultural producers. Some focus on the economic and socio-political characteristics of the Latin American farming (Wolf, 1977), the degree of agricultural technification (Sánchez and Malillos, 1998), the index of appropriation of agricultural technology (Turiján-Altamirano *et al.*, 2015), grouping by regulatory strata, area sown and socioeconomic level (Córdova, 2009)⁷, type of family farming with productive potential (Yúnez *et al.*, 2013)⁸ and typology according to energy efficiency in agro-ecosystems (Purroy *et al.*, 2016).

Multivariate methods have been used in the typologies of producers: 1) multiple correspondence factor analysis for the typology between Latin American and Caribbean countries with structural indicators (CEPAL, 1981)⁹; 2) factor analysis to identify 18 types of agriculture at municipal level (González, 1990); 3) Ward's method (Borja-Bravo *et al.*, 2016); 4) K-means method (Chalate-Molina *et al.*, 2010; Carrillo *et al.*, 2011; Vargas-Leitón *et al.*, 2013); 5) principal component analysis, and the first principal component was applied the optimal stratification of Dalenius and Hodges (Díaz-Padilla *et al.*, 2012; Castellanos-Potenciano *et al.*, 2015).

One advantage of using the techniques of Dalenius and Hodges and the K-means method is that the first establishes a statistical methodology of

⁷Córdova Martínez, L. G. 2009. Tipología de productores agrícolas del estado de Veracruz. Informe de evaluación. Comité Técnico Estatal de Evaluación. Gobierno del estado de Veracruz. México. 79 p. <http://sagarpa.mx/Delegaciones/veracruz/Documents/Evaluaciones%20Externas/2009/2009%20-%20Tipologia%20de%20Productores%20Agr%C3%ADcola.pdf>

⁸Yúñez, N. A., Y. A. I. Cisneros y P. P. Meza. 2013. Situando la agricultura familiar en México. Principales características y tipología. Informe FAO. Editor-Centro Latinoamericano para el Desarrollo Rural (RIMISP). Santiago de Chile. 45 p. http://portalsiget.net/ArchivosSIGET/recursos/Archivos/1682015_AgriculturaFamiliarM.pdf

²CEPAL (Comisión Económica para América Latina). 1981. Economía campesina y agricultura empresarial: Tipología de productores del agro mexicano. Apéndices metodológicos y estadísticos. CEPAL. México, D.F. 1981. 122 p. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/25265>

al., 2013); 5) análisis de componentes principales, y al primer componente principal se le aplicó la estratificación óptima de Dalenius y Hodges (Díaz-Padilla *et al.*, 2012; Castellanos-Potenciano *et al.*, 2015).

Una ventaja al utilizar las técnicas de Dalenius y Hodges y el método de K-medias, es que la primera establece una metodología estadística de mejor calidad discriminatoria en la construcción de un indicador, como en el caso del estudio realizado por Chaves (2011). Mientras que para el método de K-medias, Betancourt *et al.* (2005) afirmaron que es relativamente eficiente respecto a la varianza dentro de cada grupo.

Villa *et al.* (1996) explicaron que entre los algoritmos de clasificación propuestos en la literatura, el de Ward (1963) de tipo jerárquico y el de MacQueen (1967) conocido como K-medias, de tipo no jerárquico, minimizan la variación total dentro de estratos o traza de U. Sin embargo, no existe una evaluación de la eficiencia de las técnicas de estratificación, utilizadas en la tipología de productores agropecuarios en México.

Gunning *et al.* (2004) compararon un método geométrico para formar grupos a través de la fórmula de eficiencia relativa con respecto a la técnica de Dalenius y Hodges (1959), y mostraron que ambos métodos tienen aproximadamente la misma eficiencia, lo cual ocurre cuando existe asimetría positiva en los datos de la población o poblaciones estudiadas. Así, el cálculo de la eficiencia relativa es útil para evaluar dos técnicas o métodos de agrupación usados en la tipología de productores agropecuarios.

Con base en lo anterior, se planteó la hipótesis de que con el uso de métodos multivariados, la técnica de Dalenius y Hodges (1959) es más eficiente que el método de K-medias en la elaboración de tipología de productores agropecuarios. El objetivo del estudio fue comparar las técnicas de Dalenius y Hodges y K-medias en términos de la eficiencia relativa para la estratificación óptima en la tipología de productores agropecuarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la eficiencia de la estratificación óptima se comparó la técnica de Dalenius y Hodges (1959) con la de K-medias, para obtener una tipología de productores agropecuarios. Para Merma y Julca (2012) “la tipología es el resultado de un análisis y de un razonamiento previo con base en observaciones de

better discriminatory quality in the construction of an indicator. This was the case of the study carried out by Chaves (2011). While for the K-means method, Betancourt *et al.* (2005) stated that it is relatively efficient regarding the variance within each group.

Villa *et al.* (1996) explained that among the classification algorithms proposed in the literature, Ward's (1963) hierarchical algorithm and MacQueen's (1967) non-hierarchical K-means algorithm, both minimize the total variation within strata or U-trace. However, there is no efficiency evaluation of the stratification techniques applied in the typology of agricultural producers in Mexico.

Gunning *et al.* (2004) compared a geometric method to form groups through the relative efficiency formula with respect to the technique of Dalenius and Hodges (1959), and showed that both methods have approximately the same efficiency, which occurs when there is positive asymmetry in the data of the population or populations studied. Thus, the calculation of relative efficiency is useful to evaluate two techniques or grouping methods used in the typology of agricultural producers.

Based on the above, it was hypothesized that with the use of multivariate methods, the technique of Dalenius and Hodges (1959) is more efficient than the K-means method in the elaboration of typology of agricultural producers. The objective of the study was to compare Dalenius and Hodges' techniques and K-means in terms of relative efficiency for optimal stratification in the typology of agricultural producers.

MATERIALS AND METHODS

In order to evaluate the efficiency of the optimal stratification, the technique of Dalenius and Hodges (1959) was compared with that of K-means, to obtain a typology of agricultural producers. According to Merma and Julca (2012) “the typology is the result of an analysis and previous reasoning based on field observations and interviews with farmers”. Thus, two surveys and their corresponding databases were used. The first survey was designed and applied by Gallardo-López *et al.* (2017) to producers of malanga (*Arum esculentum* L.) in the states of Oaxaca, Tabasco and Veracruz, Mexico. The second survey, by Cisneros-Saguilan *et al.* (2016), was applied to cattle farmers with dual-purpose cattle in the municipality of Santiago Pinotepa Nacional, Oaxaca, Mexico. In both cases the producer was the study unit.

campo y entrevistas con los agricultores”. Por ello, se utilizaron dos encuestas y sus bases de datos correspondientes. La primera encuesta diseñada y aplicada por Gallardo-López *et al.* (2017) a productores de malanga (*Arum esculentum* L.) en los estados de Oaxaca, Tabasco y Veracruz, México. La segunda, por Cisneros-Saguilán *et al.* (2016), a ganaderos con bovinos de doble propósito del municipio Santiago Pinotepa Nacional, Oaxaca, México. En ambos casos el productor fue la unidad de estudio.

Para realizar la tipología de productores del cultivo de malanga, Gallardo-López *et al.* (2017) utilizaron las variables superficie sembrada (ha), superficie con riego (%), número de jornales utilizados (por ha), producción para la venta (Mg), e ingresos por la venta de malanga (\$ MXN). Para la tipología de ganadería bovina de doble propósito, se consideró superficie del rancho (ha), tamaño del hato (número de bovinos) e ingresos por venta de leche y carne (\$ MXN), obtenidas en un estudio realizado de febrero a julio de 2013, mediante una encuesta aplicada a 155 ganaderos del municipio de Santiago Pinotepa Nacional, Oaxaca; todos ellos beneficiarios del programa de estímulos a la productividad ganadera (PROGAN) en 2010 (Cisneros-Saguilán *et al.*, 2016).

Las variables seleccionadas de las encuestas citadas fueron cinco para cada giro agropecuario (Cuadro 1). La información se organizó en dos bases de datos en el software Statistica v. 7 (StatSoft, Inc., 2004) para analizar y comparar los métodos de K-medias con el de Dalenius y Hodges (1959).

Para generar la estratificación óptima por medio de la técnica de Dalenius y Hodges, se realizó el análisis de componentes principales a las cinco variables del Cuadro 1 con el uso de una matriz de correlaciones y se seleccionó el primer componente principal (CP1) de acuerdo con lo propuesto por Díaz-Padilla *et al.* (2012), Castellanos-Potenciano *et al.* (2015) y D’Orazio y Catanese (2016). Esta técnica consistió en elaborar la tabla de frecuencias y de ella sólo se seleccionaron los intervalos de clase y sus frecuencias. Después se obtuvo la raíz cuadrada, y raíz cuadrada acumulada de la frecuencia [acum $\sqrt{f}$ (y)] (Gunning *et al.*, 2004). Kareem *et al.* (2015) indicaron que “para determinar los límites de los estratos al dividir la raíz cuadrada acumulada total

Gallardo-López *et al.* (2017), to carry out the typology of producers of malanga crop, used the variables area sown (ha), area with irrigation (%), wage quantity used (per ha), production for sale (Mg), and income from the sale of malanga (\$ MXN). For the typology of dual-purpose cattle farming, it was considered ranch area (ha), herd size (number of heads of livestock) and income from the sale of milk and meat (\$ MXN), obtained in a study conducted from February to July 2013, through a survey applied to 155 farmers in the municipality of Santiago Pinotepa Nacional, Oaxaca, Mexico; all of them beneficiaries of the program to stimulate livestock productivity (PROGAN) in 2010 (Cisneros-Saguilán *et al.*, 2016).

The variables selected from the surveys cited were five for each agricultural sector (Table 1). The information was organized in two databases in the Statistica v. 7 software (StatSoft, Inc., 2004) to analyze and compare the K-means methods with that of Dalenius and Hodges (1959).

In order to obtain the optimal stratification using the Dalenius and Hodges technique, the analysis of main components was performed on the five variables in Table 1 using a correlation matrix and the first main component (CP1) was selected as proposed by Díaz-Padilla *et al.* (2012), Castellanos-Potenciano *et al.* (2015) and D’Orazio and Catanese (2016). This technique consisted in elaborating the frequency table and from it only the class intervals and their frequencies were selected. Then the square root was obtained, and the accumulated square root of the frequency [acum $\sqrt{f}$ (y)] (Gunning *et al.*, 2004). Kareem *et al.* (2015) indicated that “to determine the limits of the strata by dividing the total accumulated square root of the frequency by the required number of L strata, the limit should be placed at this division point. This is an approximate solution by Dalenius and Hodges (1959) to the Dalenius (1950) equations”. The upper limit of each stratum according to Gunning *et al.* (2004), was determined with the following expression:

$$Q = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^j \sqrt{f_i} \quad (1)$$

Cuadro 1. Variables utilizadas para la tipología de productores de malanga (*Arum esculentum* L.) y de bovinos de doble propósito.
Table 1. Variables used for the typology of malanga producers (*Arum esculentum* L.) and dual-purpose cattle.

Sistema-producto	
Malanga	Ganado bovino con doble propósito
Superficie sembrada (ha)	Tamaño del rancho (ha)
Superficie con riego (%)	Número de jornales mes ⁻¹
Total de jornales generados por ciclo productivo	Producción anual de leche (L)
Producción para la venta (Mg)	Producción anual becerro en pie (Mg)
Ingresos por la venta de malanga (miles de pesos)	Ingreso total del rancho (miles de pesos)

de la frecuencia por el número requerido de estratos L , el límite se debe colocar en este punto de división. Esta es una solución aproximada de Dalenius y Hodges (1959) a las ecuaciones de Dalenius (1950)¹⁰. El límite superior de cada estrato de acuerdo con Gunning *et al.* (2004), se determinó con la expresión siguiente:

$$Q = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^J \sqrt{f_i} \quad (1)$$

El límite superior de cada estrato, está dado por $Q, 2Q, \dots, (L-1)Q, LQ$;

donde J = número de intervalos de clase; Q es el valor del límite superior del primer estrato obtenido por la técnica de Dalenius y Hodges; L es el número de estratos que se quieren formar; $i=1, 2, \dots, J$

Los grupos o estratos de productores que se usan en una tipología son tres (Merma y Julca, 2012; Castellanos-Potenciano *et al.*, 2015; Borja *et al.*, 2018), cuatro (CEPAL, 1981)¹⁰ o cinco (Sánchez y Malillos, 1998; Chalate-Molina *et al.*, 2010) y debido a que la técnica de Dalenius y Hodges y el método de K-medias requieren que se indique el número de estratos a formar, se consideraron tres. Este número se seleccionó porque Gunning *et al.* (2004) y Er (2012) encontraron que cuando se compara la eficiencia relativa de la técnica de Dalenius y Hodges con respecto al método de estratificación geométrica, al incrementar el número de estratos la eficiencia del método mantiene en lo general el resultado de la evaluación.

Para comparar la eficiencia de la estratificación realizada mediante la técnica de Dalenius y Hodges con respecto a la obtenida por el método de K-medias, se utilizó la fórmula usada por Gunning *et al.* (2004) para calcular la eficiencia relativa (ER) del cociente de las varianzas de ambas técnicas, la cual está dada por la siguiente ecuación:

$$ER = \frac{V_{DH}(\bar{X}st)}{V_{K-medias}(\bar{X}st)} \times 100 \quad (2)$$

Como la población se considera finita, no se utiliza el factor de corrección y la varianza de la media estratificada ($\bar{X}st$) bajo la asignación proporcional (Dalenius y Hodges, 1959; Er, 2012), está dada por: 1

$$V_{DH}(\bar{X}st) = \left[\sum_{i=1}^L W_i S_{i,DH}^2(\bar{X}st)_i \right] / n \quad (3)$$

The upper limit of each stratum is given by $Q, 2Q, \dots, (L-1)Q, LQ$;

where J = number of class intervals; Q is the value of the upper limit of the first stratum obtained through the Dalenius and Hodges technique; L is the number of strata intended to be formed; $i=1, 2, \dots, J$

The groups or strata of producers used in a typology are three (Merma and Julca, 2012; Castellanos-Potenciano *et al.*, 2015; Borja *et al.*, 2018), four (CEPAL, 1981)¹⁰ or five (Sánchez and Malillos, 1998; Chalate-Molina *et al.*, 2010) and because the Dalenius and Hodges technique and the K-means method require to indicate the number of strata to be formed, three were considered. This number was selected because Gunning *et al.* (2004) and Er (2012) found that when comparing the relative efficiency of the Dalenius and Hodges technique to the geometric stratification method, when the number of strata is increased the efficiency of the method generally maintains the evaluation result.

In order to compare the efficiency of the stratification performed by the Dalenius and Hodges technique with that obtained by the K-means method, the formula used by Gunning *et al.* (2004) was applied to calculate the relative efficiency (RE) of the variance ratio of both techniques, which is given by the following equation:

$$ER = \frac{V_{DH}(\bar{X}st)}{V_{K-medias}(\bar{X}st)} \times 100 \quad (2)$$

As the population is considered to be finite, the correction factor is not used and the variance of the stratified mean ($\bar{X}st$) under proportional allocation (Dalenius and Hodges, 1959; Er, 2012), is given by

$$V_{DH}(\bar{X}st) = \left[\sum_{i=1}^L W_i S_{i,DH}^2(\bar{X}st)_i \right] / n \quad (3)$$

$$V_{K-medias}(\bar{X}st) = \left[\sum_{j=1}^L W_j S_{j,K-medias}^2(\bar{X}st)_j \right] / n \quad (4)$$

where L is the number of strata; n is the sample size in stratum i, j .

$W_j = n_j/n$; from the Dalenius and Hodges method and is changed to subscript j when the K-means method is used. n_j is the sample size in stratum j and n is the total sample size.

¹⁰CEPAL (Comisión Económica para América Latina). 1981. Economía campesina y agricultura empresarial: Tipología de productores del agro mexicano. Apéndices metodológicos y estadísticos. CEPAL. México, D.F. 1981. 122 p. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/25265>

$$V_{K-medias}(\bar{X}st) = \left[\sum_{j=1}^L W_j S_{j,K-medias}^2(\bar{X}st)_j \right] / n \quad (4)$$

donde L es el número de estratos; n es el tamaño de muestra en el estrato i, j .

$W_j = n_j/n$; del método Dalenius y Hodges y se cambia al subíndice j cuando se trata del método K-medias. n_j es el tamaño de muestra del estrato j y n es el tamaño de muestra total.

$V_{DH}(\bar{X}st)_i$ = varianza del estrato i (S^2) obtenido por el método de Dalenius y Hodges.

$Var_{K-medias}(\bar{X}st)_j$ = varianza del estrato j (S^2) obtenido por el método de K-medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar la cantidad de productores clasificados en los mismos estratos obtenidos por la técnica de Dalenius y Hodges y con K-medias, coincidieron en 87.5% los productores de malanga y en 91.6%, los productores con bovinos de doble propósito. El comportamiento de la variable superficie (ha) fue similar (Figuras 1 y 2).

$V_{DH}(\bar{X}st)_i$ = variance of the stratum i (S^2) obtained by the Dalenius and Hodges' method.

$Var_{K-medias}(\bar{X}st)_j$ = variance of the stratum j (S^2) obtained by the K-means method.

RESULTS AND DISCUSSION

When comparing the number of producers classified in the same strata obtained by the technique of Dalenius and Hodges and with K-means, it coincided 87.5% in producers of malanga and 91.6% in the producers with dual-purpose cattle. The behavior of the variable area (ha) was similar (Figures 1 and 2).

The new strata of malanga producers (Table 1) and dual-purpose cattle producers (Table 2) were obtained by dividing the square root of the producer frequencies by three, considering the class intervals of the first main component (CP1).

The analysis of the malanga producer typology data (Table 4) describes the variability between strata (CV) and the variance used in the calculation of relative efficiency.

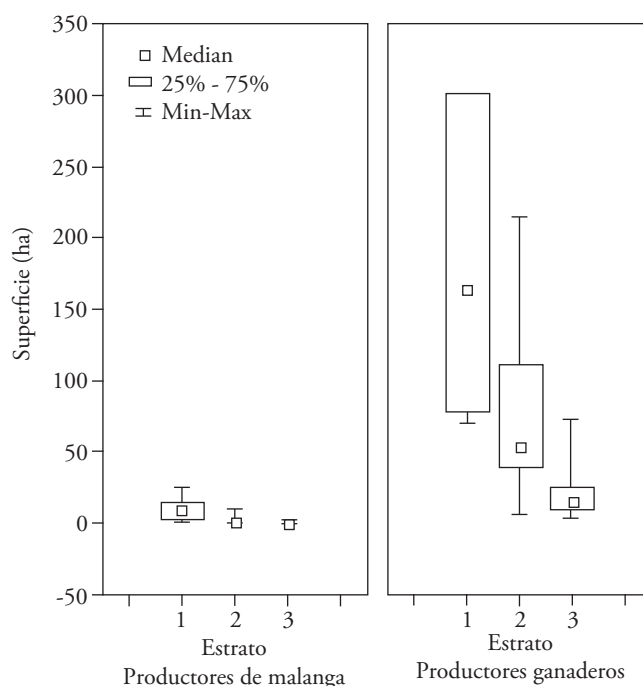


Figura 1. Comportamiento de los estratos generados por la técnica de Dalenius y Hodges para las variables superficie sembrada con malanga (*Arum esculentum* L.) y superficie dedicada a la ganadería de doble propósito.

Figure 1. Behavior of the strata generated by the Dalenius and Hodges technique for the variables area sown with malanga (*Arum esculentum* L.) and area dedicated to dual-purpose livestock.

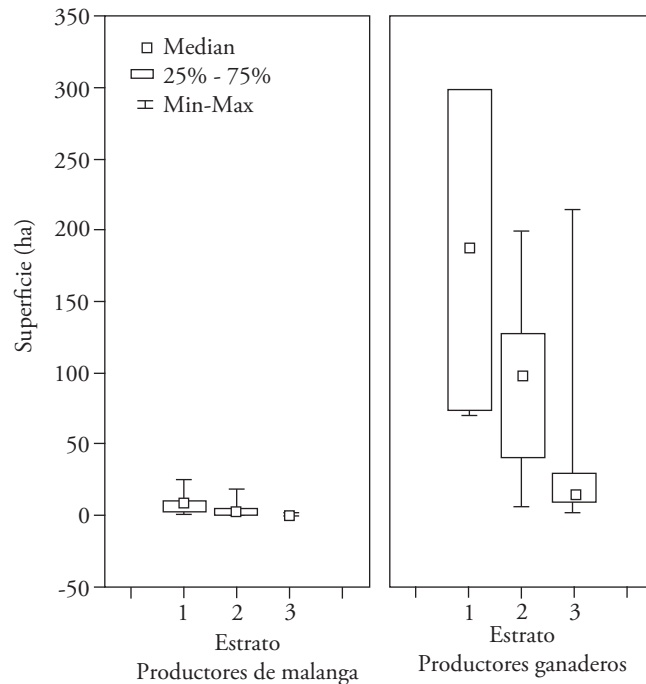


Figura 2. Comportamiento de los estratos generados por el método de K-medias para las variables superficie sembrada con malanga (*Arum esculentum* L.) y superficie dedicada a la ganadería de doble propósito.

Figure 2. Behavior of the strata generated by the K-means method for the variables area sown with malanga (*Arum esculentum* L.) and area dedicated to dual-purpose livestock.

Los nuevos estratos de productores de malanga (Cuadro 1) y productores con bovinos de doble propósito (Cuadro 2) se obtuvieron al dividir entre tres la raíz cuadrada de las frecuencias de productores, para considerar los intervalos de clase del primer componente principal (CP1).

The relative efficiency of the stratification methods by Dalenius and Hodges (1959) and K-means, for the variable area sown with malanga (ha), was calculated with the following equation:

$$ER = \frac{V_{DH}(\bar{X}_{st})}{V_{K-medias}(\bar{X}_{st})} \times 100 = \frac{0.16940}{0.26747} \times 100 = 63.33\% \quad (5)$$

Cuadro 2. Tipología de productores de malanga (*Arum esculentum* L.) de los estados de Oaxaca, Tabasco y Veracruz, por medio de la técnica de Dalenius y Hodges en la variable CP1.

Table 2. Typology of malanga (*Arum esculentum* L.) producers in the states of Oaxaca, Tabasco and Veracruz, Mexico; using the technique of Dalenius and Hodges in the variable CP1.

Intervalo de clase	Frecuencia de productores	Raíz (frecuencia)	Raíz acumulada (frecuencia)	Grupo nuevo
$-4 < x \leq -3$	3	1.7321	1.7321	1
$-3 < x \leq -2$	6	2.4495	4.1815	1
$-2 < x \leq -1$	12	3.4641	7.6456	2
$-1 < x \leq 0$	8	2.8284	10.4741	2
$0 < x \leq 1$	10	3.1623	13.6363	2
$1 < x \leq 2$	13	3.6056	17.2419	3
$2 < x \leq 3$	12	3.4641	20.7060	3

Cuadro 3. Tipología de productores de bovinos de doble propósito del municipio Santiago Pinotepa Nacional, Oaxaca, México; por medio de la técnica de Dalenius y Hodges en la variable CP1.

Table 3. Typology of dual-purpose cattle producers in the municipality of Santiago Pinotepa Nacional, Oaxaca, Mexico; using the technique of Dalenius and Hodges in the variable CP1.

Intervalo de clase	Frecuencia de productores	Raíz (frecuencia)	Raíz acumulada (frecuencia)	Grupo nuevo
-7<x<=-6	1	1	1	1
-6<x<=-5	1	1	2	1
-5<x<=-4	1	1	3	1
-4<x<=-3	1	1	4	1
-3<x<=-2	2	1.4142	5.4142	1
-2<x<=-1	7	2.6458	8.0599	2
-1 <x<= 0	15	3.8730	11.9329	2
0 <x<= 1	127	11.2694	23.2024	3

Con el análisis de los datos de la tipología de productores de malanga (Cuadro 4) se describe la variabilidad entre estratos (CV_i) y la varianza usada en el cálculo de la eficiencia relativa.

La eficiencia relativa de los métodos de estratificación de Dalenius y Hodges (1959) y K-medias, para la variable superficie sembrada de malanga (ha), se calculó con la ecuación siguiente:

$$ER = \frac{V_{DH}(\bar{X}st)}{V_{K-medias}(\bar{X}st)} \times 100 = \frac{0.16940}{0.26747} \times 100 = 63.33\% \quad (5)$$

From the reason obtained, it can be deduced that the technique of Dalenius and Hodges was 36.67% more efficient than the K-means method to carry out the typology of malanga cultivation producers in the states of Oaxaca, Tabasco and Veracruz. This was complemented by the coefficients of variation, which in strata 1 and 2 were also lower with the technique of Dalenius and Hodges.

Then, variances were calculated with both methods for the variable ranch size, in dual-purpose cattle units (Table 5).

Cuadro 4. Estadística descriptiva de la superficie sembrada de malanga (*Arum esculentum* L.) (ha), obtenidas para cada estrato por la técnica de Dalenius y Hodges y por el método de K-medias.

Table 4. Descriptive statistics of the area sown with malanga (*Arum esculentum* L.) (ha), obtained for each stratum using the Dalenius and Hodges technique and the K-means method.

Estrato	$n_i^\dagger$	$W_i = n_i/n$	Media	Varianza	W_i (Varianza)	CV_i
Dalenius y Hodges						
1	9	0.1406	10.2222	67.4452	9.4845	0.80
2	30	0.4688	2.5417	2.8284	1.3258	1.11
3	25	0.3906	0.1531	0.0805	0.0314	1.85
n =	64			$V_{DH}(\bar{X}st) =$	0.1694	
K-medias						
1	5	0.0781	9.6000	92.3000	7.2109	1.00
2	30	0.4688	3.9333	21.0299	9.8578	1.17
3	29	0.4531	0.2096	0.1091	0.0495	1.58
n =	64			$V_{KM}(\bar{X}st) =$	0.2675	

† Datos en la encuesta a productores de malanga, para el análisis de la tipología ♦ Data in the survey applied to malanga producers for the typology analysis.

De la razón obtenida se colige que la técnica de Dalenius y Hodges fue 36.67% más eficiente que el método de K-medias para realizar la tipología de productores del cultivo de malanga de los estados de Oaxaca, Tabasco y Veracruz. Esto se complementó con los coeficientes de variación, que en los estratos 1 y 2 también fueron menores con la técnica de Dalenius y Hodges.

Luego, las varianzas se calcularon con ambos métodos para la variable tamaño del rancho, en las unidades de bovinos de doble propósito (Cuadro 5).

Para el cálculo de la eficiencia relativa de los métodos de estratificación de Dalenius y Hodges y K-medias con la variable tamaño del rancho (ha), se obtuvo lo siguiente:

$$ER = \frac{V_{DH}(\bar{X}_{st})}{V_{K-medias}(\bar{X}_{st})} \times 100 = \frac{6.05056}{8.35487} \times 100 = 72.42\%$$

Por lo tanto, la técnica de Dalenius y Hodges fue 27.58% más eficiente que el método de K-medias en la variable tamaño del rancho (ha), para la estratificación de productores de bovinos de doble propósito del municipio Santiago Pinotepa Nacional, Oaxaca.

De acuerdo con D'Orazio y Catanese (2016) quienes señalaron como variables para estratificar información geográfica, el tipo de cultivar y algunas medidas del tamaño de las granjas; en esta investigación se usaron la superficie sembrada de malanga (ha) y el tamaño del rancho (ha). Los resultados mostraron que en la elaboración de la tipología de

For the calculation of the relative efficiency of the Dalenius and Hodges and K-means stratification methods with the variable ranch size (ha), the following was obtained:

$$ER = \frac{V_{DH}(\bar{X}_{st})}{V_{K-medias}(\bar{X}_{st})} \times 100 = \frac{6.05056}{8.35487} \times 100 = 72.42\%$$

Therefore, the Dalenius and Hodges technique was 27.58% more efficient than the K-media method in the variable ranch size (ha), for the stratification of dual-purpose cattle producers in the municipality of Santiago Pinotepa Nacional, Oaxaca.

According to D'Orazio and Catanese (2016) who pointed out as variables to stratify geographic information the type of crop and some measures of the size of the farms; in this research the area planted with malanga (ha) and the size of the ranch (ha) were used. The results showed that in the elaboration of the typology of producers, the same relative efficiency was not obtained for malanga and dual-purpose cattle producers. Ward (1963) indicated that a hierarchical arrangement is not always necessary for best group partitioning, although it is preferable in many practical situations; and MacQueen (1967) mentioned that there is no general feasible method that will always produce optimal partitioning for forming the K groups of the N element population.

There are no studies that evaluate the efficiency of stratification methods to perform the typology of agricultural producers, and it is very difficult to

Cuadro 5. Estadística descriptiva de la variable tamaño del rancho (ha), obtenida por método de estratificación y por estrato, de la encuesta a productores de bovinos con doble propósito.

Table 5. Descriptive statistics of the variable ranch size (ha), obtained by stratification method and by stratum, from the survey of producers with dual-purpose cattle.

Estrato	n_i	$W_i = n_i/n$	Media	Varianza	W_i (Varianza)	CV_i
Dalenius y Hodges						
1	6	0.0387	179.1667	10921.7758	422.7710	0.58
2	22	0.1419	75.7273	2657.4437	377.1869	0.68
3	127	0.8194	19.2240	168.2772	137.8788	0.68
n =	155			$V_{DH}(\bar{X}_{st}) =$	6.0506	
K-medias						
1	4	0.0258	186.7500	17108.9278	441.5301	0.70
2	13	0.0839	87.3846	3307.7567	277.4249	0.66
3	138	0.8903	23.9091	647.0120	576.0496	1.06
n =	155			$V_{KM}(\bar{X}_{st}) =$	8.3549	

productores no se obtuvo la misma eficiencia relativa para los productores de malanga y los de bovinos con doble propósito. Ward (1963) indicó que un arreglo jerárquico no siempre es necesario para la mejor partición en grupos, aunque es preferible en muchas situaciones prácticas; y MacQueen (1967) mencionó que no existe un método general factible que siempre produzca una partición óptima para formar los K grupos de la población de N elementos.

No hay estudios que evalúen la eficiencia de los métodos de estratificación para realizar la tipología de productores agropecuarios, y es muy difícil encontrar los límites de los estratos, los que a su vez deben minimizar la varianza de las medias de los estratos obtenidos por el método de Dalenius y Hodges (Er, 2012). El mismo autor comparó la estratificación con el cálculo de la eficiencia relativa de los métodos de Lavallée e Hidiroglou (1988) y Kozak (2004), con poblaciones heterogéneas, datos extremos, valores de desviación estándar altos, media aritmética, coeficiente de asimetría y kurtosis. La eficiencia relativa menor al 100% se debe a que por lo común el procedimiento de K-medias no converge en una partición óptima al realizar K grupos de una población de dimensión N (MacQueen, 1967), pero la técnica de Dalenius y Hodges (1959) fue más eficiente.

En métodos de estratificación con poblaciones sesgadas (asimetría positiva) y comparados con la estratificación geométrica, Gunning *et al.* (2004) encontraron que la eficiencia relativa de este método con respecto al de Dalenius y Hodges (1959) fue similar. Sin embargo, Lavallée y Hidiroglou (1988) indicaron que “cuando las poblaciones son altamente sesgadas, el método de Dalenius y Hodges no es realista para calcular los límites de los estratos”, y el método que recomiendan es el algoritmo, que es una combinación de los procedimientos de Hidiroglou (1986).

Lavallée y Hidiroglou (1988) utilizaron tres poblaciones con coeficiente de asimetría de 24.2 (Población I), 6.5 (Población 2) y 13.6 (Población 3). En cambio, los coeficientes de asimetría de nuestro estudio para la encuesta a productores de malanga fue 2.7, y para productores con bovinos de doble propósito fue 3.7; es decir mucho menores a los ejemplos de poblaciones altamente sesgadas. D’Orazio y Catanese (2016) indicaron que las variables utilizadas

find the limits of the strata, which in turn should minimize the variance of the means of the strata obtained by the method of Dalenius and Hodges (Er, 2012). The same author compared stratification with the calculation of relative efficiency of the Lavallée and Hidiroglou (1988) and Kozak (2004) methods, with heterogeneous populations, extreme data, high standard deviation values, arithmetic mean, asymmetry coefficient and kurtosis. A relative efficiency lesser than 100% is due to the fact that the K-means procedure does not usually converge into an optimal partition when performing K groups of an N dimension population (MacQueen, 1967), but the technique of Dalenius and Hodges (1959) was more efficient.

In stratification methods with biased populations (positive asymmetry) and compared with geometric stratification, Gunning *et al.* (2004) found that the relative efficiency of this method in relation to that of Dalenius and Hodges (1959) was similar. However, Lavallée and Hidiroglou (1988) indicated that “when populations are highly skewed, the method of Dalenius and Hodges is not realistic for calculating the limits of the strata”, and the method they recommend is the algorithm, which is a combination of the procedures of Hidiroglou (1986).

Lavallée and Hidiroglou (1988) used three populations with asymmetry coefficients of 24.2 (Population I), 6.5 (Population 2) and 13.6 (Population 3). In contrast, the asymmetry coefficients of our study for the survey of malanga producers was 2.7, and for producers with dual-purpose cattle it was 3.7; that is, much lower than the examples of highly biased populations. D’Orazio and Catanese (2016) indicated that the variables used in the stratification in business and agriculture present a high asymmetry coefficient.

Finally, this agrees with Leos-Rodríguez *et al.* (2008), who mentioned that “a study of stratification of the population in the rural sector can be an instrument for planning, operating, monitoring and evaluating government programs, and at the same time can allow for better targeting of programs and their components”. With this, it is possible to increase the impact of the support provided, by means of the granting of differentiated support, according to the needs of producers in each stratum.

para la estratificación en negocios y agricultura presentan un coeficiente de asimetría alto.

Finalmente, se coincide con Leos-Rodríguez *et al.* (2008), quienes mencionaron que “un estudio de estratificación de la población del sector rural puede ser un instrumento de planeación, operación, seguimiento y evaluación de los programas gubernamentales, y al mismo tiempo puede permitir focalizar de mejor manera los programas y sus componentes”. Con esto se logra incrementar los impactos de los apoyos brindados, por medio del otorgamiento de apoyos diferenciados, según las necesidades de los productores en cada uno de los estratos.

CONCLUSIONES

La tipología de productores obtenida por la técnica de Dalenius y Hodges fue más eficiente que la del método de K-medias del análisis de conglomerados, debido a que minimizó la varianza entre estratos de productores de malanga y también, de ganaderos con bovinos de doble propósito.

Esta situación es similar a lo que ocurre cuando se aplica el muestreo estratificado, origen de la estratificación con la técnica de Dalenius y Hodges para estudiar poblaciones heterogéneas.

LITERATURA CITADA

- Ávila-Foucat, V. S. 2017. Desafíos del sector primario y políticas públicas sustentables. *Economía Informa* 402: 29-39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecin.2017.01.003>
- Betancourt, K., M. Ibrahim, C. Villanueva, y B. Vargas. 2005. Caracterización del manejo productivo de sistemas lecheros en la cuenca del río Bulbul de Matiguás, Matagalpa, Nicaragua. *Livestock Res. Rural Develop.* 17: 1-12. <http://www.lrrd.org/lrrd17/7/beta17080.htm>
- Borja B., M., I. A. Vélez, y G. J. L. Ramos. 2018. Tipología y diferenciación de productores de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Calvillo, Aguascalientes, México. *Región y Sociedad* 30: 1-22. <https://doi.org/10.22198/rys.2018.71.a402>
- Borja-Bravo, M., L. Reyes-Muro, J. A. García-Salazar, y S. X. Almeraya-Quintero. 2016. Tipología de productores de uva (*Vitis vinifera* L.) en Aguascalientes, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7: 249-261. <https://doi.org/10.29312/remex-ca.v7i2.341>
- Carrillo, L. B., L. V. H. Moreira, y V. J. González. 2011. Caracterización y tipificación de sistemas productivos de leche en la zona centro-sur de Chile: un análisis multivariable. *IDESIA (Arica)* 29: 71-81. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292011000100010
- Castellanos-Potenciano, B., F. Gallardo-López, G. Díaz-Padilla, A. Pérez-Vázquez, C. Landeros-Sánchez, and A. Sol-Sánchez. 2015. Apiculture in the humid tropics: Socio-economic

CONCLUSIONS

The typology of producers obtained by the Dalenius and Hodges technique was more efficient than that of the K-means method of cluster analysis, because it minimized the variance among strata of malanga producers and also, of dual-purpose cattle breeders.

This situation is similar to what happens when stratified sampling is applied, which is the origin of the stratification with the Dalenius and Hodges technique to study heterogeneous populations.

—End of the English version—



- stratification and beekeeper production technology along the Gulf of Mexico. *Glob. Sci. Res. J.* 3: 321-329. <https://www.globalscienceresearchjournals.org/gjaerd/255702015992>
- CEPAL (Comisión Económica para América Latina). 1982. Economía campesina y agricultura empresarial: Tipología de productores del agro mexicano. CEPAL. México, D.F. 1981. 122 p. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/25265>
- CEPAL-SARH. 1981. Tipos de productores agropecuarios. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos - Comisión del Plan Nacional Hidráulico. México. 116 pp. https://www.inecc.gob.mx/repositorio/ae3/ae_333.91110972_m495_a-b.pdf
- Chalate-Molina, H., F. Gallardo-López, P. Pérez-Hernández, F. P. Lang-Ovalle, E. Ortega-Jiménez, y J. Vilaboa-Arroniz. 2010. Características del sistema de producción bovinos de doble propósito en el estado de Morelos, México. *Zootec. Trop.* 28: 329-339. www.bioline.org.br/pdf/zt10033
- Chaves, J. R. 2011. Determinación de áreas potenciales para promocionar el periódico Semanario. *Rev. Geográfica América Central.* 2: 1-15. <http://www.redalyc.org/pdf/4517/451744820800.pdf>
- Cisneros-Saguilán, P., F. Gallardo-López, S. López-Ortiz, O. Ruiz-Rosado, J. G. Herrera-Haro, y E. Hernández-Castro. 2016. Cumplimiento de la norma para ganadería sostenible en diversos ranchos de la costa de Oaxaca. In: Gallardo-López F. (ed). *Innovando el Agro Veracruzano 2016 - Frente a los retos de la relación Sociedad-Naturaleza*. Colegio de Postgraduados. Veracruz, México. Pp: 765-790.
- Córdova M., L. G. 2009. Tipología de productores agrícolas del estado de Veracruz. SAGARPA. Veracruz, México. 79 p. <http://sagarpa.mx/Delegaciones/veracruz/Documents/Evaluaciones%20Externas/2009/2009%20-%20Tipologia%20de%20Productores%20Agr%C3%ADcola.pdf>
- Dalenius, T. 1950. The problem of optimum stratification. *Scandinavian Actuarial J.* 3-4: 203-13. <https://doi.org/10.1080/03461238.1950.10432042>

- Dalenius, T., and J. L. Hodges. 1959. Minimum variance stratification. *J. Am. Stat. Assoc.* 54: 88-101. doi: 10.2307/2282141
- Dallas, W. A., L. Kish, and R. G. Cornell. 1976. Quantifying gains from stratification for optimum and approximately optimum strata using a bivariate normal model. *J. Am. Stat. Assoc.* 71: 887-892. doi: 10.1080/01621459.1976.10480964
- D'Orazio, M., and E. Catanese. 2016. A simple approach for stratification of units in multipurpose in business and agriculture surveys. *Istat Working Papers*. Istituto Nazionale di Statistica. Roma, Italia. 18 p. <https://www.istat.it/it/archivio/185685>
- Defante, L., J. C., Damasceno, F. I., Bánkuti, and C. E. C. O. Ramos. 2019. Typology of dairy production systems that meet Brazilian standards for milk quality. *Rev. Bras. Zootec.* 48: 1-8. <https://dx.doi.org/10.1590/rbz4820180023>
- Díaz-Padilla, G., I. Sánchez-Cohen, R. A. Guajardo P., F. Barbosa-Moreno, M. Gómez C., y J. M. Uribe B. 2012. Modelación espacial de la producción de agua y escurrimiento superficial del agua de lluvia en la zona sur del estado de Puebla, México. *Tecnol. Cienc. Agua.* 3: 69-85. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=353531980005>
- Ekman, G. 1959. An approximation useful in univariate stratification. *Ann. Mathem. Stat.* 30: 219-229. doi:10.1214/aoms/1177706377
- Er, S. 2012. Comparison of the efficiency of the various algorithms in stratified sampling when the initial solutions are determined with geometric method. *Int. J. Stat. Applic.* 2: 1-10. doi: 10.5923/j.statistics.20120201.01
- Gallardo-López, F., H. Chalate-Molina, J. Acosta-Jimeno, y V. Moreno-Figueroa. 2017. Tipología y caracterización de los sistemas de producción de malanga en los estados de Oaxaca, Tabasco y Veracruz. Reporte técnico del proyecto clave 265427 financiado por el Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. México. 46 p.
- González, E. A. 1990. Los tipos de agricultura y las regiones agrícolas de México. Editorial Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 140 p. <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000007239>
- Gunning, P., J. M. Horgan and, W. Yancey. 2004. Geometric stratification of accounting data. *Contaduría y Administración.* 214: 0. http://www.redalyc.org/pdf/395/Resumenes/Abstract_39521402_2.pdf
- Hidirolou, M. A. 1986. The construction of a self-representing stratum of large units in survey design. *Am. Stat.* 40: 27-31. <https://www.jstor.org/stable/2683113>
- Kareem, A. O., G. M. Oyeyemi, and A. B. Aiyelabegan. 2015. A note on the efficiency of geographic Sstratification. *Int. J. Math. Stat. Invention.* 3: 1-10. <https://www.ijmsi.org/Papers/Volume.3.Issue.4/A03401010.pdf>
- Kozak, M. 2004. Optimal stratification using random search method in agricultural surveys. *Stat. Transition.* 6: 797-806. <https://pdfs.semanticscholar.org/3559/96951658d08596a44a63a36643b87937eec9.pdf>
- Lavallée, P., y M. A. Hidirolou. 1988. On the stratification of skewed populations. *Survey methodology.* 14: 33-43. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/en/catalogue/12-001-X198800114602>
- Leos-Rodríguez, J. A., A. Serrano-Páez, J. M. Salas-González, P. P. Ramírez-Moreno, y M. Sagarnaga-Villegas. 2008. Caracterización de ganaderos y unidades de producción pecuaria beneficiarios del programa de estímulos a la productividad ganadera (PROGAN) en México. *Agric. Soc. Desarrollo.* 5: 214-230. www.redalyc.org/articulo.oa?id=360533080005
- MacQueen, J. 1967. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In: Cam, L., and J. Neyman (eds). *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Volume 1: Theory of Statistics.* University of California Press. Berkeley, LA, USA. pp: 281-297.
- Merma, I., y A. Julca. 2012. Tipología de productores y sostenibilidad de cultivos en Alto Urubamba, La Convención-Cusco. *Scientia Agropecuaria.* 3: 149-159. <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/79>
- Purroy-Vásquez, R., F. Gallardo-López, P. Díaz-Rivera, E. Ortega-Jiménez, S. López-Ortiz, y G. Torres-Hernández. 2016. Flujo energético-económico como herramienta para tipificar agroecosistemas en el centro del estado de Veracruz, México. *Ecosist. Recursos Agropec.* 3: 91-101. <http://era.ujat.mx/index.php/rera/article/view/730>
- Reyes, V. C., B. I. S., Toledano, M. B., Bravo, A. E., García, M. S., Montes, A. I. B., Rodríguez, y M. J. S., García. 2019. Caracterización de la producción de maguey en el Distrito de Miahuatlán, Oaxaca. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 10: 365-377. <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/v10n2-012>
- Sánchez, S., y R. Malillos. 1998. Diseño de una tipología agrícola y su aplicación al caso de la agricultura morelense. *Geografía y Desarrollo.* 16: 5-26. <https://biblat.unam.mx/es/revista/geografia-y-desarrollo/articulo/disenio-de-una-tipologia-agricola-y-su-aplicacion-al-caso-de-la-agricultura-morelense>
- StatSoft, Inc. 2004. *Statistica (data analysis software system) version 7.* StatSoft Inc.: Tulsa, OK, USA.
- Turiján-Altamirano, T., B., Ramírez-Valverde, M. Á., Damián-Huato, J. P., Juárez-Sánchez, y N., Estrella-Chulím. 2015. Uso de remesas para la adquisición de tecnología agrícola en maíz en San José Chiapa, Puebla, México. *Nova scientia.* 7: 674-693. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052015000200674
- Vargas-Leitón, B., O. Solís-Guzmán, F. Sáenz-Segura, y H. León-Hidalgo. 2013. Caracterización y clasificación de hatos lecheros en Costa Rica mediante análisis multivariado. *Agron. Mesoam.* 24: 257-275. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v24n02_257.pdf
- Villa P., A., L. Iglesias M., y L. A. Flores. 1996. Estratificación multivariante: Criterios de evaluación. *Estadística Española.* 38: 19-35. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6639>
- Ward Jr., J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58: 236-244. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1963.10500845>
- Wolf, E. R. 1977. Una tipología del campesinado latinoamericano. Colombres C., G. (tr). e I. Garreta M. (cotr). Editor Nueva Visión. Buenos Aires, Argentina. 100 p. <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000001148>
- Yúnez, N. A., Y. A. I. Cisneros, y P. P. Meza. 2013. Situando la agricultura familiar en México. Principales características y tipología. Informe FAO. Editor-Centro Latinoamericano para el Desarrollo Rural (RIMISP). Santiago de Chile. 45 p. http://portalsiget.net/ArchivosSIGET/recursos/Archivos/1682015_AgriculturaFamiliarM.pdf

