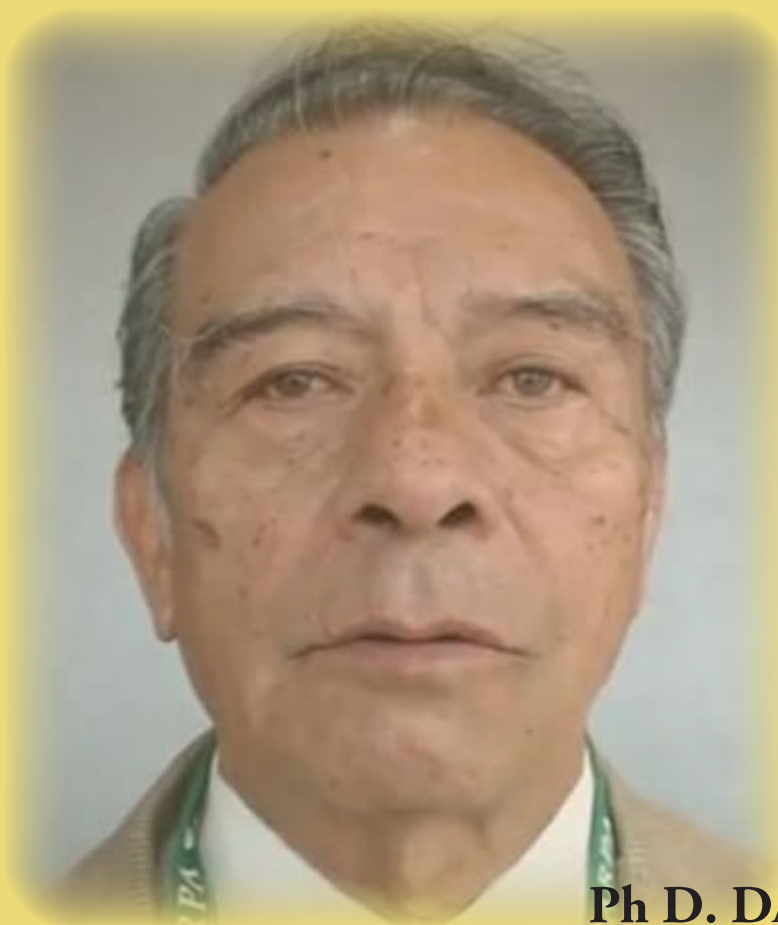


Agrociencia

Volumen 55, Número 1

1 de enero - 15 de febrero, 2021



Ph D. DANIEL TÉLIZ ORTIZ
Profesor Emérito
Colegio de Postgraduados



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

MÉXICO



DIRECTORIO

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Said Infante Gil

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

Ana Rita Román Jiménez

FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Brenda Espejel Lagunas

APOYO

Belem M. Villegas Contreras

Yolanda Feroso Meraz

Oscar Vieyra Durán

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, **Volumen 55, número 1, 1 de enero - 15 de febrero, 2021**, 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. Said Infante Gil. Fecha de última modificación, **15 de febrero del 2021**.

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

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

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

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

Oficinas Centrales:

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Guerrero #9, Esquina Avenida Hidalgo.

56220. San Lus Huexotla. Texcoco, Estado de México

En el Colegio de Postgraduados

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Ganadería

Campus Montecillo

Colegio de Postgraduados

56230, Montecillo, Estado de México.

Apartado Postal 56

56230, Suc. Chapingo, Estado de México

Teléfono: 595 92 84427

agrociencia@colpos.mx

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

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

Portada: Daniel Téliz Ortiz

Profesor Emérito del Colegio de Postgraduados



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 55

1 de enero - 15 de febrero, 2021

Número 1

Agua-Suelo-Clima ⇌ Water-Soil-Climate

- DETERMINING THE SOIL QUALITY INDEX IN THE BATUMI DELTA, GEORGIA ⇌ DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE CALIDAD DEL SUELO EN EL DELTA DE BATUMI, GEORGIA
 Büilent **Turgut**, Merve **Ateş**, Halil **Akıncı** 1

Biotecnología ⇌ Biotechnology

- HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES ASOCIADOS CON EL CULTIVO DE MAÍZ EN REGIONES CON SEQUÍA EN OAXACA ⇌ ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH MAIZE CROP IN DROUGHT REGIONS OF OAXACA
 Artemio **Méndez-Matias**, Celerino **Robles**, Laura **Hernández-Cuevas** 19

Ciencia Pecuaria ⇌ Animal Science

- DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS Y PRODUCCIÓN DE BIOGÁS *in vitro* POR FERMENTACIÓN SÓLIDA CON *Pleurotus ostreatus* ⇌ LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES DEGRADATION AND *in vitro* BIOGAS PRODUCTION BY SOLID FERMENTATION WITH *Pleurotus ostreatus*
 Jerónimo **Herrera-Pérez**, Xóchilt **Rosales-Barragán**, Paulino **Sánchez-Santillán**, Nicolás **Torres-Salado**, Marco Antonio **Ayala-Monter**, Diego Felipe **Portela-Díaz**, Daniel **Hernández-Valenzuela** 37

Matemáticas Aplicadas, Estadística y Computación ⇌ Applied Mathematics-Statistics-Computer Science

- VALIDACIÓN DE LA ESCALA MEXICANA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA A TRAVÉS DE CORRELACIÓN TETRACÓRICA CON BASE EN LA DISTRIBUCIÓN NORMAL ASIMÉTRICA BIVARIADA ⇌ VALIDATION OF MEXICAN FOOD SECURITY SCALE THROUGH TETRACHORIC CORRELATION BASED ON BIVARIATE SKEW NORMAL DISTRIBUTION
 Ana Laura **Ramírez Jiménez**, Martha Elva **Ramírez Guzmán**, Elizabeth **González Estrada** 55

Protección Vegetal ⇌ Plant Protection

- MARCAJE DE LARVAS DE *Ceraeochrysa valida* (Banks) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) CON COLORANTES LIPOSOLUBLES INCORPORADOS A LA DIETA ⇌ MARKING *Ceraeochrysa valida* (Banks) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) LARVAE WITH LIPOSOLUBLE COLORS INCORPORATED IN THE DIET
 Elba **López-Duran**, Juan A. **Villanueva-Jiménez**, Mónica de la Cruz **Vargas-Mendoza**, Martín **Palomares-Pérez** 73

Recursos Naturales Renovables ⇌ Natural Renewable Resources

- MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO POTENCIAL DE RAÍZ DE *Pinus patula* PRODUCIDO EN CHAROLAS CON PODA RADICAL ⇌ MORPHOLOGY AND ROOT GROWTH POTENTIAL OF *Pinus patula* PRODUCED IN TRAYS WITH ROOT PRUNING
 Manuel **Aguilera-Rodríguez**, Arnulfo **Aldrete**, J. Jesús **Vargas-Hernández**, Javier **López-Upton**, Miguel Ángel **López-López**, Víctor M. **Ordaz-Chaparro** 81

DETERMINING THE SOIL QUALITY INDEX IN THE BATUMI DELTA, GEORGIA

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE CALIDAD DEL SUELO EN EL DELTA DE BATUMI, GEORGIA

Bülent Turgut^{1*}, Merve Ateş², Halil Akıncı³

¹Karadeniz Technical University, Department of Soil and Ecology, 61080 Trabzon Türkiye. (bulentturgut@ktu.edu.tr). ²Artvin Çoruh University, Department of Soil and Ecology, 08000 Artvin Türkiye. (mrvates33@gmail.com). ³Artvin Çoruh University, Department of Geomatics Engineering, 08000 Artvin, Türkiye. (halil.akinci@artvin.edu.tr).

ABSTRACT

The soil quality index is a quantitative assessment concept and it is used in the evaluation of ecosystem components. Because of the high potential for agriculture and biodiversity, deltas are the most valuable parts of the ecosystem. This study aimed to determine the soil quality index (SQI) in the Batumi Delta, Georgia. For this purpose, the study area was divided into five plots due to their morphological positions (L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , and L_5). A total of 125 soil samples were taken for analysis including clay content (CC), silt content (SC), sand content (SaC), mean weight diameter (MWD), aggregate stability (AS), amount of water retained under -33 kPa (FC) and -1500 kPa (WP) pressures and organic matter content (OM). These properties were used as the main criteria, and the Analytic Hierarchy Process (AHP) and Factor Analysis were used for weighting them. Sub-criteria were scored using expert opinion and the linear score functions, such as “more is better” and “optimum value”. For determining SQI, the additive method (SQI_A), the weighted method with AHP (SQI_{AHP}), and the weighted method with factor analysis (SQI_{FA}) were used. The resulting SQI scores of the three methods were ordered as $SQI_{AHP} > SQI_A > SQI_{FA}$, but these differences were not significant. However, the SQI scores of the plots ($p \leq 0.01$) showed statistically significant differences and were ordered as $L_5 > L_4 > L_3 > L_2 > L_1$.

Key words: Factor analysis, scoring, alluvial, sedimentation

RESUMEN

El índice de calidad del suelo es un concepto de evaluación cuantitativa y se utiliza en la evaluación de los componentes del ecosistema. Debido a su potencial alto para la agricultura y la biodiversidad, los deltas son las partes más valiosas del ecosistema. Este estudio tuvo como objetivo determinar el índice de calidad del suelo (SQI) en el delta de Batumi, Georgia. Es por ello que el área de estudio se dividió en cinco parcelas con base en sus posiciones morfológicas (L_1 , L_2 , L_3 , L_4 y L_5). Un total de 125 muestras de suelo se tomaron para su análisis, e incluyeron contenido de arcilla (CC), contenido de limo (SC), contenido de arena (SaC), diámetro medio ponderado (MWD), estabilidad de agregados (AS), cantidad de agua retenida de presiones por debajo de -33 kPa (FC) y -1500 kPa (WP) y contenido de materia orgánica (OM). Estas propiedades se utilizaron como criterios principales, y para ponderarlas usamos el Proceso analítico jerárquico (Analytic Hierarchy Process, AHP) y el Análisis de factores. Los subcriterios se calificaron de acuerdo con la opinión de expertos y con las funciones de calificación lineal, como “más es mejor” y “valor óptimo”. Para determinar el SQI, se utilizó el método aditivo (SQI_A), el método ponderado con AHP (SQI_{AHP}) y el método ponderado con análisis de factores (SQI_{FA}). Los valores resultantes de SQI de los tres métodos se ordenaron como $SQI_{AHP} > SQI_A > SQI_{FA}$, pero estas diferencias no fueron significativas. Sin embargo, los valores de SQI de las parcelas ($p \leq 0.01$) mostraron diferencias estadísticamente significativas y se ordenaron como $L_5 > L_4 > L_3 > L_2 > L_1$.

Palabras clave: análisis de factores, calificación, aluvial, sedimentación.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: March, 2020. Approved: July, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 55: 1-18. 2021.

INTRODUCTION

Deltas are unique in terms of both their formation conditions and their high agricultural and biodiversity potential. Since the formation of the deltas is time-dependent, their morphology varies depending on the accumulation conditions. These differences in morphology cause variability in soil properties (Turgut and Ateş, 2017). The Batumi Delta with its high agricultural production potential, wetlands, and biodiversity is one of the most important areas in Georgia. Because of the great ecological and agricultural significance of the Batumi Delta, it is necessary to ensure the sustainability of this important area using the correct management practices. Therefore, the soil properties of this area should be known.

The concept of soil quality index is focused on determining the impact of land use and management practices effects on the soil quality index is accepted (de Paul Obade and Lal, 2016; Borrelli *et al.*, 2017; Leite Chaves *et al.*, 2017). However, the studies on the effects of the morphological position on the quality index of the delta are limited. Different methods are used to determine soil quality; however, no standard method is established. The model differences are mainly caused by the selection of indicators, soil properties that make up the dataset, the weighting methods of these properties, and the methods used to calculate the quality value.

Although there is no a standard model, three stages are followed in determining the soil quality index in all models (Karlen *et al.*, 2003): 1) selection of appropriate criteria, 2) scoring of the sub-criteria, and 3) development of the integrated quality index. Expert opinion and principal components analyse were used to select main criteria for a minimum data set (Sánchez-Navarro *et al.*, 2015; Vasu *et al.*, 2016); linear scoring methods were used to transform sub-criteria into unit-less scores (Nabiollahi *et al.*, 2018); and additive, weighted additive, and a hierarchical decision support systems were used for indexing.

The Analytic Hierarchy Process (AHP) is a multicriteria decision-making approach introduced by Saaty (1994). Researchers preferred AHP because this method has effective mathematical properties and enables users to determine the weight of the parameters in the solution of a multi-criteria problem (Akinici *et al.*, 2013). The AHP method is

INTRODUCCIÓN

Los deltas son únicos, tanto por sus condiciones de formación como por su potencial agrícola alto y su biodiversidad. Debido a que la formación de los deltas depende del transcurso del tiempo, su morfología varía según las condiciones de acumulación. Estas diferencias morfológicas provocan variabilidad en las propiedades del suelo (Turgut y Ateş, 2017). El delta de Batumi, con su potencial de producción agrícola alto, humedales y biodiversidad, es una de las áreas más importantes de Georgia. Debido a la gran importancia ecológica y agrícola del delta de Batumi, es necesario asegurar la sostenibilidad de esta importante área utilizando las prácticas de manejo correctas. Por lo tanto, conviene conocer las propiedades del suelo de esta zona.

El concepto de índice de calidad del suelo se enfoca en determinar el impacto del uso de las tierras, y se aceptan los efectos de las prácticas de manejo sobre el índice de calidad del suelo (de Paul Obade y Lal, 2016; Borrelli *et al.*, 2017; Leite Chaves *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios de los efectos de la posición morfológica sobre el índice de calidad del delta son limitados. Diferentes métodos se utilizan para determinar la calidad del suelo; pero ningún método estándar está establecido. Las diferencias de modelo se deben principalmente a la selección de indicadores, las propiedades del suelo que componen el conjunto de datos, los métodos de ponderación de estas propiedades y los métodos utilizados para calcular el valor de calidad.

Aunque no existe un modelo estándar, se siguen tres etapas para determinar el índice de calidad del suelo en todos los modelos (Karlen *et al.*, 2003): 1) selección de criterios apropiados, 2) calificación de los subcriterios, y 3) desarrollo del índice de calidad integrado. Opiniones de expertos y análisis de componentes principales se utilizaron para seleccionar los criterios principales para un conjunto mínimo de datos (Sánchez-Navarro *et al.*, 2015; Vasu *et al.*, 2016); se utilizaron métodos de calificación lineal para transformar subcriterios en calificadores sin unidades (Nabiollahi *et al.*, 2018); y para la indexación se utilizaron sistemas aditivos, aditivos ponderados y de decisiones jerárquicas se utilizaron como apoyo para indexar.

El Proceso analítico jerárquico (AHP) es un enfoque multicriterio de toma de decisiones introducido por Saaty (1994). Los investigadores prefirieron el

a hierarchical model with objectives, criteria, and sub-criteria used for solving environmental problems (Akinci *et al.*, 2013; Kundu *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2017).

This study aimed to determine the soil quality index using three methods including the additive method, the weighted additive method with AHP and the weighted additive method with factor analysis, as well as to compare methods and plots within the Batumi Delta that are considered to be morphologically different. The main objective of selecting the Batumi Delta as the study area is the unique nature of this environment and its high agricultural and ecological potential.

MATERIAL AND METHODS

Description of the experimental site

The study was conducted at the Batumi Delta located in the south-western part of Georgia with an area of 3900 ha (Figure 1). The Batumi Delta has a humid subtropical climate with an annual rainfall of 2718 mm and a mean annual temperature of 14.4 °C. The elevation of the delta ranges from 0 to 50 m and the slope grade is flat. There are three mainland forms of agriculture in the delta: pasture, orchards, and truck gardens (Turgut and Ateş, 2017).

método AHP porque tiene propiedades matemáticas efectivas y permite a los usuarios determinar el peso de los parámetros en la solución de un problema multicriterio (Akinci *et al.*, 2013). El método AHP es un modelo jerárquico con objetivos, criterios y subcriterios que se utilizan para resolver problemas ambientales (Akinci *et al.*, 2013; Kundu *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2017).

Este estudio tuvo como objetivo determinar el índice de calidad del suelo utilizando tres métodos que incluyen: el método aditivo, el método aditivo ponderado con AHP y el método aditivo ponderado con análisis de factores; así como comparar métodos y parcelas dentro del delta de Batumi que se consideran morfológicamente diferentes. El objetivo principal de seleccionar el Delta de Batumi como área de estudio es la naturaleza única de este entorno y sus altos potenciales agrícola y ecológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sitio experimental

El estudio se realizó en el Delta de Batumi, ubicado en la parte suroeste de Georgia, en un área de 3900 ha (Figura 1). El delta de Batumi tiene un clima subtropical húmedo con una precipitación anual de 2718 mm y una temperatura media anual de

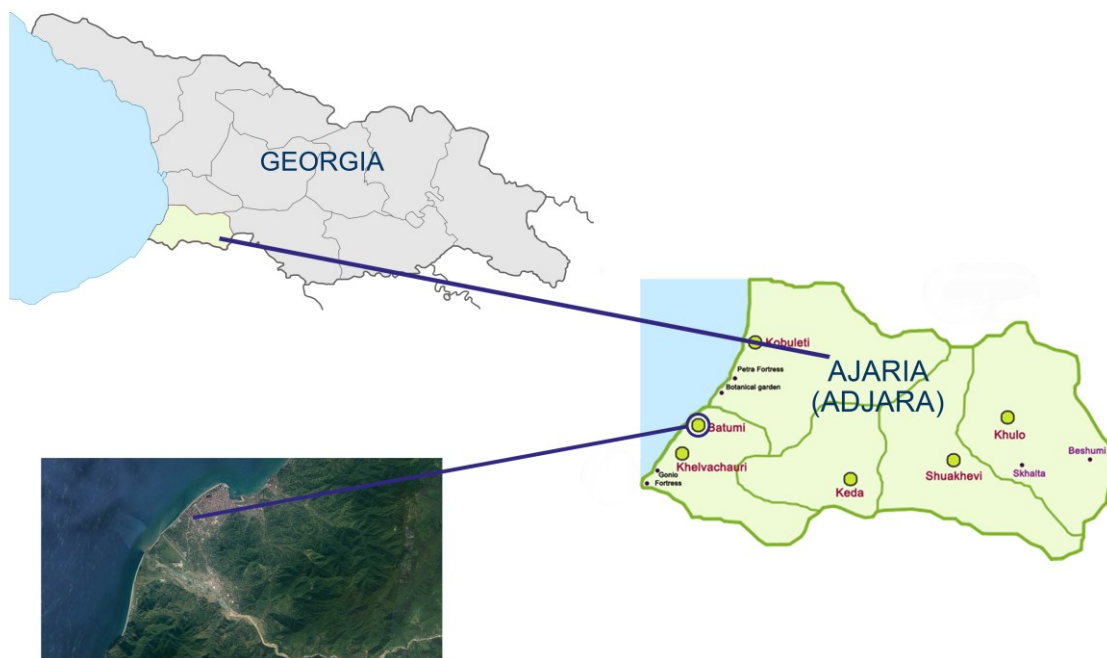


Figure 1. The geographic position of the Batumi Delta.
Figura 1. La ubicación geográfica del delta de Batumi.

Based on morphological differences, five plots were created in the Batumi Delta. The first one was located at the active delta area (L_1), the second (L_2) and third (L_3) at the lower deltaic plain, and the fourth (L_4) and fifth (L_5) plots at the upper deltaic plain (Figure 2). From each plot, 25 randomly selected soil samples were collected from the top layer (0-20 cm) using a soil auger in late spring. Since the sampling areas are homogeneous in terms of vegetation and micro-topography, an equal number of samples were taken from each area and 125 soil samples were transferred to the laboratory, air dried, and sieved with a 2 mm sieve for analysis.

In order to calculate the soil quality index (SQI), four steps were followed: 1) selection of main criteria, 2) weighting the main criteria, 3) scoring the sub-criteria, and 4) calculating SQI (Karlen *et al.*, 2003). These steps were also used in three different calculation methods: Additive Soil Quality Index (SCI_A) method, Weighted Additive Soil Quality Index Using AHP (SQI_{AHP}) method, and Weighted Additive Soil Quality Index Using Factor Analysis (SQI_{FA}) method.

Selection of the main criteria

Soil quality indicators should be sensitive to various management practices, climatic conditions, and external change (natural or anthropogenic) (Doran and Parkin, 1996). The variance analysis results of Turgut and Ateş (2017) were used to determine the main criteria that are sensitive properties to the

14.4 °C. La elevación del delta varía de 0 a 50 m, y la pendiente es plana. Hay tres formas de agricultura continental en el delta: pastos, huertos productivos y huertos pequeños para venta en mercados sobre ruedas (Turgut y Ateş, 2017).

Con base en diferencias morfológicas, se establecieron cinco parcelas en el Delta de Batumi. La primera se ubicó en el área activa del delta (L_1), la segunda (L_2) y la tercera (L_3) en la llanura deltaica inferior, y la cuarta (L_4) y quinta (L_5) en la llanura deltaica superior (Figura 2). De cada parcela, se recolectaron 25 muestras de suelo, seleccionadas al azar, de la capa superior (0-20 cm), con una barrena de suelo, a fines de la primavera. Porque las áreas de muestreo son homogéneas en cuanto a vegetación y microtopografía, se tomaron cantidades iguales de muestras de cada área y 125 muestras de suelo se llevaron al laboratorio, se secaron al aire y se pasaron por un tamiz de 2 mm para su análisis.

Métodos de evaluación de la calidad del suelo

Para calcular el índice de calidad del suelo (SQI), se siguieron cuatro pasos: 1) selección de los criterios principales, 2) ponderación de los criterios principales, 3) calificación de los subcriterios, y 4) cálculo del SQI (Karlen *et al.*, 2003). Estos pasos también se utilizaron en tres métodos de cálculo diferentes: método aditivo del índice de calidad del suelo (SCI_A), índice aditivo ponderado de calidad del suelo por el método AHP (SQI_{AHP}) e índice aditivo ponderado de calidad del suelo por el método de análisis de factores (SQI_{FA}).

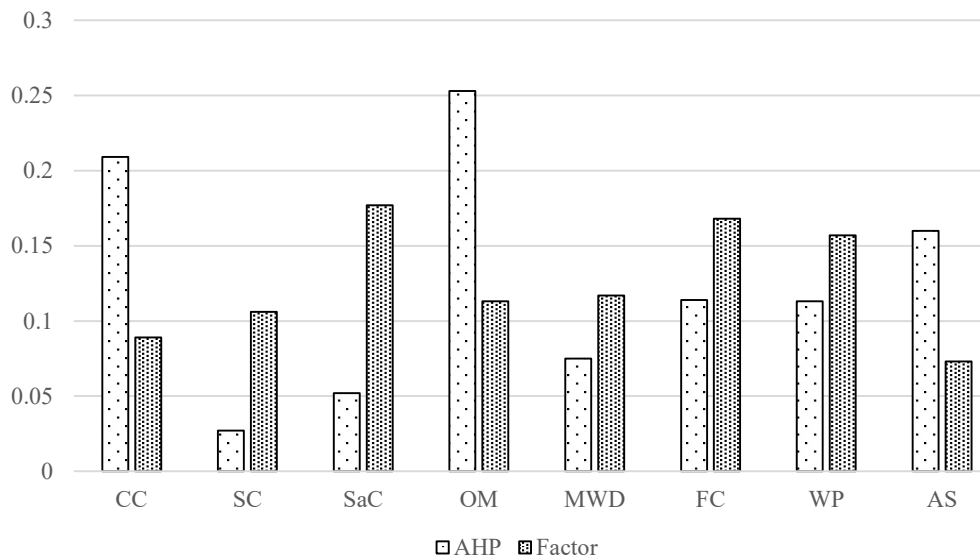


Figure 2. Weighting scores of main criteria obtained from AHP and Factor Analyse methods.

CC: Clay content; SC: Silt content; SaC; Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point.

Figure 2. Ponderación de los criterios principales obtenidos con los métodos AHP y Análisis de factores.

CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

management practice and topographic position. According to the analysis results, the soil properties selected as main criteria are: clay content (CC), silt content (SC), sand content (SaC), mean weight diameter (MWD), aggregate stability (AS), field capacity (FC), wilting point (WP), and organic matter content (OM).

Weighting the main criteria

A pairwise comparison matrix was created to determine the weights of the main criteria according to the AHP methodology. The judgments in the pairwise comparison matrix (relative levels of importance of the parameters) were determined by consulting the opinions of agronomists and faculty members at the Departments of Soil Science and Plant Nutrition, Agriculture Faculties of Atatürk University, Ordu University, and Samsun 19 Mayıs University. The weight values for each main criterion were derived from the ratio of communality to the sum of communalities (Johnson and Wichern, 1992).

Scoring the sub-criteria

Sub-criteria were scored within the range of 0-1 according to an expert's opinion in the SQI_{AHP} method. In this scoring, the effect of sub-criteria on soil productivity was taken into consideration. Lower points were given to the sub-criteria that negatively affect soil productivity, while higher points were given to those that have a positive effect(s) on the soil productivity.

Sub-criteria were scored using the linear score functions "more is better" and "optimum value" in the SQI_{FA} . These scoring functions were obtained by modifying a standard function (Guo *et al.*, 2017). The "optimum value" function was used for scaling the particle size distribution, while the "more is better" function was used for MWD, OM, AS, FC, and WP. The 30% -35% range for each fraction was considered the optimum value (Table 1).

Calculating SQI

Selected criteria were combined in the SQI_A (Eq.2), SQI_{AHP} and SQI_{FA} methods (Eq. 3).

$$SQI_A = \frac{1}{k} \sum_{j=1}^k n_j \quad 2$$

where k is the number of criteria, j is criteria, and n is criteria scores.

$$SQI_{AHP\&FA} = \sum_{i=1}^n W_i S_i \quad 3$$

Selección de los criterios principales

Los indicadores de calidad del suelo deben ser sensibles a prácticas de manejo diversas, y a una variedad de condiciones climáticas y cambios externos (naturales o antropogénicos) (Doran y Parkin, 1996). Los resultados del análisis de varianza de Turgut y Ateş (2017) se utilizaron para determinar los criterios principales que derivan de las propiedades que son sensibles a la práctica de manejo y a la posición topográfica. De acuerdo con los resultados del análisis, las propiedades del suelo seleccionadas como criterios principales son: contenido de arcilla (CC), contenido de limo (SC), contenido de arena (SaC), diámetro medio ponderado (MWD), estabilidad de agregados (AS), capacidad de campo (FC), punto de marchitez permanente (WP) y contenido de materia orgánica (OM).

Ponderación de los criterios principales

Una matriz de comparación por pares se creó para determinar los valores de ponderación de los criterios principales según la metodología AHP. Los juicios en la matriz de comparación por pares (niveles relativos de importancia de los parámetros) se determinaron consultando las opiniones de agrónomos y profesores de los Departments of Soil Science and Plant Nutrition, Agriculture Faculties of Atatürk University, Ordu University, and Samsun 19 Mayıs University. Los valores de ponderación para cada criterio principal se derivaron de la relación de comunalidad a la suma de comunalidades (Johnson y Wichern, 1992).

Calificación de los subcriterios

Los subcriterios se calificaron dentro del intervalo de 0-1 de acuerdo con la opinión de un experto en el método SQI_{AHP} . En esta calificación, se tomó en consideración el efecto de los subcriterios en la productividad del suelo. Valores más bajos se otorgaron a los subcriterios que afectan negativamente la productividad del suelo, mientras que los valores más altos se dieron a aquellos subcriterios que tienen un efecto(s) positivo en dicha productividad.

Los subcriterios se calificaron con las funciones de calificación lineales "más es mejor" y "valor óptimo" en el SQI_{FA} . Estas funciones de calificación se obtuvieron al modificar una función estándar (Guo *et al.*, 2017). La función "valor óptimo" se utilizó para aumentar la distribución del tamaño de partículas, mientras que la función "más es mejor" se usó para MWD, OM, AS, FC y WP. El intervalo de 30 - 35% para cada fracción se consideró el valor óptimo (Cuadro 1).

Table 1. The scoring functions and parameters for sub-criteria in the SQI_{FA} method.
Cuadro 1. Las funciones de calificación y los parámetros para los subcriterios en el método SQI_{FA}.

Sub-criteria	Function type	x_1	r_1	r_2	x_2	
CC	Optimal range	1.47	30.00	35.00	29.34	$f(x) = \left\{ 0.9 \times \frac{x - x_1}{r_1 - x_1} + 0.1 \right\};$
SC		4.90	30.00	35.00	53.41	$x_1 \leq x \leq x_2$
SaC		36.04	30.00	35.00	92.11	$f(x) = \{1\}; r_1 \leq x \leq r_2$
						$f(x) = \left\{ 1 - 0.65 \times \frac{x - r_1}{x_2 - r_1} \right\};$
						$r_2 \leq x \leq x_2$
MWD	More is better	0.26			1.02	$f(x) = \left\{ 0.9 \times \frac{x - x_1}{x_2 - x_1} + 0.1 \right\};$
OM		0.37			5.63	$x_1 \leq x \leq x_2$
AS		32.88			95.46	
FC		5.29			57.10	
WP		2.92			49.32	

X: measured value of the sub-criteria; x_1 and x_2 : minimum and maximum values of the sub-criteria, respectively; r_1 and r_2 : lower and the upper values of the optimal range, respectively. CC: Clay content; SC: Silt content; SaC: Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point. ♦ X: Valor medido de los subcriterios; x_1 y x_2 : Valores mínimo y máximo de los subcriterios, respectivamente; r_1 y r_2 : Valores inferior y superior del intervalo óptimo, respectivamente. CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

where n is the number of the main criteria, W_i and S_i are, respectively, the weighting of main criteria and the score of the i^{th} sub-criterion.

Statistical analysis

The ArcGIS software was used to digitize the work area and create a digital elevation model. One-way analysis of variance with post hoc Tukey test was used to determine the effect of topographic position on soil properties. Correlation analysis was used to identify relationships between soil properties. Soil properties were evaluated by factor analysis to determine the weights. All data were analyzed using XLSTAT Ecology (22.1.1).

RESULTS AND DISCUSSION

Main criteria

The clay content (CC), silt content (SC), sand content (SaC), organic matter content (OM), mean weight diameter (MWD), aggregate stability (AS),

Cálculo del SQI

Los criterios seleccionados se combinaron en los métodos SQI_A (Ec. 2), SQI_{AHP} y SQI_{FA} (Ec. 3).

$$SQI_A = \frac{1}{k} \sum_{j=1}^k n_j \tag{2}$$

donde k es el número de criterios, j es el criterio y n es la calificación de los criterios.

$$SQI_{AHP\&FA} = \sum_{i=1}^n W_i S_i \tag{3}$$

donde n es el número de los criterios principales, W_i y S_i son la ponderación de los criterios principales y la calificación del i -ésimo subcriterio, respectivamente.

Análisis estadístico

El software ArcGIS se utilizó para digitalizar el área de trabajo y crear un modelo de elevación digital. Un análisis de varianza

field capacity (FC), and wilting point (WP) were used as main criteria to evaluate the soil quality in the Batumi Delta. Most of these criteria are sensitive to morphological positions studied by Turgut and Ateş (2017). In addition, they could reflect sustainable management goals and specific soil structural conditions and show differences due to land management (Doran and Parkin, 1994; Karlen *et al.*, 2003). The soil properties selected as criteria in this study reflect the abovementioned conditions. The soil textures were sandy loam in the L₁, L₂, L₃, and L₄ plots, while it was a loam soil in L₅. The CC ranged from 5.07% for L₁ to 13.32% for L₅; SC ranged from 25.73% for L₂ to 34.91% for L₅; SaC ranged from 51.13% for L₅ to 67.91% for L₁. The maximum OM and AS were observed in L₂, the maximum MWD, FC, and WP were found in the L₅ plot. While, the minimum OM, MWD, AS, FC, and WP were found in L₁. The variation in the L₁ plot was higher than other plots for all main criteria, as reflected by the highest CV value (Table 2).

Weighting main criteria with AHP

The Pairwise comparison matrix, created for weighting each criterion, showed that OM had the highest weight value and SC had the lowest weight value (Table 3). The consistency ratio of the pairwise comparison judgments was calculated as 0.0242, which was below 0.10 and indicates that the judgment matrix had satisfactory consistency and could be used without any adjustment (Saaty, 1994). Equation 4 was used for the consistency ratio.

unidireccional se utilizó junto con la prueba de Tukey para determinar el efecto de la posición topográfica en las propiedades del suelo. Un análisis de correlación se utilizó para identificar las relaciones entre las propiedades del suelo. Las propiedades del suelo se evaluaron por medio de un análisis de factores para determinar los valores de ponderación. Todos los datos se analizaron con XLSTAT Ecology (22.1.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Criterios principales

Como criterios principales para evaluar la calidad del suelo en el delta de Batumi, se utilizaron: el contenido de arcilla (CC), contenido de limo (SC), contenido de arena (SaC), contenido de materia orgánica (OM), diámetro medio ponderado (MWD), estabilidad de los agregados (AS), capacidad de campo (FC) y punto de marchitez permanente (WP). Casi todos estos criterios son sensibles a las posiciones morfológicas estudiadas por Turgut y Ateş (2017); Además, podían reflejar objetivos de manejo sostenible y condiciones estructurales específicas del suelo, como también mostrar diferencias debido al manejo de las tierras (Doran y Parkin, 1994; Karlen *et al.*, 2003). Las propiedades del suelo seleccionadas como criterios en este estudio reflejan las condiciones antes mencionadas.

Las texturas del suelo fueron franco arenoso en las parcelas L₁, L₂, L₃ y L₄, mientras que en L₅ fue franco. El CC osciló entre 5.07% para L₁ y 13.32% para L₅; SC varió de 25.73% para L₂ a 34.91% para L₅; el SaC osciló entre 51.13% para L₅ y 67.91% para

Table 2. Descriptive statistics of main criteria.
Cuadro 2. Estadística descriptiva de los criterios principales.

Main criteria	Plots					CV (%)
	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	
CC (%)	5.07± 2.80	6.58±3.09	9.37±4.14	10.27±5.03	13.32±4.27	53.01
SC (%)	27.00±14.93	25.73±4.88	31.18±6.63	26.79±5.90	34.91±6.12	28.36
SaC (%)	67.91±17.29	67.67±6.67	57.98±8.32	62.40±10.18	51.13±6.84	17.54
OM (%)	0.98± 0.39	3.31±1.02	2.59±0.99	3.10±1.25	2.64±0.89	36.96
MWD (mm)	0.35± 0.06	0.56±0.07	0.65±0.13	0.77±0.12	0.82±0.08	15.47
AS (%)	64.98±11.96	90.83±3.19	88.72±5.62	87.99±3.89	83.70±4.70	7.50
FC (%)	17.47±7.25	27.74±5.74	32.98±4.92	35.59±7.55	35.60±4.30	21.11
WP (%)	13.06±7.94	19.20±4.26	25.30±5.15	27.98±7.30	28.62±4.86	27.23

CC: Clay content; SC: Silt content; SaC: Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point. ♦ CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

Table 3. Pairwise comparison matrix.
Cuadro 3. Matriz de comparación por pares.

Criteria	CC	SC	SaC	MWD	AS	OM	WP	FC	Weights
CC	1	7	4	3	2	1/2	2	2	0.209
SC	1/7	1	1/2	1/3	1/6	1/8	1/4	1/5	0.027
SaC	1/4	2	1	1/2	1/3	1/4	1/2	1/2	0.052
MWD	1/3	3	2	1	1/2	1/3	1/2	1/2	0.075
AS	1/2	6	3	2	1	1/2	2	2	0.160
OM	2	8	4	3	2	1	2	2	0.253
WP	1/2	4	2	2	1/2	1/2	1	1	0.113
FC	1/2	5	2	2	1/2	1/2	1	1	0.114

CC: Clay content; SC: Silt content; SaC-Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point.
 ♦ CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

$$CR = \frac{CI}{RI} \quad 4$$

where *CR* is consistency ratio, *CI* is consistency index and was calculated by Equation 5, and *RI* is the random index and was obtained from Saaty's random indexes as 1.41.

$$CI = \frac{(\lambda_{max} - n)}{(n - 1)} \quad 5$$

where λ_{max} is maximum eigenvalue, which was calculated with a pairwise comparison matrix as 0.0338, and *n* is the number of criteria (8).

Weighting criteria with Factor Analysis

According to the factor pattern of the criteria, the eigenvalue of the first two factors was higher than 1.0 and the cumulative variance proportion was 71.30%. The highly weighted variables of each factor were CC, SaC, MWD, FC and WP in F1; and SC, OM and AS in F2. Five highly weighted variables in F1 explained 51.23% of the variation and were strongly correlated with each other. In F2, three highly weighted variables explained 20.06% of the variation (Table 4).

The correlation analysis showed that the clay content (CC) was positively correlated with SC, MWD, FC, and WP but negatively correlated with

L_1 . Los valores máximos de OM y AS se observaron en L_2 ; los valores máximos de MWD, FC y WP se encontraron en L_5 . Mientras que los valores mínimos de OM, MWD, AS, FC y WP se encontraron en L_1 . La variación en la parcela L_1 fue mayor que en otras para todos los criterios principales, como se refleja en el valor más alto de CV (Cuadro 2).

Ponderación de los criterios principales con AHP

La matriz de comparación por pares, creada para ponderar cada criterio, mostró que OM tuvo el valor de ponderación más alto y SC tuvo el valor de ponderación más bajo (Cuadro 3). La razón de consistencia de las decisiones por comparación entre pares se calculó como 0.0242, lo cual estuvo por debajo de 0.10 e indicó que la matriz de juicio tuvo una consistencia satisfactoria y podía usarse sin ningún ajuste (Saaty, 1994). La ecuación 4 se utilizó para la relación de consistencia.

$$CR = \frac{CI}{RI} \quad 4$$

donde *CR* es la razón de consistencia, *CI* es el índice de consistencia, calculado con la Ecuación 5; y *RI* es el índice aleatorio y se obtuvo de los índices aleatorios de Saaty como 1.41.

$$CI = \frac{(\lambda_{max} - n)}{(n - 1)} \quad 5$$

Table 4. The factor pattern of the criteria.
Cuadro 4. El patrón de factores en los criterios.

Criteria	F1	F2
CC	0.666	-0.244
SC	0.519	-0.574
SaC	-0.749	0.663
MWD	0.784	0.214
AS	0.367	0.526
OM	0.516	0.609
FC	0.951	0.219
WP	0.935	0.107
Eigenvalue	4.099	1.605
Variability (%)	51.237	20.066
Cumulative %	51.237	71.303

CC: Clay content; SC: Silt content; SaC: Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point. ♦ CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: Materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

SaC. There was a positive correlation of SC with FC and WP, but the correlation was negative between SC and SaC. The correlation was negative between SaC with MWD, FC, and WP. There was a positive correlation of OM with MWD, FC, WP, and AS, as well as of MWD with FC, WP, and AS. Finally, FC and WP were positively correlated with AS (Table 5).

Communalities estimate the proportion of the variance in each variable that is explained by the components, and a high communality value suggests that a high portion of variance is explained by the factor (Johnson and Wichern, 1992). Because eigenvalue of factor1 and factor2 were higher than 1 in principle component analysis, they were used to calculate the weight of criteria. Based on communality analysis (Table 6), SC had the highest weight (0.177) and AS the lowest (0.073).

The weights of criteria calculated with AHP and FA showed differences. The weights of CC, OM and AS in AHP were higher than those calculated by FA, while the weights of SC, SaC, MWD, FC and WP were higher in the FA (Figure 2). In other words, experts evaluated OM and CC as the most important criteria affecting the SQI, but FA evaluated SaC, FC, and WP as the most important criteria. The calculating process may explain the main reason

donde l_{max} es el vector propio (eigenvalor) máximo, el cual se calculó como 0.0338 con una matriz de comparación por pares, y n es el número de criterios (8).

Criterios de ponderación con análisis de factores

De acuerdo con el patrón de factores de los criterios, el vector propio de los dos primeros factores fue superior a 1.0 y la proporción de varianza acumulada fue de 71.30%. Las variables con valor ponderado alto de cada factor fueron CC, SaC, MWD, FC y WP en F_1 ; y SC, OM y AS en F_2 . Cinco variables con valor ponderado alto en F_1 explicaron el 51.23% de la variación y presentaron correlación fuerte entre sí. A su vez, tres variables con valores ponderados altos en F_2 explicaron el 20.06% de la variación (Cuadro 4).

El análisis de correlación mostró que el contenido de arcilla (CC) se correlacionó positivamente con SC, MWD, FC y WP, pero negativamente con SaC. Hubo una correlación positiva de SC con FC y WP, pero la correlación fue negativa entre SC y SaC. La correlación fue negativa entre SaC con MWD, FC y WP. Hubo una correlación positiva de OM con MWD, FC, WP y AS, así como de MWD con FC, WP y AS. Por último, FC y WP se correlacionaron positivamente con AS (Cuadro 5).

Las comunalidades estiman la proporción de la varianza en cada variable, lo cual se explica por los componentes, y un valor de comunalidad alto indica que una gran parte de la varianza se explica por el factor (Johnson y Wichern, 1992).

Debido a que los vectores propios del factor1 y el factor2 fueron superiores a 1 en el análisis de los componentes principales, se utilizaron para calcular el valor de ponderación de los criterios. Según el análisis de comunalidad (Cuadro 6), SC tuvo el valor mayor (0.177) y AS el valor más bajo (0.073).

Los valores de ponderación de los criterios calculados con AHP y FA mostraron diferencias. Los valores de ponderación de CC, OM y AS en AHP fueron superiores a los calculados por FA. Mientras que los de SC, SaC, MWD, FC y WP fueron mayores en FA (Figura 2). En otras palabras, los expertos evaluaron OM y CC como los criterios más importantes que afectan al SQI, pero con FA se evaluó a SaC, FC y WP como los criterios más importantes. El proceso de cálculo puede explicar la razón principal de esta diferencia. En forma similar a nuestros resulta-

Table 5. Pearson correlation coefficients for the main criteria.
Cuadro 5. Coeficientes de correlación de Pearson para los criterios principales.

Variables	CC	SC	SaC	OM	MWD	FC	WP	AS
CC	1							
SC	0.3398 a 0.0001 b	1						
SaC	-0.7163 a 0.0000 b	-0.8996 a 0.0000 b	1					
OM	0.0789 a 0.3815 b	-0.0219 a 0.8087 b	-0.0205 a 0.8208b	1				
MWD	0.6979 a 0.0000 b	0.1518 a 0.0910 b	-0.4366 a 0.0000 b	0.4749 a 0.0000 b	1			
FC	0.5444 a 0.0000 b	0.4093 a 0.0000 b	-0.5564 a 0.0000 b	0.6334 a 0.0000 b	0.7573 a 0.0000 b	1		
WP	0.5730 a 0.0000 b	0.4596 a 0.0000 b	-0.6070 a 0.0000 b	0.5761 a 0.0000 b	0.7460 a 0.0000 b	0.9633 a 0.0000 b	1	
AS	0.0664 a 0.4617 b	-0.0768 a 0.3946 b	0.0261 a 0.7727 b	0.5862 a 0.0000 b	0.4215 a 0.0000 b	0.4544 a 0.0000 b	0.3268 a 0.0002 b	1

Values in bold are different from 0 with (p=0.05); a: means correlation ecoefficiency; b: means significant probability. CC: Clay content; SC: Silt content; SaC: Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point. ♦ Los valores en negrita son diferentes de 0 con (p=0.05); a: coeficiente de correlación de los valores medios; b: probabilidad significativa de los valores medios. CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

for this difference. Similar to our results, Liu *et al.* (2017) found that weighting values produced different results between AHP and FA methods. The

Table 6. Estimated communality and weight values of each main criteria.

Cuadro 6. Valores de comunalidad y ponderación estimados para cada criterio principal.

Criteria	Communality	Weight
CC	0.503	0.089
SC	0.598	0.106
SaC	1.000	0.177
MWD	0.661	0.117
AS	0.411	0.073
OM	0.637	0.113
FC	0.952	0.168
WP	0.886	0.157

CC: Clay content; SC: Silt content; SaC-Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point. ♦ CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

dos, Liu *et al.* (2017) descubrieron que los valores de ponderación producían resultados diferentes entre los métodos AHP y FA. La consistencia del valor de ponderación solo se puede probar con el método AHP. Por esta razón, esto debe tenerse en cuenta a la hora de seleccionar el método.

Calificación de subcriterios con AHP

La calificación se realizó a través de las opiniones de los expertos que consideraron los efectos de los subcriterios, lo cual constituyó las unidades de medida de los criterios principales para la fertilidad del suelo. La escala 0-1 se utilizó para la calificación. El intervalo de 30-35% de CC, SC y SaC se consideró el intervalo óptimo para la productividad del suelo, y recibió un valor de 1. Mientras que los valores por debajo y por encima de este intervalo se calificaron gradualmente con valores más bajos, ya que podrían tener un efecto negativo en la fertilidad del suelo. Otros subcriterios se evaluaron al considerar los valores mínimos y máximos en el conjunto de datos.

La calificación mínima se otorgó al valor mínimo de los subcriterios, mientras que los valores restantes

consistency of the weighting value can be tested only in the AHP method. For this reason, this should be taken into account for selecting the method.

Scoring sub-criteria with AHP

Scoring was done by experts' opinion considering the effects of sub-criteria, which constitute the measurement units of the main-criteria for soil fertility. The 0-1 scale was used for scoring, the 30-35% range of CC, SC, and SaC that considered the optimum range for soil productivity was given a value of 1, whereas the values below and above of this range were scored gradually lower since it might have a negative effect on soil fertility. Other sub-criteria were scored considering the minimum and maximum values in the dataset. The minimum score was given to the minimum value of sub-criteria, while the remaining values were increased gradually with value ranges (Table 7).

Scoring sub-criteria with linear score functions

The "optimum value" function was used for the CC, SC, and SaC, where the value of 1 was given for the range of 30-35%. Since there is no value greater than 30% in the clay content, a linearly increasing plot is obtained in the range of 0-1. In contrast to the clay content, there is no value below 35% in the sand content, and a linearly decreasing graph is produced. In the silt content, the score increased to the optimum range (30-35%) and decreased afterwards. In this research, the "more is better" function was applied to OM, MWD, FC, WP, and AS (Figure 3).

Additive soil quality index (SQI_A)

The SQI_A increased in the order of L₁ (0.359) < L₂ (0.564) < L₃ (0.625) < L₄ (0.649) < L₅ (0.681) (Figure 4). The lowest SQI_A score was observed in the active delta wherein L₁ is the nearest plot to the sea. The SQI_A scores gradually increased as the plots' distance from the sea increased, reaching the delta's initial formation zone where the highest value was in the L₅ plots. The ANOVA test showed that the differences between the SQI_A of the plots were statistically significant (Table 8). The CC was the limiting criteria for all plots (Figure 5).

se incrementaron gradualmente con los intervalos de valores (Cuadro 7).

Calificación de los subcriterios con funciones de calificación lineal

La función de "valor óptimo" se utilizó para CC, SC y SaC, donde se dio el valor de 1 para el intervalo de 30-35%. Dado que no existe un valor superior a 30%, en el contenido de arcilla se obtuvo una gráfica de incremento lineal en el intervalo de 0-1. En contraste con el contenido de arcilla, no existe un valor por debajo del 35% en el contenido de arena; y se generó entonces una gráfica lineal decreciente. En el contenido de limo, la calificación aumentó hasta el intervalo óptimo (30-35%) y luego disminuyó. En esta investigación, la función "más es mejor" se aplicó para OM, MWD, FC, WP y AS (Figura 3).

Índice aditivo de calidad del suelo (SQI_A)

El SQI_A aumentó en el orden de L₁ (0.359) < L₂ (0.564) < L₃ (0.625) < L₄ (0.649) < L₅ (0.681) (Figura 4). La calificación más baja de SQI_A se observó en el delta activo, donde L₁ es la parcela más cercana al mar. Las calificaciones SQI_A aumentaron gradualmente a medida que aumentaba la distancia de las parcelas al mar, hasta la zona de formación inicial del delta donde el valor más alto se alcanzó en las parcelas L₅. La prueba de ANDEVA mostró que las diferencias entre los SQI_A de las parcelas fueron estadísticamente significativas (Cuadro 8). El CC fue el criterio limitante para todas las parcelas (Figura 5).

Índice ponderado de calidad del suelo por AHP (SQI_{AHP})

Los valores obtenidos del SQI_{AHP} en las parcelas fueron 0.312, 0.540, 0.576, 0.614 y 0.619 para L₁, L₂, L₃, L₄ y L₅, respectivamente (Figura 6). El SQI_{AHP} más bajo se calculó en el delta activo (L₁) y los valores aumentaron gradualmente hasta alcanzar el valor más alto en la parcela L₅. Los resultados del ANDEVA mostraron que las diferencias en los valores de SQI_{AHP} entre las parcelas fueron estadísticamente significativas (Cuadro 9). SaC y MWD fueron los criterios limitantes para el SQI_{AHP} en todas las parcelas (Figura 7).

Table 7. The scores of the sub-criteria.
Cuadro 7. Calificaciones de los subcriterios.

Main criteria	Sub-criteria	Score	Main criteria	Sub-criteria	Score	
CC	<10%	0.1	MWD	<0.125mm	0.1	
	10-15%	0.3		0.125-0.250mm	0.3	
	15-20%	0.4		0.25-0.50mm	0.5	
	20-25%	0.5		0.50-0.75mm	0.7	
	25-30%	0.7		0.75-1.00mm	0.9	
	30-35%	1		>1mm	1	
	35-40%	0.9		OM	0.70-1.00%	0.1
	40-45%	0.7			1.00-1.70%	0.3
	45-50%	0.3			1.70-3.00%	0.5
>50%	0.1	3.00-5.15%	0.8			
		>5.15%	1			
SC	<10%	0.1	AS	<50%	0.1	
	10-15%	0.3		50-60%	0.3	
	15-20%	0.4		60-70%	0.5	
	20-25%	0.5		70-80%	0.7	
	25-30%	0.7		80-90%	0.9	
	30-35%	1		90-100%	1	
	35-40%	0.9		<%2	0.1	
	40-45%	0.7		%2-4	0.3	
	45-50%	0.3		%4-6	0.5	
>50%	0.1	%6-8	0.8			
SaC	<10%	0.1	WP	>%8	1	
	10-15%	0.3		<%5	0.1	
	15-20%	0.4		%5-10	0.3	
	20-25%	0.5		%10-15	0.5	
	25-30%	0.7		%15-20	0.8	
	30-35%	1		%20-25	0.9	
	35-40%	0.9		>%25	1	
	40-45%	0.7				
	45-50%	0.3				
>50%	0.1					

CC: Clay content; SC: Silt content; SaC: Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point. ♦ CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

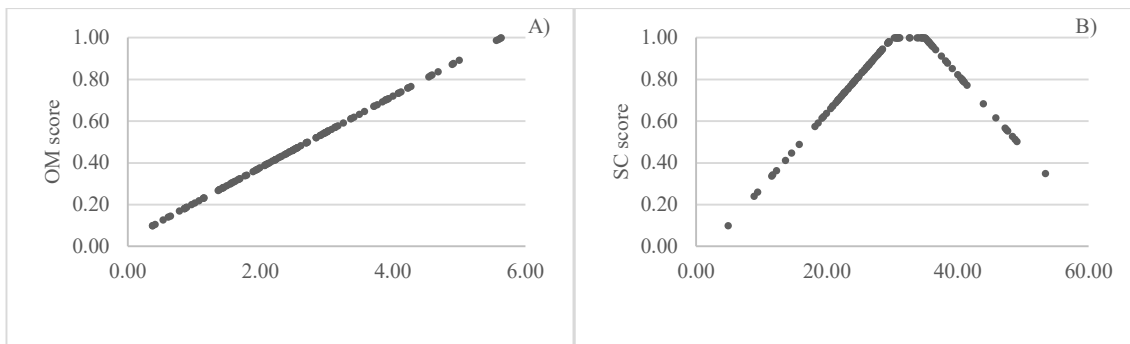


Figure 3. The score examples for “more is better” (organic matter content, A) and “optimum range” (silt content, B).
Figure 3. Los ejemplos de calificación para “más es mejor” (contenido de materia orgánica, A) e “intervalo óptimo” (contenido de limo, B).

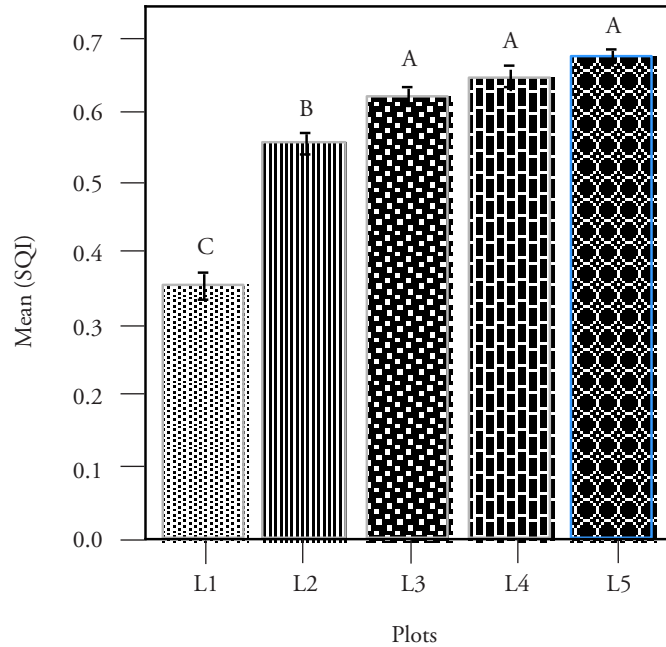


Figure 4. Mean value of SQI in five plots.

Columns with different letters are statistically different (Tukey; $p \leq 0.01$).

Figure 4. Valor medio de SQI en cinco parcelas.

Las columnas con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.01$).

Table 8. Analysis of variance for SQI_A .
Cuadro 8. Análisis de varianza para SQI_A .

Sources	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F ratio	Prob>F
Model	4	1.65	0.41	75.96	<0.0001
Error	120	0.65	0.01		
Total	124	2.30			

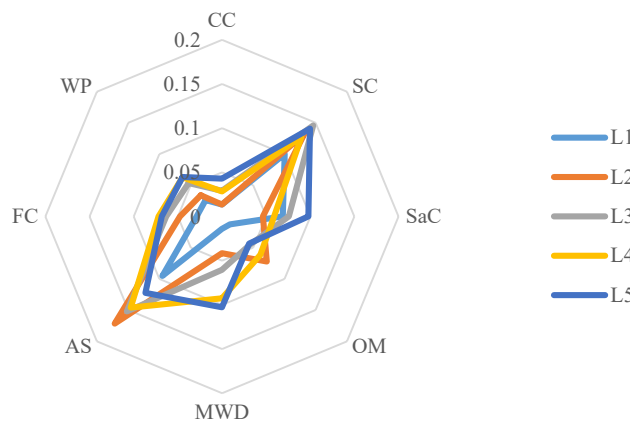


Figure 5. Radar plot of limiting criteria in SQI_A .

CC: Clay content; SC: Silt content; SaC: Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point.

Figura 5. Gráfico de radar de los criterios limitantes en SQI_A .

CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

Weighted soil quality index using AHP (SQI_{AHP})

The calculated SQI_{AHP} scores across the plots were 0.312, 0.540, 0.576, 0.614 and 0.619 for L₁, L₂, L₃, L₄, and L₅, respectively (Figure 6). The lowest SQI_{AHP} was calculated in the active delta (L₁), and the values increased gradually until they reached the highest value in the L₅ plot. The results of ANOVA showed that the differences in SQI_{AHP} values across the plots were statistically significant (Table 9). SaC and MWD were the limiting criteria for the SQI_{AHP} in all plots (Figure 7).

Índice ponderado de calidad del suelo por medio de análisis de factores (SQI_{FA})

Los valores de SQI_{FA} difirieron significativamente entre las parcelas (Cuadro 10). Los resultados de SQI_{FA} en las parcelas L₃, L₄ y L₅ fueron significativamente mayores que en L₂ y L₁, mientras que el SQI_{FA} en la parcela L₁ fue significativamente menor que en L₂ (Figura 8). En forma similar a los SQI_{AHP}, los valores de SQI_{FA} aumentaron gradualmente desde el mar hacia la montaña. Los criterios limitantes en este método fueron CC y OM (Figura 9).

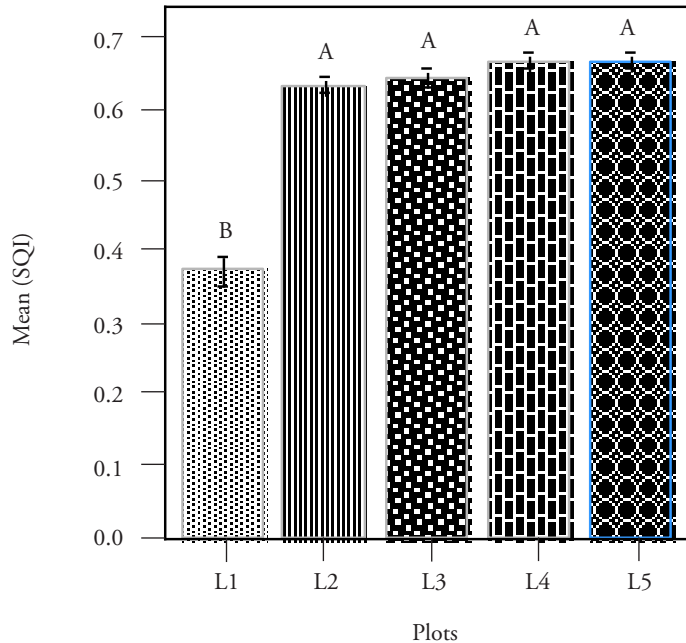


Figure 6. Mean values of SQI_{AHP} in five plots.

Columns with different letters are statistically significant (Tukey; p ≤ 0.01).

Figure 6. Valores medios de SQI_{AHP} en cinco parcelas.

Las columnas con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey; p ≤ 0.01).

Table 9. Analysis of variance for SQI_{AHP}
Cuadro 9. Análisis de varianza para SQI_{AHP}

Sources	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F ratio	Prob>F
Model	4	1.57	0.39	81.99	<0.0001
Error	120	0.58	0.01		
Total	124	2.15			

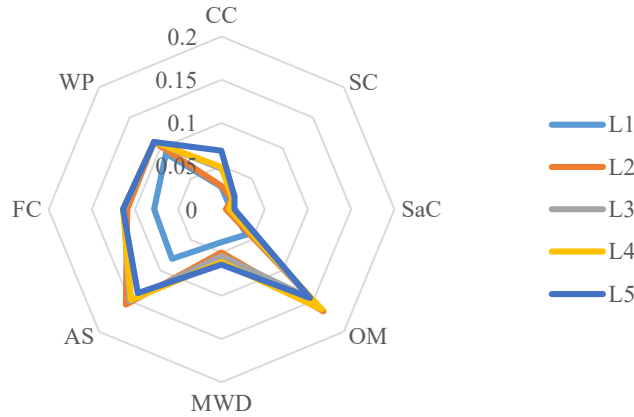


Figure 7. Radar plot of limiting criteria in SQI_{AHP}

CC: Clay content; SC: Silt content; SaC: Sand content; OM: Organic matter; MWD: Mean weight diameter; AS: Aggregate stability; FC: Field capacity; WP: Wilting point.

Figure 7. Gráfico de radar de los criterios limitantes en SQI_{AHP}

CC: contenido de arcilla; SC: contenido de limo; SaC: contenido de arena; OM: materia orgánica; MWD: diámetro medio ponderado; AS: estabilidad de los agregados; FC: capacidad de campo; WP: punto de marchitez permanente.

Weighted soil quality index using factor analysis (SQI_{FA})

The SQI_{FA} values differed significantly among the plots (Table 10). The results showed that the SQI_{FA} in the L₃, L₄, and L₅ plots were significantly higher than L₂ and L₁, while the SQI_{FA} in the L₁ plot was significantly lower than that in L₂ (Figure 8). Similar to the SQI_{AHP}, the SQI_{FA} score increased gradually from the sea toward the mountain. The limiting criteria in this method were CC and OM (Figure 9).

The evaluation methods showed that the SQI gradually increased from the coast to the inland. Because of the on-going accumulation and soil formation processes, and wave erosion in the active delta (Li *et al.*, 2015) the lowest sub-criteria scores and the SQI (L₁) were expected. The soil quality in this area was limited by low OM and CC. Low clay and organic matter contents affect soil physical properties such as the mean weight diameter, aggregate stability and water retention negatively (Yang *et al.*, 2014).

Los métodos de evaluación mostraron que el SQI aumentó gradualmente desde la costa hacia el interior. Debido a los procesos continuos de acumulación y formación del suelo, y la erosión de las olas en el delta activo (Li *et al.*, 2015), aquí se esperaban los niveles de más bajos de calificación de los subcriterios y del SQI (L₁). La calidad del suelo en esta área se vio afectada por los niveles bajos de MO y CC. Los contenidos bajos de arcilla y materia orgánica afectan las propiedades físicas del suelo tales como el diámetro medio ponderado, la estabilidad de los agregados y la retención de agua, en forma negativa (Yang *et al.*, 2014).

El SQI aumentó de manera gradual en la llanura deltaica inferior, en L₂ y L₃, cubiertas principalmente por una pradera natural. En estas áreas, la calidad del suelo tiene como limitante bajos CC; pero estuvo asegurada por una tasa máxima de contribución de OM. La principal razón para el contenido alto de materia orgánica en esta zona fue la cantidad elevada de biomasa (Carvalho-dos Santos *et al.*, 2012; Novara

Table 10 Analysis of variance for SQI_{FA}
Cuadro 10. Análisis de varianza para SQI_{FA}.

Sources	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F ratio	Prob>F
Model	4	1.61	0.40	60.75	<0.0001
Error	120	0.80	0.01		
Total	124	2.41			

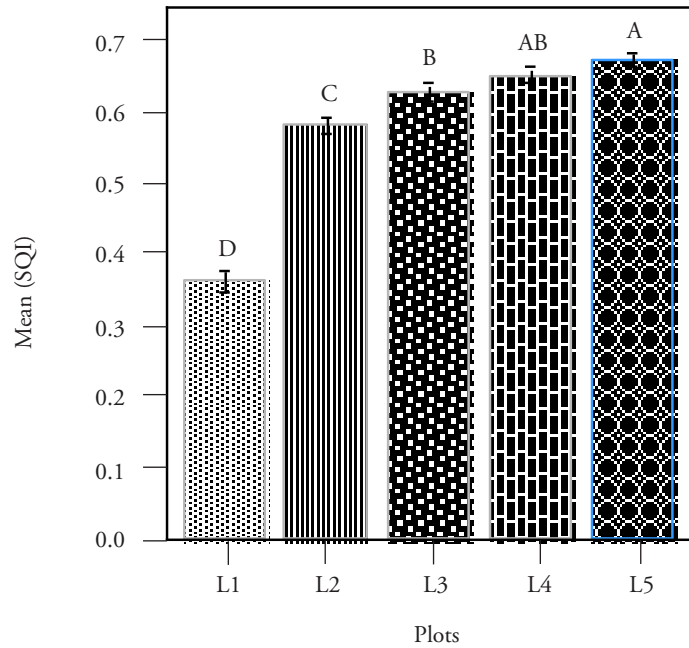


Figure 8. Mean values of SQI_{FA} in five plots. Columns with different letters are statistically different (Tukey; $p \leq 0.01$).

Figure 8. Valores medios de SQI_{FA} en cinco parcelas. Las columnas con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.01$).

SQI increased gradually in the lower deltaic plain (L_2 and L_3), which were mainly covered by a natural meadow. In these areas, the soil quality is limited by low CC. Soil quality was ensured in these areas by the maximum rate of contribution of OM. The main reason for the high content of organic matter in this area was the high biomass (Carvalho-dos Santos *et al.*, 2012; Novara *et al.*, 2013). These plots are younger than the upper deltaic plains, thus the soil quality

et al., 2013). Estas parcelas son más jóvenes que las llanuras deltaicas superiores; por lo tanto, la calidad del suelo fue menor que las de la llanura deltaica superior debido a la distribución del tamaño de los agregados y a una estructura más débil.

El SQI mayor se obtuvo en las llanuras deltaicas superiores (L_4 y L_5), que estaban más alejadas del mar; por tanto, estas parcelas constituyeron la primera área de depósitos del delta. En estas parcelas, CC

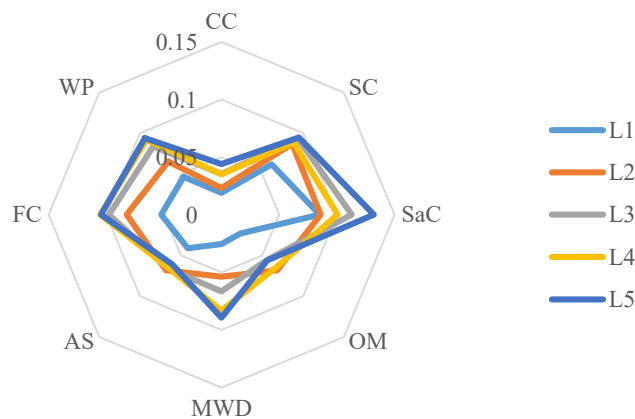


Figure 9. Radar plot of limiting criteria in SQI_{FA}.

Figure 9. Gráfico de radar de los criterios limitantes en SQI_{FA}.

was lower than those in the upper deltaic plain due to grain size distribution and weak structure.

The highest SQI was obtained in the upper deltaic plains (L_4 and L_5), which were farthest from the sea; thus, these plots were the first deposited area of the delta. In those plots, CC and OM limited the SQI. However, the strongest effects of the AS and MWD on the SQI were obtained in them. The main reason for the low OM content is cultivation. In the agricultural field, management practices, especially soil tillage, decrease organic matter content due to high mineralization rates (Cates *et al.*, 2016; Blanco-Moure *et al.*, 2016).

Comparison of methods

The variance analysis determined that the score obtained by the SQI_{AHP} method (0.602) was not different to SQI_A (0.575) and SQI_{FA} (0.564) (Figure 10) ($F=2.628$; $p > 0.05$). Vasu *et al.* (2016) and Nabiollahi *et al.* (2018) reported that SQI values were calculated in the following order: expert opinion>additive model>weighted model.

CONCLUSIONS

The three methods utilized to calculate the soil quality index (Additive Soil Quality Index, Weighted soil quality index using Analytic hierarchy process, and Weighted soil quality index using Factor Analysis) showed similar results. In the factor

y OM limitaron el SQI. Sin embargo, fue en ellas donde se obtuvieron los efectos mayores de la AS y MWD sobre el SQI. La razón principal del contenido bajo de OM es el cultivo. En el campo agrícola, las prácticas de manejo, especialmente la labranza del suelo, disminuyen el contenido de materia orgánica debido a las tasas altas de mineralización (Cates *et al.*, 2016; Blanco-Moure *et al.*, 2016).

Comparación de métodos

Con el análisis de la varianza, se determinó que los valores obtenidos por el método SQI_{AHP} (0.602) no fueron diferentes a SQI_A (0.575) y SQI_{FA} (0.564) (Figura 10) ($F = 2.628$; $p > 0.05$). Vasu *et al.* (2016) y Nabiollahi *et al.* (2018) informaron que los valores del SQI se calcularon en el siguiente orden: opinión de expertos> modelo aditivo> modelo ponderado.

CONCLUSIONES

Los tres métodos utilizados para calcular el índice de calidad del suelo (índice aditivo de calidad del suelo, índice ponderado de calidad del suelo por medio de el proceso analítico jerárquico y el índice ponderado de calidad del suelo por medio de el análisis de factores) mostraron resultados similares. En el análisis de factores, se eliminó la subjetividad dada por la opinión de expertos y se realizó la ponderación por medio de considerar las relaciones entre propiedades.

Con los métodos de proceso analítico jerárquico, se puede juzgar la coherencia del modelo por medio de un valor de índice de coherencia. Por lo tanto, estos análisis se pueden recomendar para evaluar la calidad del suelo de manera más consistente. El índice de calidad del suelo varió en el delta de Batumi, con valores entre 0.30 y 0.70. En los tres métodos, el índice de calidad del suelo aumentó gradualmente a partir del área del delta activo, con el proceso de acumulación continua, hacia las llanuras deltaicas inferior y superior, formadas en tiempos pasados.

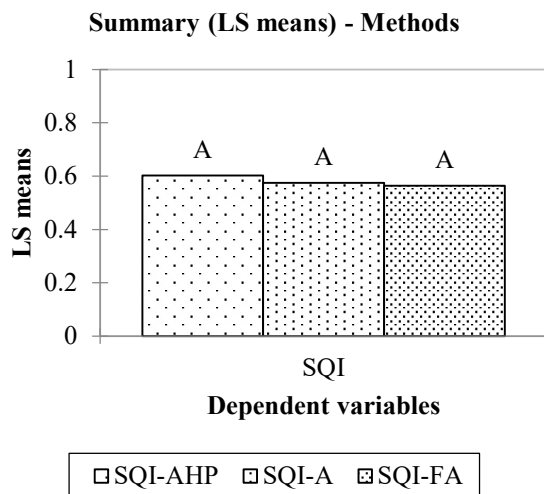


Figure 10. Least significant means of methods.
 Figure 10. Valores medios significativos mínimos de los métodos.

—End of the English version—



analysis, the subjectivity due to expert opinion was eliminated and weighting was made by considering the relationships between properties.

In the Analytic hierarchy process methods, judgment can be made about the consistency of the model by using a consistency index value. Thus, these analyses can be recommended for assessing soil quality more consistently. Soil quality index varied in the Batumi Delta and ranged from 0.30 to 0.70. In all three methods, the soil quality index gradually increased from the active delta area where the accumulation process continues towards the lower and upper deltaic plain formed in earlier times.

LITERATURE CITED

- Akinci, H., A.Y. Ozalp, and B. Turgut. 2013. Agricultural land use suitability analysis using GIS and AHP technique. *Comput. Electron. Agr.* 97: 71–82.
- Blanco-Moure, N., R. Gracia, A.C. Bielsa, and M. V. López. 2016. Soil organic matter fractions as affected by tillage and soil texture under semiarid Mediterranean conditions. *Soil Tillage Res.* 155:381–389. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2015.08.011>.
- Borrelli, P., P. Panagos, M. Märker, and B. S. Modugno. 2017. Assessment of the impacts of clear-cutting on soil loss by water erosion in Italian forests: First comprehensive monitoring and modelling approach. *CATENA*, 149: 770–781.
- Carvalho-dos Santos, D., C. L. Rodrigues-de Lima, C. Naitlo-Pillon, J. M. Filippini-Alba, C. Machado-da Rosa, and M. Oliveira-Farias. 2012. Organic matter distribution in classes of aggregates of a red clay Latosol under forestry and pastures. *Agrociencia*. 46: 231–241.
- Cates, A. M., M. D. Ruark, and J. L. Hedtcke. 2016. Longterm tillage, rotation and perennialization effects on particulate and aggregate soil organic matter. *Soil Tillage Res.* 155:371–380. <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2015.09.008>.
- de Paul Obade, V., and R. Lal. 2016. A standardized soil quality index for diverse field conditions. *Sci. Total Environ.* 541: 424–434. doi: [10.1016/j.scitotenv.2015.09.096](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.096).
- Doran, J. W., and T. B. Parkin. 1994. Defining and assessing soil quality. Doran, J. W. D. C. Coleman, D. F. Bezdicek, and A. B. Stewart (eds). *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, USA. Sp.Pub.35: 3–21.
- Guo, L., Z. Sun, Z. Ouyang, D. Han, and F. Li. 2017. A comparison of soil quality evaluation methods for Fluvisol along the lower Yellow River. *CATENA* 152: 135–143.
- Johnson, R. A., and D. W. Wichern. 1992. *Applied Multivariate Statistical Analysis*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 513 p.
- Karlen, D. L., C. A. Ditzler, and S. S. Andrews. 2003. Soil quality: Why and how? *Geoderma*. 114: 3–4.
- Kundu, S., D. Khare, and A. Mondal. 2017. Landuse change impact on sub-watersheds prioritization by analytical hierarchy process (AHP). *Ecol. Inform.* 42: 100–113.
- Leite Chaves, H.M., C.M. Concha Lozada, and R.O. Gaspar. 2017. Soil quality index of an Oxisol under different land uses in the Brazilian savannah. *Geoderma Regional*. 10: 183–190.
- Li, Y., H. Zhang, C. Tu, F. Song, and Y. Luo. 2015. Occurrence of red clay horizon in soil profiles of the Yellow River Delta: Implications for accumulation of heavy metals. *J. Geochem. Explor.* 176: 120–127.
- Liu, J., L. Wu, D. Chen, M. Li, and C. Wei. 2017. Soil quality assessment of different *Camellia oleifera* stands in mid-subtropical China. *Appl. Soil Ecol.* 113: 29–35.
- Lu Y, H. Xu, Y. Wang, and Y. Yang. 2017. Evaluation of water environmental carrying capacity of city in Huaihe River Basin based on the AHP method: A case in Huai'an City. *Water Resour. Ind.* 18: 71–77. doi: [10.1016/J.WRI.2017.10.001](https://doi.org/10.1016/J.WRI.2017.10.001)
- Nabiollahi, K., F. Golmohamadi, R. Taghizadeh-Mehrjardi, R. Kerry, and M. Davari. 2018. Assessing the effects of slope gradient and land use change on soil quality degradation through digital mapping of soil quality indices and soil loss rate. *Geoderma*. 318: 16–28. doi: [10.1016/J.GEODERMA.2017.12.024](https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2017.12.024)
- Novara, A., L. Gristina, J. Rühl, S. Pasta, G. D. Angelo, T. La Mantia, and P. Pereira. 2013. Grassland fire effect on soil organic carbon reservoirs in semiarid environment. *Solid Earth Discuss.* 4: 381–385. doi: [10.5194/sed-5-883-2013](https://doi.org/10.5194/sed-5-883-2013)
- Saaty, T.L., 1994. *Fundamentals of Decision Making and Priority Theory with the AHP*. RWS Publications, Pittsburgh, PA, USA, 14 p.
- Sánchez-Navarro, A., J. M. Gil-Vázquez, M. J. Delgado-Iniesta, P. Marín-Sanleandro, A. Blanco-Bernardeau, and R. Ortiz-Silla. 2015. Establishing an index and identification of limiting parameters for characterizing soil quality in Mediterranean ecosystems. *Catena*. 131: 35–45
- Turgut, B., and M. Ateş. 2017. Factors of soil diversity in the Batumi delta (Georgia). *Solid Earth*. 8:1–12. doi: [10.5194/se-8-1-2017](https://doi.org/10.5194/se-8-1-2017)
- Vasu, D., S. K. Singh, S. K. Ray, V. P. Duraisami, P. Tiwary, P. Chandran, A. M. Nimkar, and S. G. Anantwar. 2016. Soil quality index (SQI) as a tool to evaluate crop productivity in semi-arid Deccan plateau, India. *Geoderma*. 282: 70–79. doi: [10.1016/J.GEODERMA.2016.07.010](https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2016.07.010)
- Yang, F., G-L. Zhang, J-L. Yang, D-C. Li, Y-G. Zhao, F. Liu, R-M. Yang, and F. Yang. 2014. Organic matter controls of soil water retention in an alpine grassland and its significance for hydrological processes. *J. Hydrol.* 519: 3086–3093. doi: [10.1016/j.jhydrol.2014.10.054](https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2014.10.054)

HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES ASOCIADOS CON EL CULTIVO DE MAÍZ EN REGIONES CON SEQUÍA EN OAXACA

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH MAIZE CROP IN DROUGHT REGIONS OF OAXACA

Artemio Méndez-Matias¹, Celerino Robles¹, Laura Hernández-Cuevas²

¹Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Oaxaca, Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, 71230, México (croblesp@ipn.mx), ²Universidad Autónoma de Tlaxcala- CIGyA, 90120 Ixtacuixtla, Tlaxcala, México

RESUMEN

Bajo ambientes estresantes, las plantas se asocian con la microbiota para cumplir adecuadamente funciones múltiples. La asociación planta-hongos micorrícicos arbusculares (HMA) es una de las principales, por la cual las plantas satisfacen parte de sus necesidades hídricas y nutrimentales. El conocimiento de los HMA nativos es un factor clave en el desarrollo, así como la aplicación de esta biotecnología en cultivos de importancia socioeconómica, como el maíz. El objetivo fue conocer la diversidad de HMA y la magnitud de la colonización micorrícica en parcelas de maíz de cuatro regiones con incidencia de sequía. Una asociación significativa se espera entre propiedades de los suelos y la abundancia de esporas, riqueza de especies y colonización micorrícica. Muestras aleatorias se realizaron en cuatro regiones del estado de Oaxaca (Istmo, Sierra Norte, Mixteca y Valles Centrales) y con la técnica de redundancia se analizó la relación de las propiedades fisicoquímicas de los suelos con la riqueza de especies, abundancia de esporas y porcentaje de colonización. Un total de 24 especies de HMA se registraron, de las cuales *Funneliformis geosporum* y *Rhizophagus intraradices* están presentes en las cuatro regiones estudiadas. La asociación de los HMA con las raíces de las plantas de maíz fue mayor de 60%. La abundancia de esporas más alta se registró en la región Sierra Norte. No se observaron diferencias significativas en la riqueza de especies entre las regiones ni por temporada; sin embargo, la región Valles Centrales tuvo el índice de diversidad mayor. Las concentraciones de humedad, nitrógeno total, conductividad eléctrica y fósforo disponible en el suelo se correlacionaron ($p \leq 0.05$) con la diversidad micorrícica de las regiones de estudio. Estos hallazgos indican que la diversidad de hongos micorrícicos en las parcelas de estudio es alta, así como los niveles de colonización mico-

ABSTRACT

Under stressful environments, plants associate with microbiota to adequately fulfill multiple functions. The plant-arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) association is one very important by which plants satisfy part of their water and nutritional needs. The knowledge of native AMF is a key factor in the development and application of this biotechnology in crops of socioeconomic importance, such as maize. The objective was to know the diversity of AMF and the extent of mycorrhizal colonization in maize plots in four regions with drought incidence. A significant association is expected between soil properties and spore abundance, species richness, and mycorrhizal colonization. Random sampling was carried out in four regions of the state of Oaxaca (Istmo, Sierra Norte, Mixteca and Valles Centrales) and the relationship of soil physicochemical properties with species richness, spore abundance, and percentage of colonization was analyzed using the redundancy technique. A total of 24 AMF species were recorded, of which *Funneliformis geosporum* and *Rhizophagus intraradices* are present in the four regions studied. The association of AMF with roots of maize plants was greater than 60%. The highest spore abundance was recorded in the Sierra Norte region. No significant differences in species richness were observed among regions or by season; however, the Valles Centrales region had the highest diversity index. Concentrations of moisture, total nitrogen, electrical conductivity, and available phosphorus in the soil were correlated ($p \leq 0.05$) with mycorrhizal diversity in the study regions. These findings indicate that the diversity of mycorrhizal fungi in the study plots is high, as well as the levels of mycorrhizal colonization (>60%). In addition, five new genera are reported for Oaxaca. This highlights the need to continue the evaluation of mycorrhizal diversity in the state.

Key words: fungal diversity, *Zea mays*, water stress, arbuscular mycorrhizae, Glomeromycota.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2020. Aprobado: noviembre, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 55: 19-35. 2021.

rríca (>60%). Además, se reportan cinco géneros nuevos para Oaxaca, lo cual resalta la necesidad de continuar la evaluación de la diversidad micorrízica del estado.

Palabras clave: diversidad fúngica, *Zea mays*, estrés hídrico, micorriza arbuscular, Glomeromycota.

INTRODUCCIÓN

El estrés hídrico es uno de los principales factores que limitan el crecimiento vegetal y se presenta con regularidad en las zonas tropicales secas del mundo. En la actualidad, el fenómeno de sequía ha aumentado en intensidad, periodicidad y duración, con consecuencias significativas en la seguridad alimentaria, sobre todo en las zonas donde los cultivos de los pequeños productores dependen en su totalidad de la precipitación.

En México, el maíz es el principal componente de la alimentación y, aunado a su valor nutricional, destaca su importancia histórica, cultural y económica (Cázares *et al.*, 2015). La sequía es uno de los fenómenos climáticos con afecto directo en los cultivos de temporal y, dado que en el estado de Oaxaca más del 90% de la superficie se cultiva bajo ese sistema, las consecuencias son graves. Las regiones con mayor afectación son Istmo, Mixteca, Costa y Valles Centrales, con pérdidas promedio de 16.6%, 6.9%, 7.24% y 5.4% de su superficie sembrada (SIAP, 2014).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son un elemento vital en la supervivencia de las plantas bajo ambientes estresantes, porque mejoran la captación de nutrientes, funcionan como bioprotectores y favorecen la absorción de agua (Latef *et al.*, 2016). Esto permite el desarrollo de las plantas bajo condiciones adversas. Las prácticas agrícolas y las condiciones edafoclimáticas son factores determinantes en la abundancia y diversidad de los hongos micorrízicos, y de la microbiota del suelo en general (Alguacil *et al.*, 2014). Durante el periodo entre ciclos de cultivo es probable que se reduzca el potencial de inoculación porque no hay hospedero, y disminuya la micorrización en el ciclo subsecuente.

Además, existe mayor interacción de los HMA con las plantas de maíz durante las fase reproductiva temprana (V12 a R1) debido a la demanda de nutrientes, fósforo (P) de manera principal, que la planta requiere y coincide también con una mayor diversidad de HMA durante esa etapa (Tian *et al.*, 2011). El tipo

INTRODUCTION

Water stress is one of the main factors limiting plant growth and occurs regularly in dry tropical areas of the world. Currently, the phenomenon of drought has increased in intensity, periodicity and duration, with significant consequences on food security, especially in areas where smallholder crops depend entirely on rainfall.

In Mexico, maize is the main component of the diet and, in addition to nutritional value, historical, cultural and economic importance of this staple stand out (Cázares *et al.*, 2015). Drought is one of the climatic phenomena with a direct effect on rainfed crops and, given the fact that in the state of Oaxaca more than 90% of the area is cultivated under this system, the consequences are serious. The regions mostly affected are the Istmo, Mixteca, Costa and Valles Centrales, with average losses of 16.6%, 6.9%, 7.24% and 5.4% of their planted area (SIAP, 2014).

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are a vital element in plant survival under stressful environments because they enhance nutrient uptake, serve as bioprotectants, and favor water uptake (Latef *et al.*, 2016). This enables plant development under adverse conditions. Agricultural practices and edaphoclimatic conditions are determining factors in the abundance and diversity of mycorrhizal fungi, and soil microbiota in general (Alguacil *et al.*, 2014). During the period between crop cycles, it is likely that the inoculation potential is reduced because there is no host, and mycorrhization in the subsequent cycle decreases.

Also, there is greater interaction of AMF with maize plants during the early reproductive phase (V12 to R1) due to the demand for nutrients that the plant requires, mainly phosphorus (P), and there is also a greater diversity of AMF during that stage (Tian *et al.*, 2011). The type of vegetation or crop also has an influence on AMF diversity and abundance; there are generalist morphospecies and others exclusive to certain soil or crop types (Turrini *et al.*, 2018). The farming system and some cultural practices decrease the abundance of AMF communities, and are also likely to exert a significant effect on soil species diversity and richness, which detracts its fertility and health (Alguacil *et al.*, 2014).

de vegetación o cultivo también tiene influencia en la diversidad y abundancia de los HMA; hay morfoespecies generalistas y otras exclusivas de ciertos tipos de suelo o cultivo (Turrini *et al.*, 2018). El sistema de cultivo y las prácticas culturales disminuyen la abundancia de las comunidades de HMA, y es probable que también ejerzan un efecto significativo en la diversidad y la riqueza de especies, lo cual demerita la fertilidad y salud del suelo (Alguacil *et al.*, 2011). La planta de maíz tiene una dependencia alta de la asociación micorrízica arbuscular (Sangabriel-Conde *et al.*, 2015), por lo que es importante conocer las comunidades de HMA presentes en el suelo para diseñar mecanismos con los cuales se podría mejorar el rendimiento del cultivo y la fertilidad de los suelos y, a la vez, mantener la microbiota nativa. El objetivo del presente estudio fue explorar la diversidad de HMA en parcelas de maíz con incidencia de sequía en cuatro regiones del estado de Oaxaca. La diversidad de especies de HMA se espera que sea baja al tratarse de suelos agrícolas, y que la abundancia de esporas, riqueza de especies y colonización de raíces tengan una asociación significativa con las propiedades físicoquímicas de los suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio

Muestras de suelo rizosférico y raíces se recolectaron al azar de parcelas cultivadas con maíz de temporal en las regiones (I) Istmo (16° 34' 08" N, 95° 07' 04" O, 285 m de altitud); (Y) Sierra Norte (17° 12' 59" N, 96° 13' 48" O, 1353 m); (M) Mixteca (17° 24' 11" N, 97° 11' 46" O, 2046 m); y (VC) Valles centrales (16° 53' 38" N, 96° 29' 35" O, 1855 m) del estado de Oaxaca, México. En la región I el tipo de suelo predominante es el Vertisol, mientras que en las otras regiones predominan los suelos de tipo Luvisol, de acuerdo con la base referencial mundial del recurso suelo de la FAO (WRB, 2015). La precipitación en las regiones varía desde 400 mm en M hasta 2000 mm en Y. Las temperaturas máximas y mínimas en Y fluctúan entre 16-24 °C, en M y VC son de 14-20 °C, mientras que la región I es la más cálida (22-28 °C). El sistema de cultivo de maíz es de temporal con semilla nativa de cada región, sin el uso de insumos sintéticos.

Muestreo y análisis físicoquímico del suelo

El muestreo de suelos se realizó durante 2017 en la temporada seca antes del inicio del ciclo de cultivo con suelo en

The maize plant has a high dependence on the arbuscular mycorrhizal association (Sangabriel-Conde *et al.*, 2015), so it is important to know the AMF communities present in the soil in order to design mechanisms that would lead to improve crop yield and soil fertility and, at the same time, maintain the native microbiota. The objective of this study was to explore AMF diversity in maize plots with drought incidence in four regions of the state of Oaxaca. AMF species diversity is expected to be low in agricultural soils, and spore abundance, species richness and root colonization are expected to have a significant association with soil physicochemical properties.

MATERIALS AND METHODS

Study areas

Rhizospheric soil and root samples were randomly collected from plots cultivated with rainfed maize in the regions (I) Istmo (16° 34' 08" N, 95° 07' 04" W, 285 m altitude); (Y) Sierra Norte (17° 12' 59" N, 96° 13' 48" W, 1353 m); (M) Mixteca (17° 24' 11" N, 97° 11' 46" W, 2046 m); and (VC) Valles Centrales (16° 53' 38" N, 96° 29' 35" W, 1855 m), which belong to the state of Oaxaca, Mexico. In region I the predominant soil type is Vertisol, while in the other regions Luvisol type soils predominates, according to the FAO global soil resource reference base (WRB, 2015). Precipitation in the regions varies from 400 mm in M to 2000 mm in Y. Maximum and minimum temperatures in Y fluctuate between 16-24 °C, in M and VC are 14-20 °C, while region I is the warmest (22-28 °C). The maize cultivation system is rainfed with seed native to each region, without the use of synthetic inputs.

Sampling and physicochemical soil analysis

Soil sampling was conducted during 2017 in the dry season before the start of the crop cycle with fallow soil, and in the rainy season with established crop. In each region, samples were collected in three rainfed maize plots, composed of five rhizospheric soil subsamples at 30 cm depth per plot. To obtain a representative sample for each region, soil from the three plots was mixed. The collected samples were transported to the Instituto Politécnico Nacional IPN-CIIDIR soil laboratory in Oaxaca, where they were homogenized and dried in a greenhouse, sieved (2 mm mesh) and stored under refrigeration (~5 °C) for subsequent spore extraction and physicochemical analysis. The variables evaluated were pH and electrical conductivity (CE) with a Hanna potentiometer (model HI98130, Ann Arbor,

barbecho, y en la de lluvias con cultivo establecido. En cada región se recolectaron muestras en tres parcelas de maíz de temporal, compuestas por cinco submuestras de suelo rizosférico a 30 cm de profundidad por parcela. Para obtener una muestra representativa de cada región se realizó una mezcla del suelo de las tres parcelas. Las muestras recolectadas se transportaron al laboratorio de suelos del CIIDIR en Oaxaca, donde se homogeneizaron y secaron en invernadero, se tamizaron (malla de 2 mm) y almacenaron en refrigeración (-5 °C) para la posterior extracción de esporas y análisis fisicoquímico. Las variables evaluadas fueron: pH y conductividad eléctrica (CE) con un potenciómetro Hanna (modelo HI98130, Ann Arbor, MI, USA), contenido de humedad por gravimetría (CH), textura con el higrómetro de Bouyoucos, concentración de materia orgánica (MO) y carbono orgánico (CO) por digestión húmeda de Walkley y Black, fósforo disponible (PO₄) por el método Bray y Kurtz, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002).

Cultivos trampa

Cultivos trampa se establecieron para obtener esporas con mayor calidad que las extraídas de los suelos originales (Guadarrama-Chávez *et al.*, 2007). Como sustrato se utilizó una mezcla de suelo con arena en proporción 1:1 (v: v) desinfectado por solarización e inoculado con 50 g de suelo de la región correspondiente, en contenedores de 0.5 L, durante un ciclo de seis meses en un invernadero del CIIDIR Oaxaca. Tres réplicas se usaron por cada temporada de cada región. El cultivo trampa se estableció con sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) y alfalfa (*Medicago sativa* L.). Los contenedores se colocaron en invernadero, y el riego se suministró a libre demanda durante todo el ciclo. Al final del ciclo se tomaron muestras por triplicado de 50 g para la extracción de esporas.

Extracción de esporas e identificación de especies

La extracción de esporas de HMA se realizó en muestras de 50 g de suelo, tanto en las muestras recolectadas en el campo como de las obtenidas de las plantas trampa, mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) seguido de centrifugación a 580 g, con soluciones al 20 y 60%.

Con un microscopio estereoscópico (Zeigen OLI, Ciudad de México, México) se seleccionaron esporas con estructuras visibles y en buen estado para colocarlas en portaobjetos con alcohol polivinílico en lactoglicerol adicionado con reactivo Melzer (PVLG + Melzer), para el conteo y clasificación de esporas con base en su morfología. La revisión se realizó con un microscopio óptico

MI, USA), moisture content by gravimetry (CH), texture with the Bouyoucos hydrometer, organic matter (MO) and organic carbon (CO) concentration by Walkley and Black wet digestion method, available phosphorus (PO₄) by the Bray and Kurtz method, according to the Mexican Official Standard NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002).

Trap cultures

Trap cultures were established to obtain spores with higher quality than those extracted from the original soils (Guadarrama-Chávez *et al.*, 2007). A mixture of soil with sand in a 1:1 (v: v) ratio, disinfected by solarization and inoculated with 50 g of soil from the corresponding region, in 0.5 L containers, was used as substrate during a six-month cycle in a greenhouse at CIIDIR Oaxaca. Three replicates were used for each season in each region. The trap culture was established with sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). Containers were placed in greenhouses, and irrigation was supplied on demand throughout the cycle. At the end of the cycle, triplicate samples of 50 g were taken for spore extraction.

Spore extraction and species identification

The extraction of AMF spores was carried out on 50 g samples of soil, both from samples collected in the field and from those obtained from trap plants, using the wet sieving and decanting technique (Gerdemann and Nicolson, 1963) followed by centrifugation at 580 g in sucrose gradient, with 20 and 60% solutions.

With a stereo microscope (Zeigen OLI, Mexico City, Mexico), spores with visible structures and in good condition were selected and placed on slides with polyvinyl alcohol in lactoglycerol added with Melzer reagent (PVLG + Melzer) for counting and classification of spores based on their morphology. The examination was performed with an optical microscope (Nikon Optiphot II, Tokyo, Japan) with Nomarski interference contrast and a micrometer ruler attached to one of the eyepieces to measure the spores and their subcellular structures. For species determination, the WVU-International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (WVU-INVAM, 2016) website was consulted. The classification of AMF is stated according to the proposals of Schüßler *et al.* (2001) and Redecker *et al.* (2013).

Mycorrhizal colonization

Roots from the previous crop cycle were collected from the plots during dry season, and roots from the established crop were

(Nikon Optiphot II, Tokio, Japón) con contraste de interferencia de Nomarski y una reglilla micrométrica acoplada a uno de los oculares para medir las esporas y sus estructuras subcelulares. Para la determinación de las especies se consultaron en la página web de la Internacional Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (WVU-INVAM, 2016). La clasificación de los HMA se enuncia de acuerdo con las propuestas de Schüßler *et al.* (2001) y Redecker *et al.* (2013).

Colonización micorrícica

Durante la temporada seca se recolectaron raíces del ciclo de cultivo anterior en las parcelas, y durante la temporada de lluvias se utilizaron raíces del cultivo establecido. Las raíces se lavaron con agua corriente abundante, se aclararon con KOH (10%) y H₂O₂ (2.5%), y se teñieron con azul de tripano 0.05% en ácido láctico al 50% (Phillips y Hayman, 1970). En portaobjetos se colocaron 25 segmentos de la raíz y se observaron en un microscopio compuesto (LEICA DFC230, Heerbrugg, Suiza) a 10X y 40X. El porcentaje de colonización micorrícica se determinó con base en la presencia de estructuras micorrícicas: hifas, arbuscúlos y vesículas, tomando como positiva la presencia de cualquier estructura observada (Giovannetti y Mosse, 1980).

Análisis de datos

La estructura de las comunidades de HMA se caracterizó al determinar la riqueza de especies, así como el número total y la abundancia relativa de las esporas. Respecto al estudio ecológico se determinaron los índices de diversidad de Shannon y de Margalef. Para evaluar la similitud en la composición de especies entre regiones se calculó el índice de Morisita. Un escalamiento multidimensional no paramétrico (NMDS), basado en la distancia de Bray-Curtis, se utilizó para analizar la distribución espacial de las comunidades micorrícicas de las cuatro regiones en las dos temporadas, y se realizó un análisis multivariado con base en permutaciones (PERMANOVA) para evaluar las diferencias significativas (Rodríguez-Caballero *et al.*, 2017).

Un análisis de varianza (ANDEVA) y luego la prueba de comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) se realizaron para los índices de diversidad, abundancia de esporas y riqueza de especies. El diseño experimental fue completamente al azar, y cada una de las regiones se consideró como tratamiento. El análisis de redundancia (RDA) se utilizó para evaluar la relación entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y la distribución de las especies de HMA en las cuatro regiones. Los datos de las propiedades físicas y químicas de los suelos de las parcelas muestreadas no se distribuyen de manera normal; por lo tanto, se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

used during the rainy season. Roots were washed with abundant tap water, rinsed with KOH (10%) and H₂O₂ (2.5%), and stained with 0.05% trypan blue in 50% lactic acid (Phillips and Hayman, 1970). Twenty-five root segments were placed on slides and observed under a compound microscope (LEICA DFC230, Heerbrugg, Switzerland) at 10X and 40X. The percentage of mycorrhizal colonization was determined based on the presence of mycorrhizal structures: hyphae, arbuscules, and vesicles, taking as positive the presence of any structure observed (Giovannetti and Mosse, 1980).

Data analysis

The structure of AMF communities was characterized by determining species richness, as well as the total number and relative abundance of spores. Regarding the ecological study, the Shannon and Margalef diversity indexes were determined. To evaluate the similarity in species composition between regions, the Morisita index was calculated. A non-metric multidimensional scaling (NMDS), based on the Bray-Curtis distance, was used to analyze the spatial distribution of the mycorrhizal communities of the four regions in the two seasons, and a permutation-based multivariate analysis (PERMANOVA) was performed to evaluate significant differences (Rodríguez-Caballero *et al.*, 2017).

An analysis of variance (ANOVA) was run and then a test of means (Tukey, $p \leq 0.05$) for diversity indexes, spore abundance and species richness. The experimental design was completely randomized, and each of the regions was considered as a treatment. Redundancy analysis (RDA) was used to evaluate the relationship between soil physicochemical properties and AMF species distribution in the four regions. Soil physical and chemical properties data from the sampled plots were not normally distributed; therefore, they were analyzed with the Kruskal-Wallis nonparametric test.

The influence of soil properties on AMF spore abundance was analyzed using the generalized linear model (GLM) and Poisson regression. To evaluate the significance between seasons in the Shannon index, Margalef index, mycorrhizal colonization, and spore abundance, a two-way analysis of variance was performed with two factors: region and sampling season. When significance was found, the t-student test ($p \leq 0.05$) was applied by region to compare significance between seasons in each region. Data were analyzed with R Studio software (RStudio Team, 2015).

RESULTS AND DISCUSSION

Soil physicochemical characterization

The Kruskal-Wallis test indicated significant differences in the physicochemical properties of the

Con el modelo lineal generalizado (GLM) y la regresión de Poisson se analizó la influencia de las propiedades del suelo en la abundancia de esporas de HMA. Para evaluar significancia entre temporadas en los índices de Shannon y de Margalef, colonización micorrícica y abundancia de esporas se realizó un análisis de varianza de dos vías: región y temporada de muestreo, al encontrar significancia se aplicó la prueba de t-student ($p \leq 0.05$) por región para comparar significancia entre temporadas en cada región. Los datos se analizaron con el paquete estadístico R (R Studio Team, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica del suelo

La prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas en las propiedades fisicoquímicas de los suelos entre las cuatro regiones estudiadas. El pH del suelo de la región I es moderadamente ácido, y en las demás regiones es neutro. En la región VC se registraron los valores menores de CE, CH, MO y CO; pero tuvo el valor mayor de PO_4 . La región M tuvo CH mayor, mientras que la concentración más alta de MO y CO se registró en el suelo de la región Y. Los suelos de las regiones I e Y tuvieron una textura franco-arenosa, en tanto que en el suelo de la región M la textura fue franca y en la región VC, areno-francosa (Cuadro 1).

soils among the four regions studied. Soil pH in region I is moderately acidic, and in the other regions it is neutral. Region VC had the lowest values of CE, CH, MO and CO, but the highest value of PO_4 . Region M had the highest CH, while the highest concentration of MO and CO was recorded in the soil of region Y. The soils of regions I and Y had a sandy loam texture, while in the soil of region M the texture was loam and in region VC was loamy sand (Table 1).

Mycorrhizal colonization

Mycorrhizal colonization of maize did not vary between regions (Tukey $p > 0.05$). But there was significance between seasons ($p = 0.012$) in region Y (t-student $p \leq 0.05$), with a higher colonization value in the rainy season (Figure 1). The association observed between the type of management in each plot was notorious; mycorrhizal colonization of roots tended to be lower where intensive monoculture was carried out (Soka and Ritchie, 2018); and in plots where native seed was used, mycorrhizal colonization of maize plants was higher (Sangabriel-Conde *et al.*, 2015). Another factor for differences was the sampling season; in this research there was higher mycorrhizal colonization in the wet season, which agrees with data reported by Alvarez-Lopezello *et al.*

Cuadro 1. Descripción de las propiedades físicas y químicas de los suelos de las regiones: Istmo (I), Sierra Norte (Y), Mixteca (M) y Valles centrales (VC) del estado de Oaxaca, México, con cultivo de maíz de temporal.

Table 1. Description of the physical and chemical properties of the soils of the regions: Istmo (I), Sierra Norte (Y), Mixteca (M) and Valles Centrales (VC) of the state of Oaxaca, Mexico, with rainfed maize crop.

Propiedades	I	Y	M	VC
pH (H ₂ O)	5.62 ± 0.17	6.64 ± 0.06	6.56 ± 0.17	6.88 ± 0.03
CE (dS m ⁻¹)	0.24 ± 0.01	0.43 ± 0.03	0.18 ± 0.006	0.11 ± 0.003
CH (%)	1.67 ± 0.03	1.98 ± 0.01	2.38 ± 0.03	1.66 ± 0.01
MO (%)	1.56 ± 0.23	6.59 ± 0.37	1.86 ± 0.20	1.04 ± 0.08
CO (%)	0.91 ± 0.13	3.82 ± 0.21	1.08 ± 0.11	0.61 ± 0.40
PO ₄ (mg kg ⁻¹)	2.45 ± 0.14	14.45 ± 0.69	2.98 ± 0.61	49.4 ± 1.20
Textura	Franco-arenoso	Franco-arenoso	Franco	Areno-francoso

CE: conductividad eléctrica; CH; contenido de humedad; MO: contenido de materia orgánica; CO: carbono orgánico; PO₄: fósforo disponible Bray. ♦ CE: electric conductivity; CH: moisture content; MO: organic matter content; CO: organic carbon; PO₄: Bray available phosphorus.

Colonización micorrícica

La colonización micorrícica del maíz no varió entre las regiones (Tukey $p>0.05$). Pero hubo significancia entre temporadas ($p=0.012$) en la región Y (t-student $p\leq 0.05$), con un valor de colonización mayor en la temporada de lluvias (Figura 1). La asociación observada entre el tipo de manejo en cada parcela fue notoria; la colonización micorrícica de las raíces tendió a ser menor donde se realizó monocultivo intensivo (Soka y Ritchie, 2018), y en las parcelas donde se utilizó semilla nativa, la colonización micorrícica de las plantas de maíz fue mayor (Sangabriel-Conde *et al.*, 2015). Otro factor para diferencias fue la temporada de muestreo; en esta investigación hubo una colonización micorrícica mayor en la temporada húmeda, lo cual coincide con lo documentado por Álvarez-Lopezello *et al.* (2019). La colonización observada en la región Y puede deberse a la perturbación mínima que se realiza en el suelo, y a la

(2019). The colonization observed in the region Y may be due to the minimal disturbance to the soil and the rapid recovery of native vegetation, which may favor the multiplication of mycorrhizal communities and increase the probability of interaction with the crop in the following season (Hijri *et al.*, 2006).

Composition of AMF communities

The AMF species reported belong to the families Glomeraceae (29.2%), Acaulosporaceae (20.8%), Claroideoglomeraceae (16.7%), Gigasporaceae (16.7%), Ambisporaceae (8.3%), Entrophoraceae (4.2%), and Paraglomeraceae (4.2%), which represent about 54% of the total number of families belonging to Glomeromycota (Table 2). In the soils of maize plots, 24 species were recorded, about 8% of those described in the world and 16% of those reported in Mexico (Chimal-Sánchez *et al.*, 2020). In regions M and VC 14 species were recorded, while in regions I and Y there are 12 and 11, respectively.

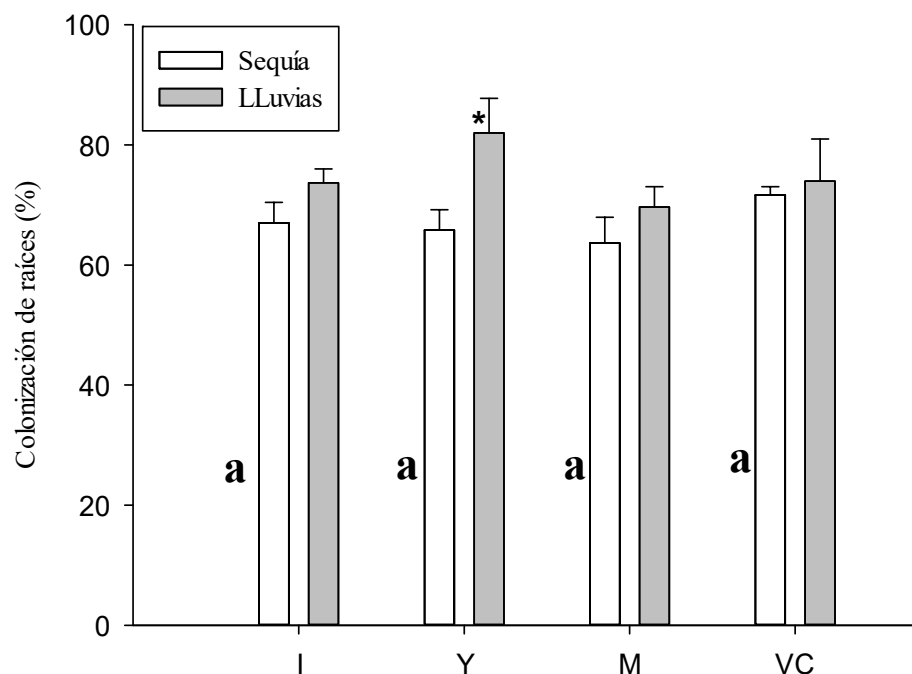


Figura 1. Colonización micorrícica de maíz en cultivo de temporal de las regiones Istmo (I), Sierra norte (Y), Mixteca (M) y Valles centrales (VC) del estado de Oaxaca, México, durante las temporadas de secas y lluvias. Las barras representan promedios \pm error estándar. Sin diferencia estadística (Tukey, $p\leq 0.05$, $n=36$). *Diferencia significativa entre la misma región para las dos temporadas (t-student, $p\leq 0.05$).

Figure 1. Mycorrhizal colonization of maize in rainfed crops in the Istmo (I), Sierra Norte (Y), Mixteca (M) and Valles centrales (VC) regions of the state of Oaxaca, Mexico, during dry and rainy seasons. The bars represent means \pm standard error. Values with no statistical difference (Tukey, $p\leq 0.05$, $n=36$). *Significant difference between the two seasons in the same region (t-student, $p\leq 0.05$).

recuperación rápida de la vegetación nativa, lo cual puede favorecer la multiplicación de las comunidades micorrícicas, y aumentar la probabilidad de interacción con el cultivo en la siguiente temporada (Hijri *et al.*, 2006).

Composición de las comunidades de HMA

Las especies de HMA reportadas pertenecen a las familias Glomeraceae (29.2%), Acaulosporaceae (20.8%), Claroideoglomeraceae (16.7%), Gigasporaceae (16.7%), Ambisporaceae (8.3%), Entrophosporaceae (4.2%) y Paraglomeraceae (4.2%), las cuales representan cerca del 54% del total de familias pertenecientes a Glomeromycota (Cuadro 2). En los suelos de las parcelas de maíz se registraron 24 especies, cerca de el 8% de las descritas en el mundo y 16% de las reportadas en México (Chimal-Sánchez *et al.*, 2020). En las regiones M y VC se registraron 14 especies, mientras que en las regiones I e Y hay 12 y 11, respectivamente.

Las especies presentes en las cuatro regiones de estudio *F. geosporum* y *R. intraradices*, tienen también los valores mayores de AR, lo cual coincide con lo indicado por Reyes-Jaramillo *et al.* (2019) quienes reportaron a *F. mosseae* y *R. intraradices* como especies generalistas. Guadarrama-Chávez *et al.* (2007) también observaron a *F. geosporum* en zonas semiáridas de México.

En las regiones I e Y se registró un número mayor de especies de HMA en la temporada de lluvias, y en las regiones M y VC el número de especies mayor se encontró en la temporada seca. A pesar de esto, la riqueza de especies no fue diferente ($p > 0.05$) entre regiones ni entre temporadas.

La abundancia de esporas en los suelos de las regiones I y VC fue mayor en la temporada húmeda, en la región Y el número de esporas mayor ocurrió en la temporada seca, y en la región M la abundancia total de esporas no difirió entre temporadas. La abundancia de esporas fue mayor en la región Y (Tukey, $p \leq 0.05$) en ambas temporadas (Figura 2). La cantidad de esporas aumentó cuando la planta de maíz entró a la fase reproductiva (R1) con un decremento conforme avanzó dicha fase (Tian *et al.*, 2011), pero solo en la región VC se observó dicha tendencia, ya que en la región Y la abundancia disminuyó significativamente durante la temporada húmeda (Figura 2).

La riqueza de especies no tuvo variación entre temporadas, pero la abundancia de esporas si registró

Species present in the four study regions, *F. geosporum* and *R. intraradices*, also have the highest AR values; this finding coincides with Reyes-Jaramillo *et al.* (2019) who reported *F. mosseae* and *R. intraradices* as generalist species. Guadarrama-Chávez *et al.* (2007) also observed *F. geosporum* in semiarid regions of Mexico.

In regions I and Y a higher number of AMF species was recorded in the rainy season, and in regions M and VC the highest number of species was found in the dry season. Despite this, species richness was not different ($p > 0.05$) between regions or seasons.

Spore abundance in the soils of regions I and VC was higher in the wet season, in region Y the highest number of spores occurred in the dry season, and in region M total spore abundance did not differ between seasons. Spore abundance was higher in region Y (Tukey, $p \leq 0.05$) in both seasons (Figure 2). The number of spores increased when the maize plant entered the reproductive phase (R1) with a decrease as this phase progressed (Tian *et al.*, 2011), but that trend only was observed in the VC region, since for region Y abundance decreased significantly during the wet season (Figure 2).

Species richness did not vary between seasons, but spore abundance did show variation, with a higher number of propagules during dry season sampling, since the sporulation rate increases when there is some type of stress related to soil (Álvarez-Lopezello *et al.*, 2019).

AMF belonging to the family Glomeraceae had higher relative abundance (AR) from 0.59 to 0.97 in the four regions during the two seasons, with higher presence in region Y in both seasons. *Entrophospora infrequens* and *Scutellospora* sp. are present only in region I. *Claroideoglossum lamellosum*, *Glomus microaggregatum*, and *R. fasciculatus* are specific to region M. *Acaulospora kentinensis*, *A. morrowiae*, and *Racocetra* aff. *fulgida* are recorded only in region VC. The morphospecies *Glomus* sp. is only reported in the region Y, where the *Claroideoglossum* genus is not present. In region VC, the presence of the *Ambispora* genus was not recorded. *Entrophospora infrequens* is only found in region I during the dry season (AR=2.50), while *Paraglossum occultum* is only present in the dry season in regions Y and VC (AR = 0.67 and 1.79, respectively).

Morisita index values indicate greater similarity between the AMF communities of regions I and Y with the highest value (0.96), and they share six

Cuadro 2. Riqueza de especies (RE), abundancia relativa (AR) y número de esporas (NE) de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en las parcelas de maíz con presencia de sequía en las regiones: Istmo, Sierra Norte, Mixteca y Valles centrales de Oaxaca (I, Y, M y VC), México durante dos temporadas: secas y lluvias (S, LL).

Table 2. Species richness (RE), relative abundance (AR), and spore number (NE) of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in maize plots exposed to drought in the regions: Istmo, Sierra Norte, Mixteca and Valles Centrales of Oaxaca (I, Y, M and VC), Mexico, during two seasons: dry and rainy (S, LL).

	I				Y				M				VC			
	S		LL		S		LL		S		LL		S		LL	
	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)
Acaulosporaceae	1	(0.03)	2	(0.01)	2	(0.01)	4	(0.04)	0	(0)	2	(0.03)	5	(0.09)	5	(0.06)
<i>Acaulospora excavata</i> [‡] Ingleby & C. Walker	1	(2.5)	1	(0.61)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2	(3.57)	1	(1.19)
<i>A. kentinensis</i> [‡] (C.G. Wu & S.Liu) Kaonongbua, J.B. Morton & Bever	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1.79)	4	(4.76)
<i>A. morrowiae</i> Spain & N.C. Schenck	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1.79)	0	(0)
<i>A. scrobiculata</i> Trappe	0	(0)	1	(0.61)	2	(1.34)	3	(3.13)	0	(0)	0	(0)	1	(1.79)	0	(0)
<i>A. spinosa</i> Oehl, Palenz., I.C. Sánchez, Tchabi, Hount. & G.A. Silva	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1.04)	0	(0)	2	(2.63)	0	(0)	0	(0)
Ambisporaceae	5	(0.13)	6	(0.04)	0	(0)	3	(0.03)	0	(0)	1	(0.01)	0	(0)	0	(0)
<i>Ambispora appendicula</i> C. Walker [‡]	5	(12.5)	6	(3.66)	0	(0)	2	(2.08)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>A. gerdemannii</i> [†] C. Walker, Vestberg & Schuessler	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1.04)	0	(0)	1	(1.32)	0	(0)	0	(0)
Clareidoglomeraceae	2	(0.05)	12	(0.07)	0	(0)	0	(0)	16	(0.21)	0	(0)	14	(0.25)	9	(0.11)
<i>Clareidoglomerum claroideum</i> C. Walker & Schuessler [‡]	0	(0)	5	(3.05)	0	(0)	0	(0)	1	(1.32)	0	(0)	8	(14.29)	0	(0)
<i>C. etunicatum</i> C. Walker & Schuessler	0	(0)	1	(0.61)	0	(0)	0	(0)	1	(1.32)	0	(0)	6	(10.71)	9	(10.71)
<i>C. lamellosum</i> [‡] C. Walker & Schuessler [‡]	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2	(2.63)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>C. aff. lamellosum</i> C. Walker & Schuessler	2	(5)	6	(3.66)	0	(0)	0	(0)	12	(15.79)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Entrophosporaceae	1	(0.03)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>Entrophospora infrequens</i> R.N. Ames & R.W. Schneid	1	(2.5)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Glomeraceae	30	(0.75)	144	(0.88)	145	(0.97)	89	(0.93)	56	(0.74)	67	(0.88)	33	(0.59)	65	(0.77)
<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & Olexia	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1.31)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>G. sp.</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1.04)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>Funneliformis geosporum</i> C. Walker & Schuessler [‡]	15	(37.5)	85	(51.83)	108	(72.48)	43	(44.79)	19	(25)	14	(18.42)	18	(32.14)	17	(20.24)
<i>F. mosseae</i> C. Walker & Schuessler [‡]	0	(0)	12	(7.32)	0	(0)	2	(2.08)	6	(7.89)	24	(31.58)	0	(0)	14	(16.67)
<i>Rhizophagus fasciculatus</i> C. Walker & Schuessler	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1.32)	0	(0)	0	(0)
<i>Rh. intraradices</i> C. Walker & Schuessler [‡]	13	(32.5)	40	(24.39)	28	(18.79)	28	(29.17)	30	(39.47)	26	(34.21)	13	(23.21)	32	(38.1)
<i>Septoglomerum conscriptum</i> Sieverd., G.A. Silva & Oehl [‡]	2	(5)	7	(4.27)	9	(6.04)	15	(15.63)	0	(0)	2	(2.63)	2	(3.57)	2	(2.38)

Cuadro 2. Continúa

Cuadro 2. Continuación

	I		Y				M				VC					
	S		LL		S		LL		S		LL		S		LL	
	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)	NE	(AR)
Gigaasporaceae	1	(0.03)	0	(0)	1	(0.01)	0	(0)	4	(0.05)	6	(0.08)	3	(0.05)	5	(0.06)
<i>Gigaspora candida</i> Bhattacharjee, Mukerji, J.P. Tewari & Skoropad	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	3	(3.95)	1	(1.79)	1	(1.19)
<i>Racocetra aff. fulgida</i> F.A. de Souza, I.R. Silva, M.B. Barros-Barreto, B.T. Goto & Oehl	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2	(3.57)	0	(0)
<i>Scutellospora dipurpurascens</i> J.B. Morton & Koske	0	(0)	0	(0)	1	(0.67)	0	(0)	4	(5.26)	3	(3.95)	0	(0)	4	(4.76)
<i>Scutellospora</i> sp.	1	(2.5)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Paraglomeraceae	0	(0)	0	(0)	1	(0.01)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(0.02)	0	(0)
<i>Paraglomerus occultum</i> [†] J.B. Morton & D. Redecker	0	(0)	0	(0)	1	(0.67)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1.79)	0	(0)
NE	40		16.4		149		96		76		76		56		84	
RT	8		10		6		9		9		8		12		9	
RE	12				11				14				14			

[†]Nuevos registros para el estado de Oaxaca, México. *Especie detectada en cultivos trampa. NE: número total de esporas; RT: riqueza por temporada; RE: riqueza total de especies. ❖ [†]New records at the state of Oaxaca, Mexico. *Species was detected in trap cultures. NE: total number of spores; RT: richness by season; RE: total richness of species.

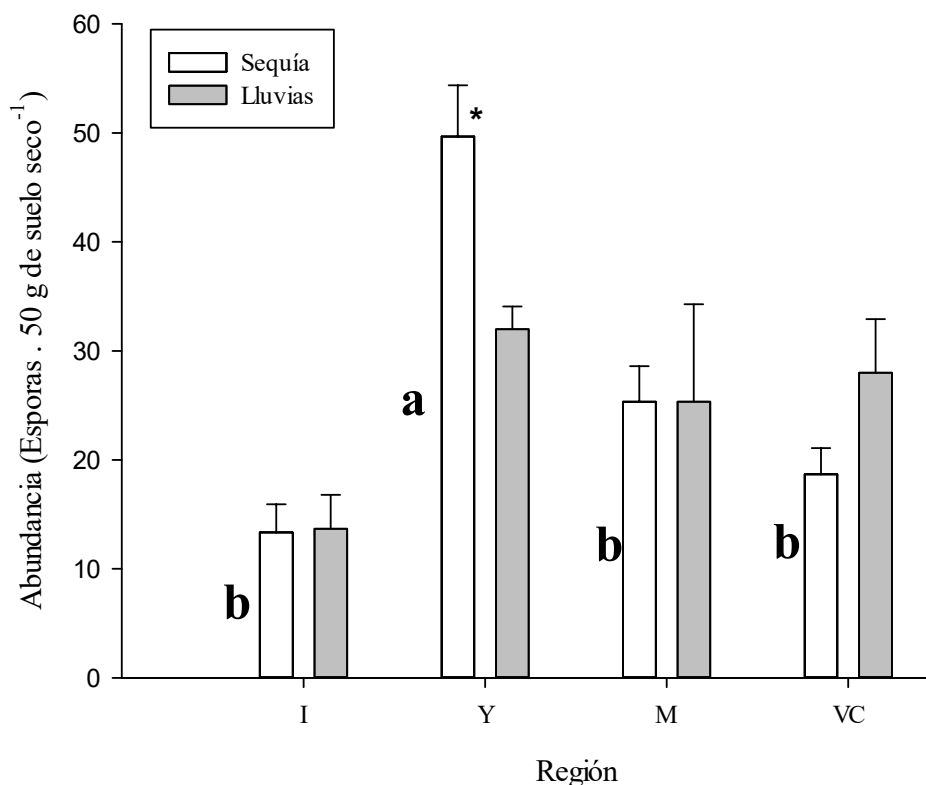


Figura 2. Abundancia de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares en el suelo rizosférico de maíz en parcelas de temporal de las regiones: Istmo (I), Sierra norte (Y), Mixteca (M) y Valles centrales (VC) del estado de Oaxaca, México. Las Barras representan promedios \pm error estándar; letras distintas indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=24$). *Significancia entre las dos temporadas en la misma región (t -student, $p \leq 0.05$).

Figure 2. Abundance of spores of arbuscular mycorrhizal fungi in rhizospheric soil of maize in rainfed plots in the regions: Istmo (I), Sierra Norte (Y), Mixteca (M) and Valles Centrales (VC) of the state of Oaxaca, Mexico. Bars represent means \pm standard error; different letters indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=24$). *Significance between the two seasons in the same region (t -student, $p \leq 0.05$).

variación, con cantidad de propágulos mayor durante los muestreos realizados en la temporada seca, ya que la tasa de esporulación aumenta cuando existe algún tipo de estrés en el suelo (Álvarez-Lopezello *et al.*, 2019).

Los HMA pertenecientes a la familia Glomeraceae tuvieron mayor abundancia relativa (AR), de 0.59 a 0.97 en las cuatro regiones durante las dos temporadas, con presencia mayor en la región Y en las dos temporadas. Las especies *Entrophospora infrequens* y *Scutellospora* sp. están presentes sólo en la región I. *Claroideoglossum lamellosum*, *Glomus microaggregatum* y *R. fasciculatus* son específicas de la región M. *Acaulospora kentinensis*, *A. morrowiae* y *Racocetra* aff. *fulgida* se registran únicamente en la región VC. La morfoespecie *Glomus* sp. solo se reporta en la región Y, donde no hay presencia del género *Claroideoglossum*. En la región VC no se registró la presencia

species. However, regions M and VC had higher species richness, but with a lower index value (Table 3).

The region with the highest AMF diversity according to the Shannon index was VC, but in this region we recorded lower spore abundance. Regarding the comparison of Shannon's diversity index between seasons for each region, only in region Y there was a significant difference (t , $p=0.038$). According to the Margalef index, there were no differences in AMF diversity among regions or between seasons in each region (Table 4).

According to reports of AMF diversity in agricultural plots, the dominant family is Glomeraceae; this agrees with our findings. Such dominance may be attributed to the tolerance of Glomeraceae to soil disturbance (Guadarrama-Chávez *et al.*, 2007;

del género *Ambispora*. *Entrophospora infrequens* solo se encuentra en la región I durante la temporada seca (AR=2.50), mientras que *Paraglomus occultum* solo está presente en la temporada seca en las regiones Y y VC (AR = 0.67 y 1.79, respectivamente).

Los valores del índice de Morisita indican similitud mayor entre las comunidades de HMA de las regiones I e Y con el valor mayor (0.96), y comparten seis especies. No obstante, las regiones M y VC tuvieron riqueza de especies mayor, pero con un valor del índice menor (Cuadro 3).

La región con diversidad mayor de HMA de acuerdo con el índice de Shannon fue VC, pero en esta región se registró abundancia menor de esporas. Respecto a la comparación del índice de diversidad de Shannon entre temporadas por cada región, solo en la región Y se registró una diferencia significativa (t , $p=0.038$). Según el índice de Margalef, no hubo diferencias en la diversidad de HMA entre regiones ni entre temporadas en cada región (Cuadro 4).

De acuerdo con reportes de diversidad de HMA en parcelas agrícolas, la familia dominante es Glomeraceae, lo cual coincide con nuestros hallazgos. Dicha dominancia puede atribuirse a la tolerancia de Glomeraceae ante la perturbación del suelo (Guadarrama-Chávez *et al.*, 2007; Marinho *et al.*, 2019).

La riqueza de especies no fue diferente ($p > 0.05$) entre las regiones estudiadas, pero es importante resaltar que la amplitud varió entre 11 y 14 especies. Guadarrama-Chávez *et al.* (2007) encontraron 13 especies de HMA en parcelas de maíz en la región de Nizanda (Oaxaca), mientras que González-Cortés *et al.* (2012) encontraron 12 a 13 especies en parcelas de maíz en el centro de México, lo cual coincide con los valores de nuestra investigación. Las regiones VC y M cuentan con mayor número de especies registradas y tienen la similitud más alta (0.92) entre sí. Cabe señalar que este es uno de los primeros acercamientos a la diversidad micorrízica presente en parcelas de maíz en la región Y, lo cual adquiere una relevancia alta al encontrar una riqueza de especies (11) considerable.

En esta investigación se reportan registros nuevos para el estado de Oaxaca (*Acaulospora excavata*, *A. kentinensis*, *Ambispora gerdemannii*, *Claroideoglo-mus lamellosum* y *Paraglomus occultum*), además de tres morfotipos no identificados. La riqueza de HMA observada puede atribuirse a una mecanización reducida o nula y a la utilización baja de insumos y

Cuadro 3. Índice de similitud de Morisita para la riqueza de especies de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) de parcelas de maíz de temporal de las regiones Istmo (I), Sierra norte (Y), Mixteca (M) y Valles centrales (VC) del estado de Oaxaca, México.

Table 3. Morisita similarity index for species richness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in rainfed maize plots in the Istmo (I), Sierra Norte (Y), Mixteca (M) and Valles Centrales (VC) regions of the state of Oaxaca, Mexico.

Región	Y	M	VC
I	0.96 (6 [†])	0.79 (7)	0.84 (8)
Y		0.66 (7)	0.73 (7)
M			0.92 (8)

[†]Número de especies de HMA compartidas entre las regiones. ♦

[†]Number of AMF species shared between regions.

Species richness was not different ($p > 0.05$) among the regions studied, but it is important to highlight that the range varied between 11 and 14 species. Guadarrama-Chávez *et al.* (2007) reported 13 AMF species in maize plots in the Nizanda region (Oaxaca), while González-Cortés *et al.* (2012) found 12 to 13 species in maize plots in central Mexico; these coincide with the values of our research. The

Cuadro 4. Índices de diversidad de especies de hongos micorrizógenos arbusculares de parcelas de maíz de las regiones Istmo (I), Sierra norte (Y), Mixteca (M) y Valles centrales (VC) del estado de Oaxaca, México.

Table 4. Species diversity indexes of arbuscular mycorrhizal fungi in maize plots in the Istmo (I), Sierra Norte (Y), Mixteca (M) and Valles centrales (VC) regions of the state of Oaxaca, Mexico.

Región	Shannon		Margalef	
I	1.16 b	± 0.11	1.20 a	± 0.20
Y	1.00 b	± 0.12	1.01 a	± 0.15
M	1.29 b	± 0.09	1.39 a	± 0.15
VC	1.47 a	± 0.08	1.62 a	± 0.15

Promedios con letra diferente indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$)

agroquímicos, además del uso de semilla nativa. Sangabriel-Conde *et al.* (2015) señalaron que hay una interacción fuerte entre el genotipo de maíz utilizado y la comunidad micorrícica presente en el suelo.

Relación entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y las comunidades de HMA

El escalamiento multidimensional no-paramétrico (NMDS) (Figura 3) y el análisis con permutaciones (PERMANOVA) mostraron diferencias entre las regiones en las dos temporadas ($F=3.17$, $p \leq 0.001$).

Con el análisis de redundancia (RDA) (Figura 4) se registró que la riqueza de HMA en las cuatro regiones está asociada a las propiedades fisicoquímicas de los suelos (Figura 4). Las especies asociadas con la conductividad eléctrica (CE) y materia orgánica (MO) fueron: *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus*

regions VC and M have the highest number of species recorded and have the highest similarity (0.92) between them. It should be noticed that this is one of the first approaches to the mycorrhizal diversity present in maize plots in the region Y, which acquires a high relevance by finding a considerable species richness (11).

This research reports new records for the state of Oaxaca (*Acaulospora excavata*, *A. kentinensis*, *Ambispora gerdemannii*, *Claroideoglossum lamellosum*, and *Paraglossum occultum*), in addition to three unidentified morphotypes. The richness of AMF observed can be attributed to low or no mechanization and low use of inputs and agrochemicals, along with the use of native seed. Sangabriel-Conde *et al.* (2015) indicated that there is a strong interaction between the maize genotype used and the mycorrhizal community present in the soil.

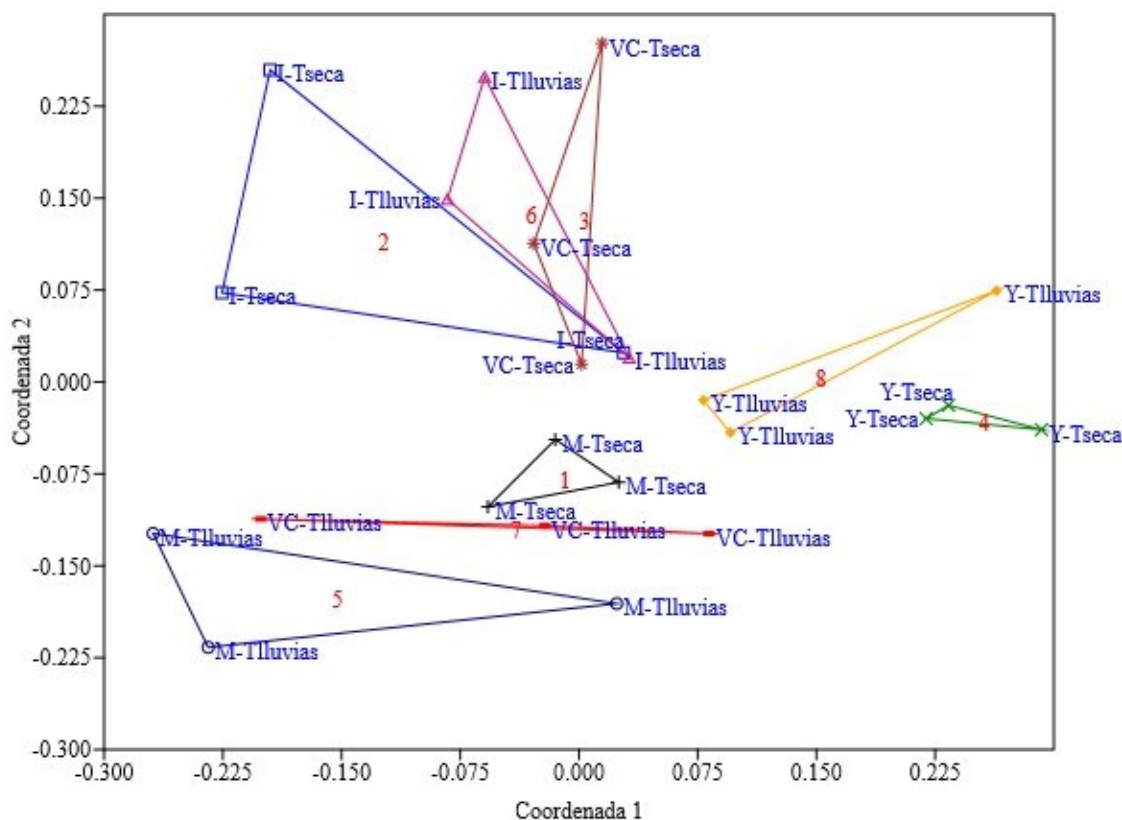


Figura 3. Escalamiento multidimensional no-paramétrico (NMDS) de la composición de comunidades micorrizógenas en parcelas de maíz de temporal en cuatro regiones con incidencia de sequía en Oaxaca, México. I: Istmo, Y: Sierra Norte, M: Mixteca y VC: Valles centrales, Tseca: Temporada seca y Tlluvias: Temporada lluviosa.

Figure 3. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) of mycorrhizal community composition in rainfed maize plots in four regions with drought incidence in Oaxaca, Mexico. I: Istmo, Y: Sierra Norte, M: Mixteca and VC: Valles centrales; Tseca: Dry season and Tlluvias: Rainy season.

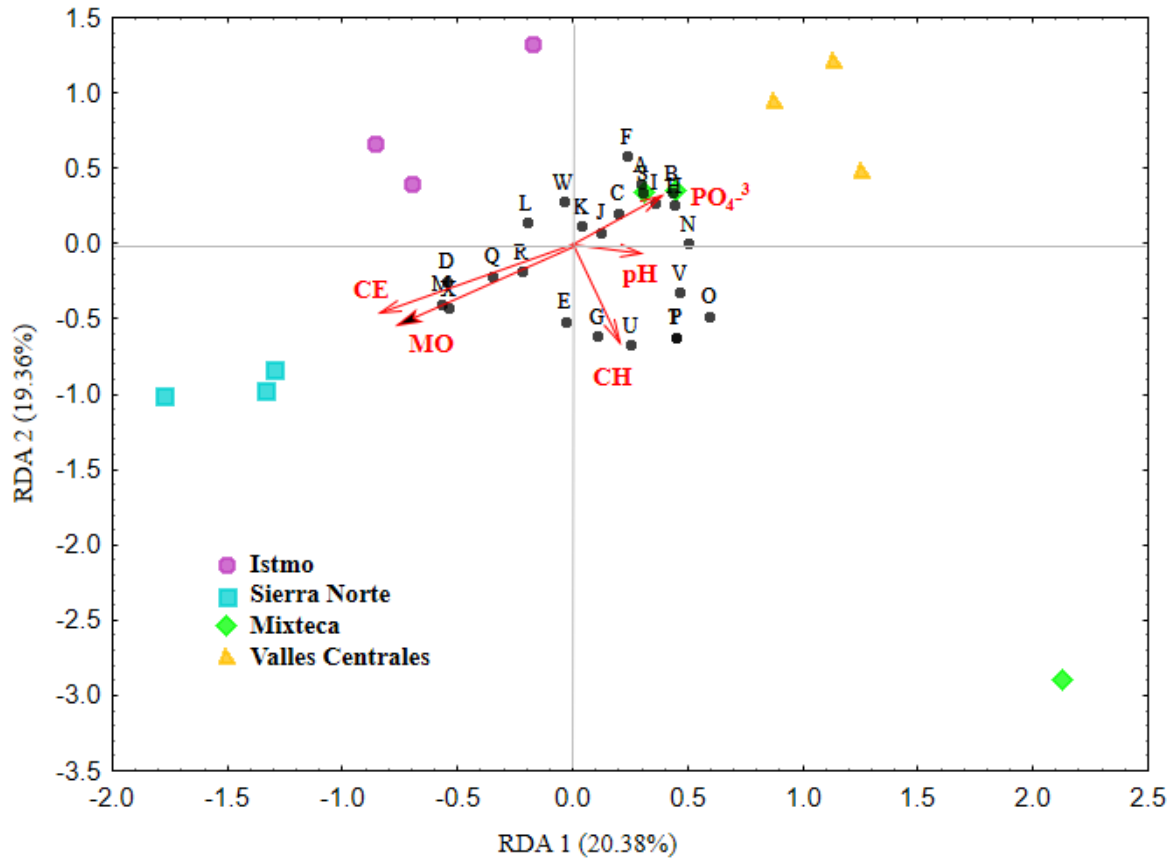


Figura 4. Análisis de redundancia (RDA) entre especies de hongos micorrizógenos arbusculares y propiedades del suelo en parcelas de maíz de temporal en cuatro regiones con incidencia de sequía en Oaxaca, México. (CE) conductividad eléctrica, (CH) contenido de humedad, pH, (MO) materia orgánica, (PO₄) fósforo disponible. A: *Acaulospora excavata*, B: *A. kentinensis*, C: *A. morrowiae*, D: *A. scrobiculata*, E: *A. spinosissima*, F: *Ambispora appendicula*, G: *A. gerdemannii*, H: *Claroideoglossum claroideum*, I: *C. etunicatum*, J: *C. lamellosum*, K: *C. lamellosum* aff. *lamellosum*, L: *Entrophospora infrequens*, M: *Funneliformis geosporum*, N: *F. mosseae*, O: *Gigaspora candida*, P: *Glomus microaggregatum*, Q: *Glomus* sp., R: *Paraglomus occultum*, S: *Racocetra* aff. *fulgida*, T: *Rhizophagus fasciculatus*, U: *R. intraradices*, V: *Scutellospora dipurpurascens*, W: *Scutellospora* sp., X: *Septoglossum constrictum*.

Figure 4. Redundancy analysis (RDA) between arbuscular mycorrhizal fungi species and soil properties in rainfed maize plots in four regions with drought incidence in Oaxaca, Mexico. (CE) electric conductivity, (CH) moisture content, pH, (MO) organic matter (PO₄) available phosphorus. A: *Acaulospora excavata*, B: *A. kentinensis*, C: *A. morrowiae*, D: *A. scrobiculata*, E: *A. spinosissima*, F: *Ambispora appendicula*, G: *A. gerdemannii*, H: *Claroideoglossum claroideum*, I: *C. etunicatum*, J: *C. lamellosum*, K: *C. lamellosum* aff. *lamellosum*, L: *Entrophospora infrequens*, M: *Funneliformis geosporum*, N: *F. mosseae*, O: *Gigaspora candida*, P: *Glomus microaggregatum*, Q: *Glomus* sp., R: *Paraglomus occultum*, S: *Racocetra* aff. *fulgida*, T: *Rhizophagus fasciculatus*, U: *R. intraradices*, V: *Scutellospora dipurpurascens*, W: *Scutellospora* sp., X: *Septoglossum constrictum*.

sp., *Paraglomus occultum*, *Septoglossum constrictum* y *Funneliformis geosporum*. Las especies *Ambispora gerdemannii* y *Rhizophagus intraradices* tuvieron asociación positiva con el contenido de humedad, mientras que las especies *Acaulospora kentinensis*, *A. morrowiae*, *Racocetra* aff. *fulgida*, *Claroideoglossum etunicatum*, *C. claroideum*, *C. lamellosum* y *C. aff. lamellosum* estuvieron asociadas con el fósforo disponible.

Relationship between soil physicochemical properties and AMF communities

Non-parametric multidimensional scaling (NMDS) (Figure 3) and permutation analysis (PERMANOVA) showed differences among regions in the two seasons (F=3.17, p≤0.001).

De acuerdo con el modelo lineal generalizado hubo una relación significativa entre las propiedades del suelo y la abundancia de esporas. La abundancia de esporas tuvo asociación positiva y directa con conductividad eléctrica, contenido de humedad y concentración de fósforo disponible, pero la relación con el pH fue negativa (Cuadro 5).

La abundancia de esporas en las parcelas estudiadas fue mucho menor que la registrada por Reyes-Jaramillo *et al.* (2019) en otra región del estado de Oaxaca (Figura 2). Al respecto se ha mencionado que la tasa de esporulación baja puede ser una característica propia de las comunidades de HMA presentes en el suelo.

A pesar de que la abundancia y diversidad de HMA está asociada a niveles de fósforo bajos en el suelo (Marinho *et al.*, 2019), en esta investigación la diversidad mayor se registró en el suelo con nivel mayor de PO₄, y la abundancia de esporas más alta, en suelos con los contenidos medios de PO₄ disponible.

CONCLUSIONES

Los suelos estudiados tienen textura media a moderadamente gruesa, con pH que varía de moderadamente ácido a neutro, contenido bajo de materia orgánica, a excepción del suelo de la región Sierra Norte. La interacción de los hongos micorrícicos arbusculares y las plantas de maíz es alta, con niveles de colonización superiores al 60%. En la Sierra Norte se registró colonización micorrícica mayor durante la temporada de lluvias y abundancia más alta

Redundancy analysis (RDA) (Figure 4) showed that AMF richness in the four regions is associated with the physicochemical properties of the soils (Figure 4). The species associated with electrical conductivity (CE) and organic matter (MO) were *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus* sp., *Paraglomus occultum*, *Septoglomus constrictum*, and *Funneliformis geosporum*. *Ambispora gerdemannii* and *Rhizophagus intraradices* were positively associated with moisture content, while *Acaulospora kentinensis*, *A. morrowiae*, *Racocetra* aff. *fulgida*, *Claroideoglomus etunicatum*, *C. claroideum*, *C. lamellosum*, and *C. aff. lamellosum* were associated with available phosphorus.

According to the generalized linear model, there was a significant relationship between soil properties and spore abundance. Spore abundance was positively and directly associated with electrical conductivity, moisture content, and available phosphorus concentration, but the relationship with pH was negative (Table 5).

The spore abundance in the studied plots was lower than that reported by Reyes-Jaramillo *et al.* (2019) in another region of the state of Oaxaca (Figure 2). In this regard, it has been mentioned that the low sporulation rate may be a characteristic of AMF communities present in the soil.

Although AMF abundance and diversity are associated with low soil phosphorus levels (Marinho *et al.*, 2019), in this research the highest diversity was recorded in soil with higher PO₄ level, and the highest spore abundance in soils with the medium available PO₄ contents.

Cuadro 5. Relación entre la abundancia de esporas de hongos micorrícicos arbusculares y las propiedades fisicoquímicas del suelo de parcelas de maíz de temporal en el estado de Oaxaca, México, utilizando el modelo lineal generalizado (Regresión de Poisson).

Table 5. Relationship between spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi and soil physicochemical properties in rainfed maize plots in the state of Oaxaca, Mexico, using the generalized linear model (Poisson regression).

	Estimación	S.E.	Valor-Z	p
Abundancia de esporas vs				
Conductividad eléctrica	4.22	0.45	9.41	< 0.001
Contenido de humedad	2.18	0.36	6.13	< 0.001
Fósforo disponible	0.74	0.13	5.63	< 0.001
pH	-0.77	0.23	-3.28	< 0.01

de esporas en la temporada de secas. La riqueza de HMA registrada fue de 24 especies, lo cual representa cerca del 22% de las especies reportadas en México y el 33% de Oaxaca.

Nuestro estudio registró la presencia de dos especies generalistas, *Funneliformis geosporus* y *Rhizophagus intraradices*, y cinco reportes nuevos para el estado de Oaxaca (*Acaulospora excavata*, *A. kentinensis*, *Ambispora gerdemannii*, *Claroideoglossum lamellosum* y *Paraglossum occultum*), además de tres morfoespecies aún no identificadas. Estos resultados resaltan una diversidad importante de hongos micorrícicos arbusculares, y confirman su potencial micorrícico en el cultivo de maíz en condiciones de temporal en regiones semiáridas de Oaxaca, México, característica crítica para enfrentar el estrés hídrico en el suelo.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para investigación doctoral (278855). La Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional otorgó el financiamiento (SIP20170732) para el desarrollo del trabajo.

LITERATURA CITADA

- Alguacil M. M., E. Torrecillas, F. García-Orenes, and A. Roldán. 2014. Changes in the composition and diversity of AMF communities mediated by management practices in a Mediterranean soil are related with increases in soil biological activity. *Soil Biol. Biochem.* 76: 34–44.
- Álvarez-Lopezello J., R.F. del Castillo, C. Robles, and L.V. Hernández-Cuevas. 2019. Spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in human-modified neotropical ecosystems. *Ecol. Res.* 2019: 1-12.
- Cázares E., J. Chávez, Y. Salinas, F. Castillo, y P. Ramírez. 2015. Variación en la composición del grano entre poblaciones de maíz (*Zea mays* L.) nativas de Yucatán, México. *Agrociencia* 49:15–30.
- Chimal-Sánchez E., C. Senés-Guerrero, L. Varela, N. M. Montaña, R. García-Sánchez, A. Pacheco, S. A. Montaña-Arias, and S. L. Camargo-Ricalde. 2020. *Septoglossum mexicanum*, a new species of arbuscular mycorrhizal fungi from semiarid regions in Mexico. *Mycologia* 112: 121-132.
- Gerdemann, J. W., and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235–244.
- Giovannetti, M., and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489–500.
- González-Cortés, J. C., M. Vega-Fraga, L. Varela-Fregoso, M. Martínez-Trujillo, Y. Carreón-Abud and M. E. Gavito. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities

CONCLUSIONS

The textures of studied soils are medium to moderately coarse, with pH ranging from moderately acidic to neutral, low organic matter content, except the soil of the Sierra Norte region. The interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and maize plants is high, with colonization levels higher than 60%. In the Sierra Norte, mycorrhizal colonization was higher during the rainy season and spore abundance was higher during the dry season. The richness of AMF recorded was 24 species, which represents about 22% of the species reported in Mexico and 33% in Oaxaca.

Our study recorded the presence of two generalist species, *Funneliformis geosporus* and *Rhizophagus intraradices*, and five new reports for the state of Oaxaca (*Acaulospora excavata*, *A. kentinensis*, *Ambispora gerdemannii*, *Claroideoglossum lamellosum*, and *Paraglossum occultum*), in addition to three morphospecies not yet identified. These results highlight an important diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and confirm their mycorrhizal potential in maize cultivation under rainfed conditions in semiarid regions of Oaxaca, Mexico, a critical feature to cope with soil water stress.

—End of the English version—

---*---

- an land use change: The conversion of temperate forests to avocado plantations and maize fields in central Mexico. *Fungal Ecol.* 5: 16-23.
- Guadarrama-Chávez P., S. L. Camargo-Ricalde, L. Hernández-Cuevas, and S. Castillo-Argüero. 2007. Los hongos micorrícicos arbusculares de la región de Nizanda, Oaxaca, México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 81: 131–137.
- Hijri, I., Z. Sýkorová, F. Oehl, K. Ineichen, P. Mäder, A. Wiemken, and D. Redecker. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Mol. Ecol.* 15: 2277–2289.
- Latef, A. H., A. Hashem, S. Rasool, E. F. Abd-Allah, A. A. Alqarawi, D. Egamberdieva, S. Jan, N. A. Anjum, and P. Ahmad. 2016. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: A review. *J. Plant Biol.* 59: 407–426.
- Marinho, F., F. Oehl, I. Ramalho da Silva, D. Coyne, J. S. da Nóbrega-Veras, and L. Costa-Maia. 2019. High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural and anthropized sites of a Brazilian tropical dry forest (Caatinga). *Fun. Ecol.* 40: 82-91

- Phillips, J. M., and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- R Studio Team. 2015. RStudio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston, MA <http://www.rstudio.com>. Consultado: febrero 2020.
- Redecker, D., A. Schüßler, H. Stockinger, S. L. Stürmer, J. B. Morton, and C. Walker. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. 23:515–531.
- Reyes-Jaramillo I., E. Chimal-Sánchez, J. Y. Salmerón-Castro, N. Vázquez-Pérez, y L. Varela-Fregoso. 2019. Comunidad de hongos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota) asociada con agaves mezcaleros de Oaxaca y su relación con algunas propiedades edáficas. *Rev. Mex. Biodiv.* 90. e902777. DOI: <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2777>
- Rodríguez-Caballero G., F. Caravaca, A. J. Fernández-González, M. M. Alguacil, M. Fernández-López, and A. Roldán. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation mediated changes in rhizosphere bacterial community structure while promoting revegetation in a semiarid ecosystem. *Sci.Total Envir.* 584–585:838–848.
- Sangabriel-Conde W., I. E. Maldonado-Mendoza, M. E. Mancera-López, J. D. Cordero-Ramírez, D. Trejo-Aguilar, and S. Negrete-Yankelevich. 2015. Glomeromycota associated with Mexican native maize landraces in Los Tuxtlas, Mexico. *Appl. Soil Ecol.* 87: 63–71.
- Schüßler, A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105: 1413–1421.
- Soka, G. E., and M. E. Ritchie. 2018. Arbuscular mycorrhizal spore composition and diversity associated with different land uses in a tropical savanna landscape, Tanzania. *Appl. Soil Ecol.* 125: 222-232.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-REC-NAT-2000. Diario Oficial de la Federación. 31 de diciembre de 2002. México, D.F.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Avance de Siembras y Cosechas. Resumen por estado. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do Consultado: enero 2020.
- Tian, H., R. A. Drijber, X. S. Niu, J. L. Zhang, and X. L. Li. 2011. Spatio-temporal dynamics of an indigenous arbuscular mycorrhizal fungal community in an intensively managed maize agroecosystem in North China. *Appl. Soil Ecol.* 47:141–152.
- Turrini, A., A. Bedini, M. B. Loor, G. Santini, C. Sbrana, M. Giovannetti, and L. Avio. 2018. Local diversity of native arbuscular mycorrhizal symbionts differentially affects growth and nutrition of three crop plant species. *Biol. Fert. Solis.* 54: 203-217.
- WRB (World Reference Base. International Union of Soil Science Societies Working Group), 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014. Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. FAO, Roma. 218 p.
- WVU-INVAM (West Virginia University, International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi). <https://invam.wvu.edu/>. Consultado: enero 2020.

DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS Y PRODUCCIÓN DE BIOGÁS *in vitro* POR FERMENTACIÓN SÓLIDA CON *Pleurotus ostreatus*

LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES DEGRADATION AND *in vitro* BIOGAS PRODUCTION BY SOLID FERMENTATION WITH *Pleurotus ostreatus*

Jerónimo Herrera-Pérez¹, Xóchilt Rosales-Barragán², Paulino Sánchez-Santillán^{1*}, Nicolás Torres-Salado¹, Marco Antonio Ayala-Monter¹, Diego Felipe Portela-Díaz³, Daniel Hernández-Valenzuela⁴

²Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista. ¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero. Km 197, Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional. 41940. Cuajinicuilapa, Guerrero. (sanchezsantillanp@gmail.com). ³Ingeniería en Agroindustrias, Universidad de la Costa. Carretera Libramiento Paraje de las Pulgas. 71600. Pinotepa Nacional. Oaxaca. ⁴Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Avenida Periférico Poniente s/n, Colonia Villa de Guadalupe. 40040, Iguala de la Independencia, Guerrero.

RESUMEN

Los residuos agrícolas y pastos henificados con más de 150 d de rebrote se caracterizan por su alto contenido en fibra y *Pleurotus ostreatus* digiere lignina, celulosa y hemicelulosa. La hipótesis fue que *Pleurotus ostreatus* mejora las características químicas y el valor nutricional de rastrojos y pasturas para la alimentación pecuaria. El objetivo fue determinar las características químicas de valor nutricional, producción de biogás y degradaciones *in vitro* de rastrojo de maíz y pasto mulato (*Brachiaria* híbrido) tratado con las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* por 15 y 30 d en fermentación sólida. Las cepas se reactivaron en agar papa-dextrosa y se propagó en sorgo. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 50 g de sustrato estéril (80% de humedad) y 5% de inóculo y se fermentaron por 15 y 30 d. Al término, se determinaron las características químicas de valor nutricional, se estimó la producción de biogás y metano (CH₄) y degradaciones de materia seca (DMS) y de fibra detergente neutro (DFDN). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2³. Los fermentos de rastrojo de maíz en 30 d presentaron contenido mayor de proteína cruda. El contenido menor de fibra detergente neutro (FDN) estuvo en rastrojo de maíz con cualquier cepa. El rastrojo de maíz con P15 redujo más fibra detergente ácido (FDA) que MR. El fermento con 30 d mostró mayor FDA en los sustratos evaluados. El pasto mulato con la cepa MR produjo más biogás acumulado que con P15. Los fermentos con 30 d produjeron más biogás acumulado que los de 15 d (p≤0.05). Ni los sustratos ni las cepas mostraron diferencias en la producción de CH₄ acumulado (p>0.05). Los fermentos de 30 d con cualquier cepa en

ABSTRACT

Agricultural residues and hay pastures with more than 150 d of regrowth are characterized by their high fiber content; *Pleurotus ostreatus* digests lignin, cellulose and hemicellulose. The hypothesis of this study was that *Pleurotus ostreatus* improves the chemical characteristics and nutritional value of crop residues and pasture for animal feeding. The objective was to determine the chemical characteristics of nutritional value, biogas production and *in vitro* degradation of corn stubble and mulatto grass (*Brachiaria* hybrid) treated with the MR and P15 strains of *P. ostreatus* for 15 and 30 d in solid fermentation. The strains were reactivated on potato dextrose agar medium, and propagated on sorghum. In an Erlenmeyer flask, 50 g of sterile substrate (80% humidity) and 5% inoculum were placed and fermented for 15 and 30 days. At the end, we determined the chemical characteristics of nutritional value, and estimated the production of biogas and methane (CH₄), and the degradation of dry matter (DMS) and neutral detergent fiber (DFDN). The experimental design was completely randomized with a 2³ factorial arrangement. The corn stubble ferments at 30 d presented higher crude protein content. The lowest neutral detergent fiber (FDN) content was found in corn stubble with any strain. Corn stubble with P15 reduced more acid detergent fiber (FDA) than MR. The ferment of 30 d showed higher FDA in the evaluated substrates. Mulatto grass with MR strain produced more accumulated biogas than with P15. Ferments of 30 d produced more accumulated biogas than those of 15 d (p≤0.05). Neither the substrates nor the strains showed differences in the production of accumulated CH₄ (p>0.05). The 30 d ferments with any strain in corn stubble showed higher DMS and DFDN (p≤0.05). *Pleurotus ostreatus* improved the nutrient content and the *in vitro* fermentative

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2020. Aprobado: septiembre, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 55: 37-53. 2021.

rastrajo de maíz mostraron DMS y DFDN mayores ($p \leq 0.05$). *Pleurotus ostreatus* mejoró el contenido de nutrientes y las características fermentativas *in vitro* de rastrojo de maíz y pasto mulatto tratados por fermentación sólida.

Palabras clave: fermentación sólida, rastrojo de maíz, *Brachiaria* híbrido, *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUCCIÓN

Los residuos agrícolas y los pastos henificados con más de 150 d de rebrote constituyen una parte importante en la alimentación de los rumiantes. Estos ingredientes se caracterizan por su contenido de fibra con un contenido alto de lignina, la cual forma complejos lignocelulósicos difíciles de digerir por los microorganismos ruminales y limita su digestión (Shrivastava *et al.*, 2011; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). Diversos métodos de pretratamiento existen para mejorar la digestibilidad, que se clasifican como químicos, mecánicos y biológicos o sus combinaciones para reducir el contenido de fibra, en particular el complejo lignocelulósico (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a). Los pretratamientos biológicos presentan ventajas sobre los pretratamientos químicos y mecánicos, como es el uso menor de productos químicos tóxicos y corrosivos, rendimiento mayor de producto final y reacción secundaria menor (Shrivastava *et al.*, 2011).

Los métodos biológicos incluyen el uso hongos de podredumbre blanca por la producción de enzimas extracelulares (Shrivastava *et al.*, 2011; Tuyen *et al.*, 2012) como celulasas, xilanasas, peroxidases de lignina, manganeso peroxidases y lacasas (Shrivastava *et al.*, 2011), las cuales mejoran el valor nutritivo de subproductos agrícolas con contenido de fibra alto y henos de pastos muy lignificados (Tuyen *et al.*, 2012). Por este tipo de producción de enzimas, los hongos de podredumbre blanca son eficaces en la deslignificación de este tipo de compuestos fibrosos y aumentan el acceso a los carbohidratos estructurales para mejorar su digestión en el rumen (Shrivastava *et al.*, 2011; Nayan *et al.*, 2018).

Los hongos de podredumbre blanca se usan en fermentaciones sólidas y algunos ejemplos son *Phanerochaete chrysosporio*, *Pleurotus* sp., *Lentinus edodes*, *Coriolus Versi*, etc. (Shrivastava *et al.*, 2011). *Pleurotus ostreatus* es un hongo que degrada lignina, celulosa y

characteristics of corn stubble and mulatto grass treated using solid fermentation.

Key words: solid fermentation, corn stubble, *Brachiaria* hybrid, *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUCTION

Agricultural residues and hay pastures with regrowth of more than 150 d constitute an important part of ruminant feeding. These ingredients are characterized by their fiber content with a high lignin content, which forms lignocellulosic complexes that are difficult to digest by ruminal microorganisms and limit their digestion (Shrivastava *et al.*, 2011; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). There are various pretreatment methods to improve digestibility, which are classified as chemical, mechanical and biological or their combinations to reduce the fiber content, in particular the lignocellulosic complex (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a). Biological pretreatments have advantages over chemical and mechanical ones, such as the lower use of toxic and corrosive chemicals, higher yield of the final product and lower secondary reaction (Shrivastava *et al.*, 2011).

Biological methods include the use of white rot fungi for the production of extracellular enzymes (Shrivastava *et al.*, 2011; Tuyen *et al.*, 2012), such as cellulases, xylanases, lignin peroxidases, manganese peroxidases and laccases (Shrivastava *et al.*, 2011), which improve the nutritional value of high-fiber agricultural by-products and highly lignified grass hay (Tuyen *et al.*, 2012). Due to this type of enzyme production, white rot fungi are effective in delignifying this type of fibrous compounds and increasing access to structural carbohydrates to improve their digestion in the rumen (Shrivastava *et al.*, 2011; Nayan *et al.*, 2018).

White rot fungi are used in solid fermentations and some examples are *Phanerochaete chrysosporio*, *Pleurotus* sp., *Lentinus edodes*, *Coriolus Versi*, etc. (Shrivastava *et al.*, 2011). The *Pleurotus ostreatus* fungus degrades lignin, cellulose, and hemicellulose through extracellular enzyme complexes (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019) that release monosaccharides from the substrate cell wall (Luna *et al.*, 2013). The fungus shows flexibility in its environmental and

hemicelulosa por medio de complejos enzimáticos extracelulares (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019) que liberan monosacáridos a partir de la pared celular del sustrato (Luna *et al.*, 2013). El hongo muestra flexibilidad en sus requerimientos ambientales y de temperatura para desarrollo (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015b). Entre los sustratos usados en la fermentación sólida están el rastrojo de maíz y la paja de cebada; así como, una variedad de subproductos agrícolas y pastos altamente lignificados (Tuyen *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2013; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015b; Nayan *et al.*, 2018).

La hipótesis en este estudio fue que las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* reducen el contenido de fibras detergentes y aumentan la disponibilidad de carbohidratos estructurales en la degradación *in vitro* de la materia seca y fibra detergente neutro del rastrojo de maíz y pasto mulato (*Brachiaria* híbrido). Por tanto, el objetivo fue determinar las características químicas de valor nutricional, producción de biogás y degradaciones *in vitro* de rastrojo de maíz y pasto mulato tratado con las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* por 15 y 30 d de fermentación sólida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero ubicada en el municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Está situado a 16° 08' N y 98° 23' O, en altitud de 50 m, predomina un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, con precipitación media anual de 1200 mm y una temperatura promedio anual de 25 °C (INEGI, 2018).

Cepas de *Pleurotus ostreatus*

Las cepas fueron MR y P15 de *Pleurotus ostreatus*. Para la reactivación de las cepas se preparó un medio de cultivo con base en agar papa-dextrosa (BD Bioxon®). El medio se esterilizó por 15 min a 15 PSI y 121 °C en una autoclave (All American® 1941X, USA). El medio se vertió en cajas Petri hasta su solidificación y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Las cajas Petri se inocularon con cada cepa, se sellaron con papel Parafilm (Bemis®) y se incubaron a temperatura ambiente (promedio 30 °C) por 4 d.

Después se preparó el inóculo, se hirvieron 500 g de sorgo entero en 1 L de agua destilada por 30 min y se filtró para eliminar el exceso de agua. A continuación, el sorgo se colocó en

temperature requirements for development (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015b). Among the substrates used in solid fermentation are corn stubble and barley straw; as well as a variety of highly lignified agricultural by-products and grasses (Tuyen *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2013; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015b; Nayan *et al.*, 2018).

The hypothesis of this study is that the MR and P15 strains of *P. ostreatus* reduce the content of detergent fibers and increase the availability of structural carbohydrates, at the *in vitro* degradation of dry matter and neutral detergent fiber of corn stubble and mulatto grass (hybrid *Brachiaria*). Therefore, the objective was to determine the chemical characteristics of nutritional value, biogas production and *in vitro* degradation of corn stubble and mulatto grass treated with the MR and P15 strains of *P. ostreatus* for 15 and 30 d of solid fermentation.

MATERIALS AND METHODS

Study site

The study was carried out in the animal nutrition laboratory of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 of the Universidad Autónoma de Guerrero, located in the municipality of Cuajinicuilapa, Guerrero, Mexico. It is located at 16° 08' N and 98° 23' W, at 50 m altitude, with a warm subhumid climate with rains in summer, an average annual rainfall of 1200 mm, and average annual temperature of 25 °C (INEGI, 2018).

Pleurotus ostreatus strains

The strains were MR and P15 of *Pleurotus ostreatus*. For the reactivation of the strains, we prepared a culture medium based on potato-dextrose agar (BD Bioxon®). The medium was sterilized for 15 min at 15 PSI and 121 °C in an autoclave (All American® 1941X, USA). The medium was poured into Petri dishes until solidification, and they were stored at 4 °C until use. The Petri dishes were inoculated with each strain, sealed with Parafilm paper (Bemis®) and incubated at room temperature (average 30 °C) for 4 d.

Then the inoculum was prepared, 500 g of whole sorghum were boiled in 1 L of distilled water for 30 min, and filtered to remove water excess. The sorghum was then placed in an Erlenmeyer flask, the flask was capped, a cotton and brown paper plug was placed and sterilized. In a biosafety hood (Labconco®, USA), the flask was cooled to room temperature and inoculated with 10 mycelium agar cylinders (1 cm diameter), and incubated at room temperature for 10 d.

un matraz Erlenmeyer, el matraz se tapó, se colocó un tapón de algodón y papel de estraza y se esterilizó. En una campana de bioseguridad (Labconco®, USA), el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se inoculó con 10 cilindros de agar con micelio (1 cm diámetro) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 d.

Sustratos

Los sustratos fueron pasto mulato (*Brachiaria* híbrido) con una edad de rebrote de 150 d y rastrojo de maíz. Los sustratos se deshidrataron en una estufa (Felisa® FE-293a, México) a 60 °C por 72 h y se molieron en molino convencional con malla de 0.5 cm de diámetro. En matraces Erlenmeyer se colocaron 50 g de cada sustrato con 80% de humedad, se colocó un tapón de algodón y papel de estraza y se esterilizó.

Fermento sólido

En una campana de bioseguridad (Labconco®, USA), los matraces con el sustrato estéril se inocularon con 5% P/P de inóculo de MR o P15 de *P. ostreatus*. Después se colocó un tapón de algodón y se incubaron a temperatura ambiente (30 °C promedio) por 15 y 30 d. Al término del periodo de fermentación sólida, el fermento se deshidrató a 60 °C hasta peso constante en una estufa (Felisa® FE-293A, México). Luego, el fermento se molió con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA) según el método 950.02 de la AOAC (2005).

Análisis químico para determinar valor nutricional

En los sustratos rastrojo de maíz y pasto mulato (Cuadro 1) y en los fermentos sólidos se determinó proteína cruda (PC; método 976.05), cenizas (Ce; método 942.05) y materia orgánica (MO) de acuerdo con AOAC (2005); además, fibra detergente neutro

Substrates

The substrates were mulatto grass (*Brachiaria* hybrid) with a regrowth age of 150 d, and corn stubble. The substrates were dehydrated in an oven (Felisa® FE-293a, Mexico) at 60 °C for 72 h and ground in a conventional mill with a mesh of 0.5 cm in diameter. In Erlenmeyer flasks, 50 g of each substrate were placed with 80% humidity, a cotton plug and brown paper, and sterilized.

Solid ferment

In a biosafety hood (Labconco®, USA), the flasks with the sterile substrate were inoculated with 5% P/P inoculum of MR or P15 of *P. ostreatus*. Then a cotton plug was placed and they were incubated at room temperature (30 °C average) for 15 and 30 d. At the end of the solid fermentation period, the ferment was dehydrated at 60 °C to constant weight in an oven (Felisa® FE-293A, Mexico). The ferment was then ground through a 1 mm sieve in a Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA), according to method 950.02 of the AOAC (2005).

Chemical analysis to determine nutritional value

Crude protein (CP; method 976.05), ash (method 942.05) and organic matter (MO) were determined in the maize stubble and mulatto grass substrates, and their solid ferments (Table 1), according to AOAC (2005). Also, neutral detergent fiber (FDN) and acid detergent fiber (FDA) by using the method ANKOM Technology, according to Van Soest *et al.* (1991).

Culture medium

The culture medium contained: 30 mL of clarified ruminal fluid (fresh bovine ruminal fluid centrifuged for 10 min

Cuadro 1. Características químicas de valor nutricional de los sustratos rastrojo de maíz y pasto mulato.

Table 1. Chemical characteristics of nutritional value of maize stubble and mulatto grass substrate.

Sustrato	MS (%)	FDN (%)	FDA (%)	Hemi (%)	PC (%)	Ce (%)	MO (%)
Rastrojo de maíz	94.15	80.94	48.39	32.55	3.03	11.80	88.20
Pasto mulato	91.89	83.53	49.73	33.80	1.74	5.24	94.76

MS: materia seca; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; Hemi: hemicelulosa; PC: proteína cruda; Ce: cenizas; MO: materia orgánica. ♦ MS: dry matter; FDN: neutral detergent fiber; FDA: acid detergent fiber; Hemi: hemicellulose; PC: crude protein; Ce: ash; MO: organic matter.

(FDN) y fibra detergente ácido (FDA) con la metodología de ANKOM Technology acorde con Van Soest *et al.* (1991).

Medio de cultivo

El medio de cultivo contenía: 30 mL de fluido ruminal clarificado (líquido ruminal bovino fresco centrifugado 10 min a 12 857 x g y esterilizado), 5 mL de solución mineral I [6 g K₂HPO₄ (J. T. Baker®) en 1000 mL de agua destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (J. T. Baker®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (J. T. Baker®) + 12 g NaCl (Meyer®) + 2.45 g MgSO₄ (Meyer®) + 1.6 g CaCl-2H₂O (Meyer®) en 1000 mL de agua destilada], 0.1 mL de resazurina a 0.1% (Sigma-Aldrich®), 0.2 g de peptona de soya (MCD Lab®), 0.1 g de extracto de levadura (BD Bioxon®), 4 mL de solución cisteína-sulfido [2.5 g L-cisteína (Sigma-Aldrich®) a pH 10 con 2N NaOH (Meyer®) + 2.5 g de Na₂S-9H₂O (Meyer®) aforado en 100 mL de agua destilada], 5 mL de solución a 8% de Na₂CO₃ (J. T. Baker®) y 50.6 mL de agua destilada. El medio de cultivo se esterilizó según lo descrito por Sánchez-Santillán *et al.* (2016) y Torres-Salado *et al.* (2019).

Solución salina saturada y NaOH (2N)

En 1 L de agua destilada se disolvieron 80 g de NaOH (Meyer®). La solución se vertió en viales serológicos (60 mL) hasta llenarlos por completo para obtener los viales trampa de NaOH (2N). En 1 L de agua destilada se disolvieron 370 g de NaCl y se agregaron 5 mL anaranjado de metilo (Merk®) al 0.1%; el pH se ajustó a 2. La solución se vertió en viales serológicos (120 mL) hasta llenarlos por completo para obtener los viales trampa de solución salina saturada; ambos se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno (20 mm Ø) y con un arillo de aluminio.

Biodigestores

Los biodigestores fueron viales serológicos de vidrio (120 mL) con 0.5 g de fermento sólido y 45 mL de medio de cultivo. Estos viales se mantuvieron en condiciones anaeróbicas con CO₂, se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno (20 mm Ø) y con un arillo de aluminio. Los biodigestores se esterilizaron y se incubaron a 39 °C por 24 h para verificar esterilidad (Herrera-Pérez *et al.*, 2018). Luego se inocularon con 5 mL de fluido ruminal con bacterias ruminales totales obtenidas de una vaca Suiz-bu. La vaca apacentó en praderas de pasto pangola con una edad de rebrote de 60 d antes de tomar la muestra de fluido ruminal. Los biodigestores con fluido ruminal se centrifugaron a 1570 x g por 3 min para precipitar protozoarios y partículas de fibra y se incubaron a 39 °C por 72 h (Texta *et al.*, 2019).

at 12 857 x g, and sterilized), 5 mL of mineral solution I [6 g K₂HPO₄ (JT Baker®) in 1000 mL of distilled water], 5 mL of mineral solution II [6 g KH₂PO₄ (JT Baker®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (JT Baker®) + 12 g NaCl (Meyer®) + 2.45 g MgSO₄ (Meyer®) + 1.6 g CaCl-2H₂O (Meyer®) in 1000 mL of distilled water], 0.1 mL of resazurin at 0.1% (Sigma-Aldrich®), 0.2 g of soy peptone (MCD Lab®), 0.1 g of yeast extract (BD Bioxon®), 4 mL of cysteine-sulfide solution [2.5 g L-cysteine (Sigma-Aldrich®) at pH 10 with 2N NaOH (Meyer®) + 2.5 g of Na₂S-9H₂O (Meyer®) in 100 mL of distilled water], 5 mL of 8% Na₂CO₃ solution (JT Baker®) and 50.6 mL of distilled water. The culture medium was sterilized as described by Sánchez-Santillán *et al.* (2016) and Torres-Salado *et al.* (2019).

Saline solution saturated and NaOH (2N)

In 1 L of distilled water 80 g of NaOH (Meyer®) were dissolved. The solution was poured into serological vials (60 mL) until they were completely filled to obtain the NaOH (2N) trap vials. Then, 370 g of NaCl were dissolved in 1 L of distilled water, and 5 mL methyl orange (Merk®) at 0.1% were added; the pH was adjusted to 2. The solution was poured into serological vials (120 mL) until they were completely filled to obtain the trap vials of saturated saline solution; both were hermetically sealed with a neoprene plug (20 mm Ø) and an aluminum ring.

Biodigesters

Biodigesters were glass serological vials (120 mL) with 0.5 g of solid ferment and 45 mL of culture medium. These vials were kept in anaerobic conditions with CO₂, hermetically sealed with a neoprene stopper (20 mm Ø), and an aluminum ring. Biodigesters were sterilized and incubated at 39 °C for 24 h to verify sterility (Herrera-Pérez *et al.*, 2018). Then, they were inoculated with 5 mL of ruminal fluid with total ruminal bacteria obtained from a Swiss-bu cow. The cow grazed on pangola grass meadows with a regrowth age of 60 d before taking the ruminal fluid sample. Biodigesters with ruminal fluid were centrifuged 1570 x g for 3 min to precipitate protozoa and fiber particles, and were incubated at 39 °C for 72 h (Texta *et al.*, 2019).

Biogas and methane production

A Taygon® hose (2.38 mm internal Ø and 45 cm long) with hypodermic needles (20 G x 32mm) on its ends was used to couple the biodigester with a trap vial of saturated saline solution. The trap vial was placed inverted in a modified cylinder

Producción de biogás y metano

Una manguera Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32mm) en los extremos se usó para acoplar el biodigestor con un vial trampa de solución salina saturada. El vial trampa se colocó de manera inversa en una probeta modificada que sirve para recolectar la solución salina desplazada por los gases producidos durante la incubación por medio de una aguja hipodérmica colocada como válvula de salida. La producción de biogás se midió a las 24, 48 y 72 h. La producción de CH₄ se midió a las 24, 48 y 72 h con el mismo procedimiento que biogás, pero se usó el vial trampa de solución NaOH (2N; Torres-Salado *et al.*, 2019). La producción de CH₄ se tomó como los mL desplazados de la solución NaOH (2N), ya que el CO₂ reacciona con el NaOH formando Na₂CO₃ (Prada-Matiz y Cortés-Castillo, 2011).

Degradación de la materia seca y de la fibra detergente neutro

La muestra residual del biodigestor se filtró en bolsas ANKOM F57 (ANKOM® Technology) a peso constante. Las bolsas con muestra se secaron 24 h a 60 °C en una estufa (Felisa® FE-293A, México). La degradación de la materia seca (DMS) se calculó con la fórmula % DMS = (muestra inicial – muestra residual / muestra inicial) * 100 (Sánchez-Santillán *et al.*, 2019; Hernández-Morales *et al.*, 2018). Las bolsas ANKOM® se sellaron con calor y se determinó el contenido de FDN con la metodología de ANKOM® Technology según Van Soest *et al.* (1991). El porcentaje de degradación de la FDN (% DFDN) se calculó con la fórmula % DFDN = (FDN inicial – FDN residual / FDN inicial) * 100 según Hernández-Morales *et al.* (2018).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2³, los factores fueron tipo de sustrato (rastrajo de maíz y pasto mulato), cepa de *Pleurotus ostreatus* (MR y P15) y tiempo de fermentación sólida (15 y 30 d) con cinco repeticiones por interacción. Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS® (SAS Institute Inc., 2011) y los valores promedio significativos del análisis factorial se compararon con la prueba de Tukey (p≤0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fermento sólido con rastrajo de maíz presentó 24.4% mayor PC que el fermento de pasto mulato; en contraste, el fermento con pasto mulato mostró

that serves to collect the saline solution displaced by the gases produced during incubation by means of a hypodermic needle placed as an outlet valve. Biogas production was measured at 24, 48 and 72 h. CH₄ production was measured at 24, 48 and 72 h with the same procedure as biogas, but using the NaOH solution trap vial (2N; Torres-Salado *et al.*, 2019). The production of CH₄ was recorded as the displaced mL of the NaOH (2N) solution, since CO₂ reacts with NaOH to form Na₂CO₃ (Prada-Matiz and Cortés-Castillo, 2011).

Dry matter and neutral detergent fiber degradation

The residual sample from the biodigester was filtered into ANKOM F57 (ANKOM® Technology) bags at constant weight. The sample bags were dried 24 h at 60 °C in an oven (Felisa® FE-293A, Mexico). Dry matter degradation (DMS) was calculated with the formula % DMS = (initial sample - residual sample / initial sample) * 100 (Sánchez-Santillán *et al.*, 2019; Hernández-Morales *et al.*, 2018). The ANKOM® bags were heat sealed and the FDN content was determined with the ANKOM® Technology methodology, according to Van Soest *et al.* (1991). The percentage of FDN degradation (% DFDN) was calculated with the formula % DFDN = (initial FDN - residual FDN / initial FDN) * 100, according to Hernández-Morales *et al.* (2018).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with a 2³ factorial arrangement, the factors were type of substrate (corn stubble and mulatto grass), *Pleurotus ostreatus* strain (MR and P15) and solid fermentation time (15 and 30 d) with five repetitions by interaction.

The data were analyzed with the GLM procedure of SAS® (SAS Institute Inc., 2011), and the significant mean values of the factor analysis were compared using the Tukey test (p≤0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

The solid ferment with corn stubble presented 24.4% higher PC than the mulatto grass ferment. In contrast, the ferment with mulatto grass showed 8.08% higher hemicellulose than the corn stubble (p≤0.05). The solid ferment inoculated with the MR or P15 strains had no differences in the content of PC or hemicellulose (p>0.05). Regarding the solid fermentation time, the 30-d ferment showed 175.25% higher content of PC and 123% lower content of hemicellulose than the ferment at 15 d

8.08% mayor hemicelulosa que el rastrojo de maíz ($p \leq 0.05$). El fermento sólido inoculado con las cepas MR o P15 no tuvo diferencias en el contenido de PC, ni hemicelulosa ($p > 0.05$). Respecto al tiempo de fermentación sólida, el fermento con 30 d mostró contenido 175.25% mayor de PC y contenido 123% menor de hemicelulosa que el fermento a 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 2). Esto indicó que el tipo de cepa de *P. ostreatus* no influye en el contenido de PC, ni hemicelulosa, mientras que conforme el tiempo es mayor, el fermento se enriquece de PC y disminuye su fracción de hemicelulosa.

Además, el tipo de sustrato usado influyó en el contenido de PC y hemicelulosa. La disminución de la fracción de hemicelulosa respecto al contenido de los sustratos antes del proceso de fermentación sólida (Cuadro 1) es resultado probable de que *P. ostreatus* es un hongo que degrada carbohidratos estructurales por medio de la acción de enzimas xilanasas que hidrolizan la hemicelulosa dentro de su proceso metabólico (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011). Además, la hemicelulosa se usa antes que celulosa y lignina como fuente de energía en la etapa de crecimiento del hongo (Okano *et al.*, 2007).

($p \leq 0.05$; Table 2). This indicated that the type of strain of *P. ostreatus* does not influence the content of PC, or hemicellulose, while as the time is longer, the ferment becomes enriched with PC and its fraction of hemicellulose decreases.

Furthermore, the type of substrate used influenced the PC and hemicellulose content. The decrease of the hemicellulose fraction, respect to the content of the substrates before the solid fermentation process (Table 1), is a probable result of the fact that *P. ostreatus* is a fungus that degrades structural carbohydrates through the action of xylanase enzymes that hydrolyze hemicellulose within their metabolic process (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011). In addition, hemicellulose is used before cellulose and lignin as an energy source in the growth stage of the fungus (Okano *et al.*, 2007).

Regarding the increases in the PC content of the solid ferments evaluated, two explanations can be proposed: the first, that the content increased respect to the mulatto grass or corn stubble before solid fermentation (Table 1) due to the growth of the mycelium of the *P. ostreatus* strains (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019), a fact that contributed microbial

Cuadro 2. Características químicas de valor nutricional y fermentativas *in vitro* de fermentos sólidos que no mostraron tipo de interacción (de primer o segundo orden) por sustrato, cepa de *Pleurotus ostreatus* o tiempo de fermentación sólida.

Table 2. *In vitro* fermentative and nutritional value chemical characteristics of solid ferments that showed no type (first or second order) of interaction by substrate, *Pleurotus ostreatus* strain or solid fermentation time.

Variable	Sustrato		Cepa		Tiempo (d)		EEM
	Pasto mulato	Rastrojo de maíz	MR	P15	15	30	
Hemi	17.64 a	16.32 b	16.61	17.35	23.46 a	10.50 b	1.39
PC	5.00 b	6.22 a	5.42	5.8	2.99 b	8.23 a	0.57
Ce	9.01 b	11.93 a	10.59	10.35	10.91 a	10.03 b	0.37
Biogás	190.28 a	187.98 a	190.68 a	187.58 a	168.49 b	209.77 a	4.50
Metano 24	42.19 a	40.51 a	41.34 a	41.36 a	35.45 b	47.25 a	1.39
Metano 48	9.86 a	8.21 a	8.42 a	9.65 a	7.94 b	10.12 a	0.56
Metano 72	4.55 a	5.27 a	4.99 a	4.83 a	4.93 a	4.89 a	0.23
Metano	56.59 a	53.99 a	54.75 a	55.83 a	48.32 b	62.26 a	1.70
DMS	72.21 b	74.00 a	72.82 a	73.39 a	69.27 b	76.93 a	0.85
DFDN	65.65 b	69.38 a	67.15 a	67.89 a	62.76 b	72.28 a	1.11

a,b: valores medios por fila con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). Hemi: hemicelulosa; PC: proteína cruda; Ce: cenizas; Biogás: mL g⁻¹ MS de las 0 a 72 h; Metano 24: mL g⁻¹ MS de las 0 a 24 h; Metano 48: mL g⁻¹ MS de las 24 a 48 h; Metano 72: mL g⁻¹ MS de las 48 a 72 h; Metano: mL g⁻¹ MS de las 0 a 72 h; DMS: degradación de la materia seca; DFDN: degradación de la fibra detergente neutro; EEM: error estándar de la media. ♦ a,b: mean values per row with different letter are different ($p \leq 0.05$). Hemi: hemicellulose; PC: crude protein; Ce: ash; Biogas: mL g⁻¹ MS from 0 to 72 h; Methane 24: mL g⁻¹ MS from 0 to 24 h; Methane 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; Methane 72: mL g⁻¹ MS from 48 to 72 h; Methane: mL g⁻¹ MS from 0 to 72 h; DMS: degradation of dry matter; DFDN: degradation of neutral detergent fiber; EEM: standard error of the mean.

Respecto a los aumentos en el contenido de PC de los fermentos sólidos evaluados, pueden proponerse dos explicaciones: la primera, que el contenido incrementó respecto al pasto mulato o rastrojo de maíz antes de la fermentación sólida (Cuadro 1) por el crecimiento del micelio de las cepas de *P. ostreatus* (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019), hecho que aportó proteína microbiana (Luna *et al.*, 2013) a los 15 y 30 d de fermentación sólida. La segunda explicación es que una parte de los carbohidratos se degradó a CO₂ y H₂O como parte del metabolismo de las cepas de *P. ostreatus*, lo cual causó pérdida de estos componentes, pero no del contenido de N₂ en la MO de los sustratos (Tuyen *et al.*, 2013). El aumento de la PC en los fermentos sólidos es una ventaja de los subproductos agrícolas o materiales altamente lignocelulósicos con contenido bajo de PC (Tuyen *et al.*, 2012).

Luna *et al.* (2013) registraron 4% de PC en fermentos de paja de cebada por 30 d con *P. ostreatus*, valor inferior a los fermentos de 30 d de nuestro estudio. Okano *et al.* (2006) encontraron 19% de hemicelulosa en fermentos de bagazo de caña de azúcar inoculado con *P. eryngii* por 35 d, lo cual es inferior al contenido de hemicelulosa de los fermentos con 30 d de nuestro estudio. Además, Okano *et al.* (2007) y Tuyen *et al.* (2012) observaron valores superiores en hemicelulosa e inferiores en PC, respecto a los fermentos de 30 d de nuestro estudio en paja de trigo tratada con *P. ostreatus* por 30 d (Okano *et al.*, 2007) y 49 d (Tuyen *et al.*, 2012).

El fermento sólido del sustrato rastrojo de maíz inoculado con la cepa P15 o MR de *P. ostreatus* mostró contenido mayor ($p \leq 0.05$) de MS y Ce, sin diferencias entre la inoculación por tipo de cepa ($p > 0.05$; Cuadro 3). Cabe destacar, el fermento de pasto mulato inoculado con la cepa P15 mostró el contenido menor de Ce ($p \leq 0.05$). Lo anterior indicó que cualquiera de las cepas de *P. ostreatus* no modificó el contenido de MS en los sustratos usados en nuestra investigación, y el tipo de sustrato es responsable del contenido de la MS del fermento sólido. Además, el fermento de 15 d tenía Ce 8.78% mayor que el fermento a los 30 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 4).

El fermento de 30 d mostró contenido mayor de MS en cada sustrato evaluado en nuestro estudio ($p \leq 0.05$), pero el fermento de 30 d con rastrojo de maíz tenía MS 16.46% mayor que el fermento de 30 d con pasto mulato ($p \leq 0.05$; Cuadro 4). Esto muestra que los fermentos de 30 d tienen más

protein (Luna *et al.*, 2013) at 15 and 30 d of solid fermentation. The second explanation is that a part of the carbohydrates was degraded to CO₂ and H₂O as part of the metabolism of *P. ostreatus* strains, which caused a loss of these components, but not of the N₂ content in the MO of the substrates (Tuyen *et al.*, 2013). The PC increase in solid ferments is an advantage of agricultural by-products or highly lignocellulosic materials with low PC content (Tuyen *et al.*, 2012).

Luna *et al.* (2013) recorded 4% PC in barley straw ferments for 30 d with *P. ostreatus*, a lower value than the 30 d ferments in our study. Okano *et al.* (2006) found 19% hemicellulose in sugarcane bagasse ferments inoculated with *P. eryngii* for 35 d, which is lower than the hemicellulose content of the 30 d ferments of our study. Also, Okano *et al.* (2007) and Tuyen *et al.* (2012) observed higher values in hemicellulose and lower in PC than those 30 d ferments of our study in wheat straw treated with *P. ostreatus* for 30 d (Okano *et al.*, 2007) and 49 d (Tuyen *et al.*, 2012).

The solid ferment of the maize stubble substrate inoculated with *P. ostreatus* strain P15 or MR showed a higher content ($p \leq 0.05$) of MS and Ce (ash), without differences between inoculation by type of strain ($p > 0.05$; Table 3). It should be noted that the mulatto grass ferment inoculated with the P15 strain showed the lowest ash content ($p \leq 0.05$). The aforementioned indicated that any of the *P. ostreatus* strains did not modify the MS content in the substrates used in our research, and the type of substrate is responsible for the MS content of the solid ferment. Furthermore, the ferment of 15 d had 8.78% higher ash than the 30-d ferment ($p \leq 0.05$; Table 4).

The 30-day ferment showed a higher MS content in each substrate evaluated in our study ($p \leq 0.05$), but the 30-day ferment with corn stubble had 16.46% MS higher than the 30-day ferment with mulatto grass ($p \leq 0.05$; Table 4). This shows that the 30-d ferments have more MS content, of which more than half is cellulose and lignin in the evaluated substrates. The MS content of the solid ferments increased due to the loss of moisture during solid fermentation, and the ash content was similar to the initial content of the substrates used in the study (Table 1). Tuyen *et al.* (2013) reported that MS and MO contents decreased in solid maize stubble

Cuadro 3. Materia seca, fibra detergente ácido, cenizas y biogás[†] en fermentos sólidos de rastrojo de maíz y pasto mulato inoculados con la cepa MR o P15 de *Pleurotus ostreatus*.

Table 3. Dry matter, acid detergent fiber, ash and biogas[†] in solid ferments of corn stubble and mulatto grass inoculated with the MR or P15 strain of *Pleurotus ostreatus*.

Variable	Pasto mulato		Rastrojo de maíz		EEM
	MR	P15	MR	P15	
MS	24.45 bc	22.67 c	26.17 ab	27.24 a	0.81
FDA	52.37 ab	52.20 ab	54.39 a	49.88 b	1.08
Ce	9.64 b	8.38 c	11.54 a	12.33 a	0.37
Biogás 24	140.43 a	124.07 bc	120.78 c	130.54 b	3.64
Biogás 48	42.37 b	45.74 ab	52.05 a	47.33 ab	1.44
Biogás	195.23 a	185.33 b	186.14 b	189.82 ab	4.50

[†]Las variables presentaron interacción sustrato cepa ($p \leq 0.05$). a,b,c: valores medios por fila con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). MS: materia seca; FDA: fibra detergente ácido; Ce: cenizas; Biogás 24: mL g⁻¹ MS de las 0 a 24 h; Biogás 48: mL g⁻¹ MS de las 24 a 48 h; Biogás: mL g⁻¹ MS de las 0 a 72 h; EEM: error estándar de la media. ♦ [†]Variables presented strain substrate interaction ($p \leq 0.05$). a,b,c: mean values per row with different letter are different ($p \leq 0.05$). MS: dry matter; FDA: acid detergent fiber; Ce: ash; Biogas 24: mL g⁻¹ MS from 0 to 24 h; Biogas 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; Biogas: mL g⁻¹ MS from 0 to 72 h; EEM: standard error of the mean.

Cuadro 4. Materia seca, biogás y metano *in vitro*[†] de los fermentos obtenidos de rastrojo de maíz y pasto mulato en 15 y 30 días de fermentación sólida.

Table 4. Dry matter, biogas and *in vitro* methane[†] of the ferments obtained from corn stubble and mulatto grass at 15-d and 30-d of solid fermentation.

Variable	Pasto mulato		Rastrojo de maíz		EEM
	15 d	30 d	15 d	30 d	
MS	20.93 c	26.19 b	22.91 c	30.50 a	0.81
FDA	46.92 b	57.65 a	48.49 b	55.78 a	1.08
Biogás 48	44.54 b	43.57 b	46.05 b	53.33 a	1.44
Metano 24	37.86 b	46.52 a	33.04 b	47.98 a	1.39
Metano 48	7.71 b	12.01 a	8.18 b	8.24 ab	0.56

[†]Las variables presentaron interacción sustrato tiempo ($p \leq 0.05$). a,b,c: valores medios por fila con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). MS: materia seca; FDA: fibra detergente ácido; Biogás 48: mL g⁻¹ MS de las 24 a 48 h; Metano 24: mL g⁻¹ MS de las 0 a 24 h; Metano 48: mL g⁻¹ MS de las 24 a 48 h; EEM: error estándar de la media. ♦ [†]The variables showed substrate time interaction ($p \leq 0.05$). a,b,c: mean values per row with different letter are different ($p \leq 0.05$). MS: dry matter; FDA: acid detergent fiber; Biogas 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; Methane 24: mL g⁻¹ MS from 0 to 24 h; Methane 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; EEM: standard error of the mean.

contenido de MS, de la cual más de la mitad es celulosa y lignina en los sustratos evaluados. El contenido de MS de los fermentos sólidos aumentó por la pérdida de humedad durante la fermentación sólida y el contenido de Ce fue similar al contenido inicial de los sustratos usados en el estudio (Cuadro 1). Tuyen *et al.* (2013) documentaron que el contenido de MS y MO disminuyó en fermentos sólidos de rastrojo de maíz inoculados con *P. ostreatus*. Además, Tuyen *et*

ferments inoculated with *P. ostreatus*. Also, Tuyen *et al.* (2012) found 10.05% of ash in solid ferment of wheat straw treated with *P. ostreatus* for 49 d, values similar to those of our study. Okano *et al.* (2007) recorded values (3.9% of ash) lower than those of our experiment in sugarcane bagasse treated with *P. eryngii* for 35 d.

The solid ferment of corn stubble with the P15 strain reduced the FDA content by 9.04% ($p \leq 0.05$)

al. (2012) encontraron 10.05% de Ce en fermento sólido de paja de trigo tratada con *P. ostreatus* por 49 d, valores similares a los nuestros. Okano *et al.* (2007) registraron valores (3.9% de Ce) inferiores a nuestro experimento, en bagazo de caña de azúcar tratado con *P. eryngii* por 35 d.

El fermento sólido de rastrojo de maíz con la cepa P15 redujo 9.04% el contenido de FDA ($p \leq 0.05$) respecto al fermento del mismo sustrato con la cepa MR (Cuadro 3), sin diferencias con las otras interacciones ($p > 0.05$). El fermento sólido de 30 d tuvo más FDA en cada sustrato evaluado en nuestro experimento ($p \leq 0.05$). Sin embargo, el fermento de 30 d con rastrojo de maíz tenía 3.35% menos FDA que el fermento de 30 d con pasto mulato ($p \leq 0.05$). Además, los fermentos de 15 d no mostraron diferencias por el tipo de sustrato usado ($p > 0.05$; Cuadro 4).

Los fermentos sólidos inoculados con la cepa MR de *P. ostreatus* aumentaron 23.02% el contenido de FDA de los 15 a los 30 d de fermentación sólida, mientras que la cepa P15 incrementó 14.77% el contenido de FDA en el mismo periodo de fermentación ($p \leq 0.05$). El fermento con la cepa MR mostró 7.96% más FDA que la cepa P15 a los 30 d de incubación ($p \leq 0.05$). Esto mostró que la cepa P15 de *P. ostreatus* tiene capacidad mayor de degradación de celulosa que la cepa MR entre los 15 y 30 d de fermentación sólida (Cuadro 5). La fracción FDA

comparado to the ferment of the same substrate with the MR strain (Table 3), without differences in the other interactions ($p > 0.05$). The 30-d solid ferment had more FDA in each substrate evaluated in our experiment ($p \leq 0.05$). However, the 30-d ferment with corn stubble had 3.35% less FDA than the 30-d ferment with mulatto grass ($p \leq 0.05$). In addition, the 15-d ferments showed no differences due to the type of substrate used ($p > 0.05$; Table 4).

The solid ferments inoculated with *P. ostreatus* MR strain increased FDA content by 23.02% from 15 to 30 d of solid fermentation. While the P15 strain increased by 14.77% the FDA content in the same fermentation period ($p \leq 0.05$). The ferment with the MR strain produced 7.96% more FDA than the P15 strain at 30 d of incubation ($p \leq 0.05$). This showed that the P15 strain of *P. ostreatus* has a greater capacity for cellulose degradation than the MR strain between 15 and 30 d of solid fermentation (Table 5). The FDA fraction increased in the ferments evaluated in our study compared to the initial content of mulatto grass and corn stubble (Table 1).

The FDA is composed of cellulose and lignin, so *P. ostreatus* showed little metabolic activity for the use of cellulose, and this carbohydrate remained intact for its hydrolysis into fermentable sugars (Méndez-Hernández *et al.*, 2019; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). In addition, the content of lignocellulosic

Cuadro 5. Fibra detergente ácido, biogás, degradación de materia seca y degradación de fibra detergente neutro[†] de fermentos inoculados con la cepa MR o P15 de *Pleurotus ostreatus* en 15 y 30 días de fermentación sólida.

Table 5. Acid detergent fiber, biogas, degradation of dry matter and degradation of neutral detergent fiber[†] of ferments inoculated with *Pleurotus ostreatus* strain MR or P15 at 15 and 30 days of solid fermentation.

Variable	MR		P15		EEM
	15 d	30 d	15 d	30 d	
FDA	47.87 c	58.89 a	47.53 c	54.55b	1.08
Biogás 24	118.23 b	142.98 a	109.52 c	145.1a	3.64
Biogás 48	41.68 c	52.74 a	48.92ab	44.16bc	1.44
DMS	68.25 c	77.38 a	70.30b	76.49a	0.85
DFDN	61.33 c	72.97 a	64.20b	71.58a	1.11

[†]Las variables presentaron interacción cepa tiempo ($p \leq 0.05$). a,b,c: valores medios por fila con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). FDA: fibra detergente ácido; Biogás 24: mL g⁻¹ MS de 0 a 24 h; Biogás 48: mL g⁻¹ MS de 24 a 48 h; DMS: degradación de la materia seca; DFDN: degradación de la fibra detergente neutro; EEM: error estándar de la media. ♦ [†]The variables presented strain time interaction ($p \leq 0.05$). a,b,c: mean values per row with different letter are different ($p \leq 0.05$). FDA: acid detergent fiber; Biogas 24: mL g⁻¹ MS from 0 to 24 h; Biogas 48: mL g⁻¹ MS from 24 to 48 h; DMS: degradation of dry matter; DFDN: degradation of neutral detergent fiber; EEM: standard error of the mean.

aumentó en los fermentos evaluados en el nuestro estudio comparados con el contenido inicial del pasto mulato y rastrojo de maíz (Cuadro 1).

La FDA está compuesta por celulosa y lignina, por lo que *P. ostreatus* pudo mostrar poca actividad metabólica para el uso de celulosa, y este carbohidrato quedó intacto para su hidrólisis en azúcares fermentables (Méndez-Hernández *et al.*, 2019; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). Además, el contenido de enlaces lignocelulósicos de los sustratos y el tiempo de exposición a las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* se reflejaron en el contenido de FDA. La degradación de la pared celular inicia en la pared secundaria y lámina media por acción de las enzimas lacasas (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019), así como un aumento en la síntesis de ácidos orgánicos y consumo de carbohidratos solubles por el hongo durante la fermentación sólida (Peláez-Acero *et al.*, 2011).

El contenido menor de FDN se presentó en los fermentos de rastrojo de maíz inoculados con la cepa P15 y 30 d de fermentación ($p \leq 0.05$). En contraste, todos los fermentos de 15 d mostraron contenidos mayores de FDN ($p > 0.05$). Cabe destacar que la cepa P15 en ambos sustratos y la cepa MR en pasto mulato redujeron el contenido de FDN de los 15 a los 30 d de fermentación sólida, lo cual indica que el hongo consumió pared celular para su crecimiento (Cuadro 6). Los fermentos tuvieron menor FDN en comparación a los sustratos iniciales (Cuadro 1) por acción de las cepas de *P. ostreatus* porque usaron la hemicelulosa como fuente de energía para su crecimiento, antes de degradar la lignina (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019).

La variación en el contenido de FDN y FDA de los fermentos evaluados en nuestro estudio se pueden suponer producto de la composición de la pared celular del pasto mulato y rastrojo de maíz. Así como a la estructura química de la lignina y del complejo lignina-carbohidrato de los sustratos. Además, los niveles de degradación de las fibras detergentes son consecuencia de los complejos enzimáticos activos en los diferentes tiempos de incubación (Okano *et al.*, 2007). Según Luna *et al.* (2013), una fracción de estos componentes forma un complejo lignina-carbohidrato que resiste la hidrólisis enzimática.

Tuyen *et al.* (2013) encontraron valores inferiores en FDN (64.68%) y FDA (48.52 %) a los nuestros, en rastrojo de maíz tratado con *P. ostreatus* por 42 d. Con el mismo hongo *P. ostreatus* y 16 d de fermentación

bonds of the substrates and the exposure time to the MR and P15 strains of *P. ostreatus* were expressed in the FDA content. Degradation of the cell wall begins in the secondary wall and middle lamina due to the action of laccase enzymes (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019); and there is an increase in the synthesis of organic acids and consumption of soluble carbohydrates by the fungus during solid fermentation (Peláez-Acero *et al.*, 2011).

The lower content of FDN was recorded in the corn stubble ferments inoculated with the P15 strain and 30 d of fermentation ($p \leq 0.05$). In contrast, all the 15-d ferments showed the highest FDN content ($p > 0.05$). It is worth mentioning that the P15 strain in both substrates and the MR strain in mulatto grass reduced the FDN content from 15 to 30 d of solid fermentation, which indicates that the fungus consumed cell wall for its growth (Table 6).

The ferments had lower FDN compared to the initial substrates (Table 1) due to the action of the *P. ostreatus* strains because they used hemicellulose as an energy source for their growth, before degrading the lignin (Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019).

The variation in the contents of FDN and FDA of the ferments evaluated in our study can be assumed as a product of the composition of the cell wall of mulatto grass and corn stubble. As well as the chemical structure of lignin and the lignin-carbohydrate complex of the substrates. Also, the levels of degradation of the detergent fibers are a consequence of the active enzyme complexes at the different incubation times (Okano *et al.*, 2007). According to Luna *et al.* (2013), a fraction of these components forms a lignin-carbohydrate complex that resists enzymatic hydrolysis.

Tuyen *et al.* (2013) found lower values in FDN (64.68%) and FDA (48.52%) than ours in corn stubble treated with *P. ostreatus* for 42 d. With the same *P. ostreatus* fungus and 16 d of solid fermentation, Soto-Sánchez *et al.* (2015) documented higher values in FDN (81.59%) and similar values of FDA (47.43%) in barley straw ferments, compared to our study in 15 d. Okano *et al.* (2007) published lower values of FDN (31.83%) and FDA (48.76%) in wheat straw ferments with *P. ostreatus* for 30 d compared to the *P. ostreatus* ferments for 30 d in any substrate of our experiment.

The former values are attributed to the enzymatic specificity of the substrate, moisture content of the

sólida, Soto-Sánchez *et al.* (2015) documentaron valores superiores en FDN (81.59%) y similares de FDA (47.43%) en fermentos de paja de cebada, comparados con nuestro estudio a los 15 d. Okano *et al.* (2007) publicaron valores inferiores de FDN (31.83%) y FDA (48.76%) en fermentos de paja de trigo con *P. ostreatus* por 30 d comparados con los fermentos de *P. ostreatus* por 30 d en cualquier sustrato de nuestro experimento.

Los valores anteriores se atribuyen a la especificidad enzimática por el sustrato, contenido de humedad de los sustratos al inicio de la fermentación sólida (Peláez-Acero *et al.*, 2011), especie de hongo usada (Tuyen *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015), tiempo de fermentación (Soto-Sánchez *et al.*, 2015), tipo y composición de sustrato (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Tuyen *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015), patrón de degradación de los carbohidratos estructurales del sustrato (Tuyen *et al.*, 2013) y temperatura (Okano *et al.*, 2006). Estos factores son determinantes en la composición química con valor nutricional del fermento sólido (Tuyen *et al.*, 2013; Soto-Sánchez *et al.*, 2015). Por lo tanto, la selección de las cepas o especies de hongos es fundamental como tratamiento previo óptimo de residuos agrícolas o altamente lignocelulósicos (Nayan *et al.*, 2018) para una degradación selectiva de lignina sin consumo relevante de celulosa (Méndez-Hernández *et al.*, 2019) y hemicelulosa.

La mayor producción parcial de biogás a las 24 h fue del fermento obtenido de la cepa MR en pasto mulato ($p \leq 0.05$), 16.27% más biogás que el fermento obtenido con la misma cepa, al usar rastrojo de maíz como sustrato. El fermento de la cepa P15 no presentó diferencias entre sustratos ($p > 0.05$; Cuadro 3). En la misma variable no hubo diferencias entre los fermentos obtenidos de las cepas de *P. ostreatus* durante 30 d de fermentación sólida ($p > 0.05$); pero a los 15 d el fermento de la cepa MR produjo 7.95% más biogás parcial a las 24 h que la cepa P15 ($p \leq 0.05$; Cuadro 5).

Respecto a la producción parcial de biogás a 48 h, la cepa MR de *P. ostreatus* produjo 22.85% más biogás cuando se inoculó en rastrojo de maíz que en pasto mulato ($p \leq 0.05$); mientras, el fermento inoculado con la cepa P15 de *P. ostreatus* no presentó diferencias con la cepa MR en cualquiera de los dos sustratos evaluados ($p > 0.05$; Cuadro 3). Además, entre los tiempos de fermentación sólida, en el pasto mulato

sustratos at the beginning of solid fermentation (Peláez-Acero *et al.*, 2011); species of fungus (Tuyen *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015); fermentation time (Soto-Sánchez *et al.*, 2015); type and composition of substrate (Peláez-Acero *et al.*, 2011; Tuyen *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015); degradation pattern of substrate structural carbohydrates (Tuyen *et al.*, 2013) and temperature (Okano *et al.*, 2006). These factors are determinant in the chemical composition with nutritional value of the solid ferment (Tuyen *et al.*, 2013; Soto-Sánchez *et al.*, 2015). Therefore, the selection of fungal strains or species is essential as an optimal pre-treatment of agricultural or highly lignocellulosic residues (Nayan *et al.*, 2018) for a selective degradation of lignin without a relevant consumption of cellulose (Méndez-Hernández *et al.*, 2019) and hemicellulose.

The highest partial biogas production at 24 h was from the ferment obtained from the MR strain in mulatto grass ($p \leq 0.05$), 16.27% more biogas than the ferment obtained with the same strain, when using corn stubble as substrate. The ferment of strain P15 showed no differences between substrates ($p > 0.05$; Table 3). In the same variable, there were no differences between the ferments obtained from the *P. ostreatus* strains during 30 d of solid fermentation ($p > 0.05$), but at 15 d the ferment of the MR strain produced 7.95% more partial biogas at 24 h than the P15 strain ($p \leq 0.05$; Table 5).

Regarding the partial production of biogas at 48 h, the MR strain of *P. ostreatus* produced 22.85% more biogas when it was inoculated in corn stubble than in mulatto grass ($p \leq 0.05$); whereas the ferment inoculated with the P15 strain of *P. ostreatus* did not show differences with the MR strain in any of the two substrates evaluated ($p > 0.05$; Table 3). In addition, between the solid fermentation times, in the mulatto grass there were no differences ($p > 0.05$), and when the substrate was corn stubble the biogas production increased 15.81% from 15 to 30 d ($p \leq 0.05$; Table 4). Both solid fermentation periods did not show differences when inoculating the substrates with the P15 strain of *P. ostreatus* ($p > 0.05$), but when the MR strain of *P. ostreatus* was used, the biogas production was 26.54% higher in the ferments with 30 d than in those of 15 d ($p \leq 0.05$; Table 5).

The highest partial biogas production at 72 h was from the ferment obtained from mulatto grass inoculated with the P15 strain of *P. ostreatus* for 30 d ($p \leq 0.05$), showing no differences with the ferments

no hubo diferencias ($p > 0.05$), y cuando el sustrato fue rastrojo de maíz, la producción de biogás aumentó 15.81% de los 15 a los 30 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 4). Ambos tiempos de fermentación sólida no mostraron diferencias al inocular los sustratos con la cepa P15 de *P. ostreatus* ($p > 0.05$), pero cuando se usó la cepa MR de *P. ostreatus* la producción de biogás fue 26.54% mayor en los fermentos con 30 d que de 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 5).

La mayor producción parcial de biogás a 72 h fue del fermento obtenido de pasto mulato inoculado con la cepa P15 de *P. ostreatus* por 30 d ($p \leq 0.05$), sin diferencias con los fermentos obtenidos con cualquiera de los sustratos inoculados con la cepa MR de *P. ostreatus* por 30 d ($p > 0.05$; Cuadro 6). La producción de biogás acumulado es una relación indirecta de la disponibilidad de los carbohidratos durante la fermentación ruminal (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a). Cuando se usó pasto mulato como sustrato, la cepa MR produjo 5.34% más biogás ($p \leq 0.05$) que la cepa P15, pero con rastrojo de maíz como sustrato las cepas de *P. ostreatus* no mostraron diferencias en la producción de biogás acumulado ($p > 0.05$; Cuadro 3). Cabe destacar, los fermentos con 30 d produjeron 24.50% más biogás acumulado que los fermentos con 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 2).

obtained with any of the substrates inoculated with the MR strain of *P. ostreatus* for 30 d ($p > 0.05$; Table 6). Production of accumulated biogas is an indirect relationship of the availability of carbohydrates during ruminal fermentation (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a). When mulatto grass was used as a substrate, the MR strain produced 5.34% more biogas ($p \leq 0.05$) than the P15 strain, but with corn stubble as a substrate, the *P. ostreatus* strains showed no differences in the production of accumulated biogas ($p > 0.05$; Table 3). It should be noticed that 30-d ferments produced 24.50% more accumulated biogas than 15-d ferments ($p \leq 0.05$; Table 2).

The partial production of biogas makes it possible to indirectly estimate the availability of carbohydrates from solid ferments during fermentation by ruminal microorganisms, because during the first 24 h non-structural carbohydrates are fermented (Herrera-Pérez *et al.*, 2018; Torres-Salado *et al.*, 2019; Texta *et al.*, 2019) of the cellular content (Herrera-Pérez *et al.*, 2018); and of the protein fraction (Torres-Salado *et al.*, 2019). From 48 h of incubation, the production of biogas would be the product of the capacity of the inoculated ruminal microorganisms to degrade structural carbohydrates (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a; Torres-Salado *et al.*, 2019).

Cuadro 6. Fibra detergente neutro y biogás *in vitro*† de fermentos obtenidos de rastrojo de maíz y pasto mulato inoculado con la cepa MR o P15 de *Pleurotus ostreatus* en 15 y 30 días de fermentación sólida.
Table 6. Neutral detergent fiber and *in vitro* biogas† of fermentos obtained from corn stubble and mulatto grass inoculated with the MR or P15 strain of *Pleurotus ostreatus* in 15 and 30 days of solid fermentation.

Sustrato	Cepa	Tiempo	FDN	Biogás 72
Pasto mulato	MR	15 d	70.92 abc	8.73 cd
		30 d	67.69 d	16.12 abc
	P15	15 d	72.18 a	9.52 cd
		30 d	68.9 cd	21.52 a
Rastrojo de maíz	MR	15 d	71.77 ab	8.01 d
		30 d	69.57 bcd	18.61 ab
	P15	15 d	69.78 abcd	11.01 cd
		30 d	62.68	12.89 bcd
EEM			0.61	1.07

†Las variables presentaron interacción sustrato cepa tiempo ($p \leq 0.05$). a,b,c: valores medios por columna con letra distinta son diferentes ($p \leq 0.05$). FDN = fibra detergente neutro; Biogás 72 = mL g⁻¹ MS de las 48 a 72 h; EEM = error estándar de la media. ♦ †The variables showed substrate strain time interaction ($p \leq 0.05$). a,b,c: mean values per column with different letter are different ($p \leq 0.05$). FDA = neutral detergent fiber; Biogas 72: mL g⁻¹ MS from 48 to 72 h; EEM: standard error of the mean.

La producción parcial de biogás permite estimar indirectamente la disponibilidad de los carbohidratos de los fermentos sólidos durante la fermentación por microorganismos ruminales, porque durante las primeras 24 h se fermentan los carbohidratos no estructurales (Herrera-Pérez *et al.*, 2018; Torres-Salado *et al.*, 2019; Texta *et al.*, 2019) del contenido celular (Herrera-Pérez *et al.*, 2018) y la fracción proteica (Torres-Salado *et al.*, 2019). Desde las 48 h de incubación, la producción de biogás sería producto de la capacidad de los microorganismos ruminales inoculados para degradar los carbohidratos estructurales (Sanchez-Santillán *et al.*, 2015a; Torres-Salado *et al.*, 2019).

Herrera-Pérez *et al.* (2018) documentaron una producción acumulada de 133.0 y 232.9 mL de biogás g⁻¹ MS a las 24 y 72 h en rastrojo de maíz, valores superiores a los fermentos obtenidos en nuestro estudio con el rastrojo de maíz como sustrato. Almaraz-Buendía *et al.* (2019) registraron un volumen máximo de biogás para el pasto mulato de 82.10 mL g⁻¹ MS, valor menor al de nuestro estudio con los fermentos de pasto mulato. Mientras que Herrera-Pérez *et al.* (2018) encontraron 247 mL de biogás g⁻¹ MS en pasto cobra con 56 d de rebrote, lo cual es mayor al de nuestro experimento en los fermentos del pasto mulato.

Estas diferencias en la producción de biogás se atribuyen a que los fermentos provienen de un proceso fermentativo donde *P. ostreatus* consumió carbohidratos solubles y hemicelulosa para su crecimiento (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). Esto redujo la disponibilidad de carbohidratos para la fermentación ruminal. Okano *et al.* (2006) informaron valores similares a la producción de biogás de los fermentos de 30 d de nuestro estudio en bagazo de caña de azúcar tratado con *P. eryngii* por 35 d, pero la producción de biogás de los fermentos de 15 d de nuestro estudio es superior a la publicada por Soto-Sánchez *et al.* (2015) en fermentos de paja de cebada por 16 d con *P. ostreatus*.

La producción de CH₄ parcial a las 24 h aumentó en el fermento con 30 d respecto al de 15 d, porque la producción de CH₄ fue 22.87% mayor en el sustrato pasto mulato y 45.22% más alta en el rastrojo de maíz, respectivamente (p≤0.05; Cuadro 2). La producción parcial de CH₄ a 48 h no mostró diferencias en los fermentos obtenidos de rastrojo de maíz a los 15 o 30 d (p>0.05), mientras el fermento con

Herrera-Pérez *et al.* (2018) reported a cumulative production of 133.0 and 232.9 mL of biogas g⁻¹ MS at 24 and 72 h in corn stubble, values higher than the ferments obtained in our study with corn stubble as substrate. Almaraz-Buendía *et al.* (2019) reported a maximum biogas volume for mulatto grass of 82.10 mL g⁻¹ MS, which is lower than that recorded in our study of ferments with mulatto grass. Whilst Herrera-Pérez *et al.* (2018) found 247 mL of biogas g⁻¹ MS in cobra grass with 56 d of regrowth, which is a greater value than that of our experiment in ferments of mulatto grass.

These differences in biogas production are attributed to the fact that the ferments come from a fermentative process where *P. ostreatus* consumed soluble carbohydrates and hemicellulose for growing (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015a; Olivera-De la Cruz *et al.*, 2019). This fact reduced the availability of carbohydrates for ruminal fermentation. Okano *et al.* (2006) reported similar values to the biogas production of the 30-d ferments of our study, in sugarcane bagasse treated with *P. eryngii* for 35 d, but the biogas production of the 15-d ferments of our study is higher than that reported by Soto-Sánchez *et al.* (2015) in barley straw ferments for 16 d with *P. ostreatus*.

The partial CH₄ production at 24 h increased in the ferment of 30 d compared to that of 15 d because the production of CH₄ was 22.87% higher in the mulatto grass substrate and 45.22% higher in the corn stubble, respectively (p≤0.05; Table 2). The partial production of CH₄ at 48 h showed no differences in the ferments obtained from corn stubble with 15 or 30 d (p>0.05), while the ferment with mulatto grass for 30 d produced 55.77% more partial CH₄ at 48 h than the ferment with mulatto grass for 15 d (p≤0.05; Table 4). The partial CH₄ production at 24 h and 48 h of the ferments with the MR or P15 strain of *P. ostreatus* showed no differences (p>0.05) with means of 41.35 and 9.04 mL g⁻¹ of MS, respectively (Table 2).

The partial production of CH₄ at 72 h and accumulated CH₄ showed no differences between the mulatto grass and corn stubble substrates, nor between the MR and P15 strains of *P. ostreatus* (p>0.05; Table 2). In the factor time of solid fermentation, the partial production of CH₄ at 72 h was not different between 15 and 30 d (p>0.05), but in accumulated CH₄ the ferment with 30 d produced

pasto mulato por 30 d produjo 55.77% más CH₄ parcial a 48 h que el fermento con pasto mulato por 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 4). La producción de CH₄ parcial a las 24 h y 48 h de los fermentos con la cepa MR o P15 de *P. ostreatus* no presentaron diferencias ($p > 0.05$), con promedios de 41.35 y 9.04 mL g⁻¹ de MS, respectivamente (Cuadro 2).

La producción parcial de CH₄ a 72 h y CH₄ acumulado no mostró diferencias entre los sustratos pasto mulato y rastrojo de maíz, ni entre las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* ($p > 0.05$; Cuadro 2). En el factor tiempo de fermentación sólida la producción parcial de CH₄ a 72 h no fue diferente entre 15 y 30 d ($p > 0.05$), pero en CH₄ acumulado el fermento con 30 d produjo 28.85% más CH₄ que 15 d ($p \leq 0.05$; Cuadro 2). En promedio, la producción de CH₄ de los fermentos de pasto mulato y rastrojo de maíz representó 29.74 y 28.72% del total de biogás producido. En los fermentos con 15 d, el CH₄ fue 28.68% del total de biogás, con un aumento de un punto porcentual en los fermentos con 30 d. Herrera-Pérez *et al.* (2018) publicaron que el CH₄ representó 18.12 y 21.71% del total de biogás en rastrojo de maíz y pasto cobra con 56 d de rebrote.

Todo lo anterior permite afirmar que la disponibilidad de carbohidratos estructurales en nuestro estudio mejoró con el tratamiento de los sustratos con *P. ostreatus*, ya que la fermentación de carbohidratos estructurales por bacterias celulolíticas genera producción mayor de CH₄ porque sus productos finales de fermentación son acetato e H₂ (Vanegas *et al.*, 2017; Torres-Salado *et al.*, 2019). Esto propicia una relación sintrópica con las arqueas metanogénicas del rumen, las cuales usan el H₂ y CO₂ como sustrato para producir CH₄ como parte de su metabolismo (Torres-Salado *et al.*, 2019). Según Tuyen *et al.* (2013), la producción de CH₄ representó 20% de total de biogás en fermentos de rastrojo de maíz con *P. ostreatus*, valores inferiores a nuestro estudio.

La degradación mayor de MS (DMS) y degradación de la FDN (DFDN) mayor ocurrieron en los fermentos con 30 d de fermentación sólida con cualquiera de las cepas de *P. ostreatus* ($p \leq 0.05$), en promedios de 76.94 y 72.28%, respectivamente. En los fermentos de 15 d, la cepa P15 de *P. ostreatus* presentó 3.0 y 4.68% mayores DMS y DFDN que la cepa MR de *P. ostreatus* ($p \leq 0.05$; Cuadro 5). Estos resultados concuerdan con Olivera-De la Cruz *et al.* (2019), quienes mencionaron que el tiempo de

28.85% more CH₄ than that of 15 d ($p \leq 0.05$; Table 2). On average, CH₄ production from mulatto grass and corn stubble ferments represented 29.74 and 28.72% of the total biogas produced. In the 15-d ferments, CH₄ was 28.68% of the total biogas, with an increase of one percentage point in the 30-d ferments. Herrera-Pérez *et al.* (2018) reported that CH₄ represented 18.12 and 21.71% of the total biogas in corn stubble and cobra grass with 56 d of regrowth.

The former allows us to affirm that the availability of structural carbohydrates in our study improved with the treatment of substrates with *P. ostreatus* since the fermentation of structural carbohydrates by cellulolytic bacteria generates greater production of CH₄ because their final fermentation products are acetate and H₂ (Vanegas *et al.*, 2017; Torres-Salado *et al.*, 2019). This favors a syntropic relationship with the methanogenic archaea in the rumen, which use H₂ and CO₂ as a substrate to produce CH₄ as part of their metabolism (Torres-Salado *et al.*, 2019). According to Tuyen *et al.* (2013), CH₄ production represented 20% of total biogas in corn stubble ferments with *P. ostreatus*, values lower than those reported in our study.

The greatest degradation of dry matter (DMS) and degradation of neutral detergent fiber (DFDN) occurred in the ferments with 30 d of solid fermentation with any of the *P. ostreatus* strains ($p \leq 0.05$) with an average of 76.94 and 72.28%, respectively. In the 15-d ferments, the P15 strain of *P. ostreatus* presented 3.0 and 4.68% higher DMS and DFDN than the MR strain of *P. ostreatus* ($p \leq 0.05$; Table 5). These results agree with those reported by Olivera-De la Cruz *et al.* (2019), who mentioned that the exposure time of the fungus in the substrate increases the degradation of the cell wall. Likewise, the ferment with corn stubble presented 2.48 and 5.68% higher DMS and DFDN than the mulatto grass ($p \leq 0.05$; Table 2). Herrera-Pérez *et al.* (2018) reported 60.84 and 51.32% of DMS and DFDN, values lower than those recorded in our study. Almaraz-Buendía *et al.* (2019) found 45.20 and 47.42% in mulatto grass with 60 d of regrowth, lower than those of our study.

Comparisons allow us to assume that the incorporation of ligninolytic fungi into forages with high fiber content, as in our experiment, favors fiber degradation due to enzymatic action. This is because

exposición del hongo en el sustrato aumenta la degradación de la pared celular. Así mismo, el fermento con rastrojo de maíz presentó 2.48 y 5.68% mayores DMS y DFDN que el pasto mulato ($p \leq 0.05$; Cuadro 2). Herrera-Pérez *et al.* (2018) informaron 60.84 y 51.32% de DMS y DFDN, valores inferiores a los de nuestro estudio. Almaraz-Buendía *et al.* (2019) encontraron 45.20 y 47.42% en pasto mulato con 60 d de rebrote, inferiores a los de nuestro estudio.

Las comparaciones permiten suponer que la incorporación de hongos ligninolíticos a forrajes con alto contenido de fibra, como en nuestro experimento, favorece la degradación de la fibra por acción enzimática. Esto porque *P. ostreatus* es un degradador eficaz de lignina (Tuyen *et al.*, 2013) y aumenta las fracciones digeribles de los sustratos (Okano *et al.*, 2007) durante su fermentación en rumen (Tuyen *et al.*, 2012). El uso potencial de *P. ostreatus* como mejorador de la degradación de los sustratos lignocelulósicos se determina por el tipo y condición de estos durante el proceso de fermentación sólida (Nayan *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

El uso de las cepas MR y P15 de *Pleurotus ostreatus* como pretratamiento del rastrojo de maíz y pasto mulato por 30 días redujo el contenido de fibra detergente neutro e incrementó la proteína cruda. Estas mejoras se reflejaron en la producción de biogás, metano y degradaciones *in vitro*; lo cual indicó que el tratamiento de estos sustratos con *P. ostreatus* mejoró la disponibilidad de nutrientes en la fermentación con microorganismos en el rumen.

AGRADECIMIENTOS

Al Cuerpo Académico UAGro-CA-183 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero, vía el proyecto "Producción sustentable de rumiantes en el trópico" por el financiamiento de esta investigación.

LITERATURA CITADA

Almaraz-Buendía, I., A. M. García, P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, J. Herrera-Pérez, M. B. Bottini-Luzardo, y A. R. Rojas-García. 2019. Análisis bromatológico y producción de gas *in vitro* de forrajes utilizados en el trópico seco mexicano. Arch. Zootec. 68: 260-266.

P. ostreatus is an effective lignin degrader (Tuyen *et al.*, 2013) and increases the digestible fractions of substrates (Okano *et al.*, 2007) during fermentation in the rumen (Tuyen *et al.*, 2012). The potential use of *P. ostreatus* as an enhancer of the degradation of lignocellulosic substrates is determined by the type and condition of these during the solid fermentation process (Nayan *et al.*, 2018).

CONCLUSIONS

The use of *Pleurotus ostreatus* strains MR and P15 as a pretreatment of maize stubble and mulatto grass for 30 days reduced the content of neutral detergent fiber and increased crude protein. These improvements were expressed in the production of biogas, methane and *in vitro* degradations; which indicated that the treatment of these substrates with *P. ostreatus* improved the availability of nutrients in the fermentation with the microorganisms in rumen.

—End of the English version—



- AOAC (Association of Official Analytic Chemists). 2005. Official methods of analysis. 18th ed. Association of Official Analytic Chemists, Washington, D.C., USA. 1094 p.
- Hernández-Morales, J., P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, J. Herrera-Pérez, A. R. Rojas-García, I. Reyes-Vázquez, y M. A. Mendoza-Núñez. 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. Rev. Mex. Cienc. Pec. 9: 105-120.
- Herrera-Pérez, J., L. G. Vélez-Regino, P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, A. R. Rojas-García, y M. A. Maldonado-Peralta MA. 2018. *In vitro* fermentation of fibrous substrates by water buffalo ruminal cellulolytic bacteria consortia. MVZ Cordoba. 23: 6860-6870.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2018. Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos. www.beta.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=12023 (Acceso: octubre 2018).
- Luna, L., M. Meneses, G. Mendoza, C. Montalvo, y O. Loera. 2013. Efecto y actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en pared celular de rastrojo de cebada. LRRD. 25: 1-13.
- Méndez-Hernández, J. E., O. Loera, E. M. Méndez-Hernández, E. Herrera, O. Arce-Cervantes, and N. O. Soto-Cruz. 2019. Fungal pretreatment of corn stover by *Fomes* sp. EUM1: simultaneous production of readily hydrolysable biomass and useful biocatalysts. Waste Biomass Valorization. 10: 2637-2650.

- Nayan, N., J. W. Cone, A. S. M. Sonnenberg, and W. H. Hendriks. 2018. Screening of white-rot fungi for bioprocessing of wheat straw into ruminant feed. *J. Appl. Microbiol.* 125: 468-479.
- Okano, K., Y. Iida, M. Samsuri, B. Prasetya, T. Usagawa, and T. Watanabe. 2006. Comparison of *in vitro* digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. *Anim. Sci. J.* 77: 308-313.
- Okano K., S. Fukui, R. Kitao, and T. Usagawa. 2007. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on *in vitro* digestibility and chemical composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136: 240-247.
- Olivera-De la Cruz, A. R., E. Ortega-Jiménez, P. Díaz-Rivera, E. Aranda-Ibáñez, J. Ramos-Juárez, y G. Mendoza-Martínez. 2019. Efecto de *Pleurotus ostreatus* en la degradación de los residuos agrícolas. *Agrociencia.* 53: 25-33.
- Peláez-Acero A., M. Meneses-Mayo, L. A. Miranda-Romero, M. Ayala-Martínez, M. M. Crosby-Galván, O. Loera-Corral, y M. D. Megías-Rivas. 2011. Enzimas fibrolíticas producidas por fermentación en estado sólido para mejorar los ensilajes de caña de azúcar. *Agrociencia.* 45: 675-685.
- Prada-Matiz, A., y C.E. Cortés-Castillo. 2011. Experiencias en la captura de los gases de combustión de la cascarilla de arroz con soluciones alcalinas. *Orinoquia.* 15:16-30.
- Sánchez-Santillán, P., M. Meneses-Mayo, L. A. Miranda-Romero, E. Santellano-Estrada, y B. Alarcón-Zúñiga. 2015a. Actividad fibrolítica y producción de gas por *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*-EUM1 en bagazo de caña. *MVZ Córdoba* 20: 4907-4916.
- Sánchez-Santillán, P., M. M. Meneses, and N. Torres-Salado. 2015b. Production of lignocellulolytic enzymes with *Pleurotus ostreatus*-IE8 by solid fermentation and its effect on the chemical composition of sugarcane bagasse. *Life Sci. J.* 12:37-41.
- Sánchez-Santillán, P., M. A. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez, A. I. Alvarado, D. Espinosa-Victoria, y J. G. Herrera-Haro. 2016. Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia* 50: 575-582.
- Sánchez-Santillán, P., J. Herrera-Pérez, N. Torres-Salado, I. Almaraz-Buendía, I. Reyes-Vázquez, A. R. Rojas-García, M. Gómez-Trinidad M, E. O. Contreras-Ramírez, M. A. Maldonado-Peralta, and F. Magadan-Olmedo. 2019. Chemical composition, and *in vitro* fermentation of ripe mango silage with molasses. *Agroforest. Syst.* <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00442-z>
- SAS Institute, Inc. 2011. Statistical Analysis Software (SAS/STAT). Version 9.33 Ed. Cary, NC. USA. 528 pp.
- Shrivastava, B., S. Thakur, Y. P. Khasa, A. Gupte, A. P. Kumar, and R. K. Chander. 2011. White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. *Biodegradation.* 22: 823-831.
- Soto-Sánchez, A., J. E. Ramírez-Bribiesca, M. Meneses-Mayo, O. Loera-Corral, L. A. Miranda-Romero, and R. Bárcena-Gama. 2015. Effects of *Pleurotus sapidus* (Schulzer) Sacc. treatment on nutrient composition and ruminal fermentability of barley straw, barley rootless, and a mixture of the two. *Chilean J. Agric. Research.* 75: 313-319.
- Texta, N. J., P. Sánchez-Santillán, D. S. Hernández, N. Torres-Salado, M. G. Crosby, A. R. Rojas-García, J. P. Herrera, and M. A. P. Maldonado. 2019. Use of disaccharides and activated carbon to preserve cellulolytic ruminal bacterial consortiums lyophilized. *MVZ Córdoba.* 24: 7305-7313.
- Torres-Salado, N., P. Sánchez-Santillán, A. R. Rojas-García, I. Almaraz-Buendía, J. Herrera-Pérez, I. Reyes-Vázquez, y F. J. Mayren-Mendoza. 2019. *In vitro* gas production and fermentative characteristics of ruminal cellulolytic bacterial consortia of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Suiz-bu cow. *Agrociencia.* 53: 145-159.
- Tuyen, V. D., J. W. Cone, J. J. P. Baars, A. S. M. Sonnenberg, and W. H. Hendriks. 2012. Fungal strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for rumen fermentation. *Bioresour Technol.* 111: 336-342.
- Tuyen, V. D., H. N. Phuong, J. W. Cone, J. J. P. Baars, A. S. M. Sonnenberg, and W. H. Hendriks. 2013. Effect of fungal treatments of fibrous agricultural by-products on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation and methane production. *Bioresour Technol.* 129: 256-263.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Vanegas, J. L., J. González, and M. D. Carro. 2017. Influence of protein fermentation and carbohydrate source on *in vitro* methane production. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101: e288-e296.

VALIDACIÓN DE LA ESCALA MEXICANA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA A TRAVÉS DE CORRELACIÓN TETRACÓRICA CON BASE EN LA DISTRIBUCIÓN NORMAL ASIMÉTRICA BIVARIADA

VALIDATION OF MEXICAN FOOD SECURITY SCALE THROUGH TETRACHORIC CORRELATION BASED ON BIVARIATE SKEW NORMAL DISTRIBUTION

Ana Laura **Ramírez Jiménez**^{1*}, Martha Elva **Ramírez Guzmán**², Elizabeth **González Estrada**²

¹Oyametla Mz. 73 Lt. 8, Colonia San Bernabé Ocotepc, Magdalena Contreras, 10300, CDMX. (laurar_j@hotmail.com). ²Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México.

RESUMEN

La evaluación de la seguridad alimentaria en México se realiza por medio de la Escala Mexicana de Seguridad Alimentaria (EMSA) compuesta por reactivos de respuesta dicotómica que miden el acceso a los alimentos en los hogares con y sin menores de 18 años. Una manera de validar la EMSA es a través del Análisis de Factores Confirmatorio (AFC) al contrastar la estructura de las variables latentes con los datos observados. La correlación entre los reactivos de la EMSA se obtiene con la correlación tetracórica de una tabla de contingencia de doble entrada, la cual asume variables latentes con distribución Normal. Sin embargo, el supuesto de simetría restringe la admisión de variables que no cumplen con este supuesto, como las económicas que se caracterizan por su distribución asimétrica. El objetivo de esta investigación fue proponer un estimador de la correlación tetracórica para diferentes niveles de asimetría. Este coeficiente se denominó $\tilde{\rho}_{t_{SN}}$ el cual minimiza la diferencia entre la proporción de coincidencias de las variables dicotómicas en estudio y la probabilidad de la distribución Normal Asimétrica bivariada. El $\tilde{\rho}_{t_{SN}}$ se caracterizó por su consistencia y robustez estadística en los diferentes niveles de asimetría considerados. Los modelos AFC con los datos de la EMSA 2014 confirmaron la estructura teórica de la escala para adultos. En hogares con menores, el AFC sugirió una confusión en el entendimiento de los reactivos asociados con experiencias de hambre. El modelo sugiere que la falta de dinero o recursos limita la variedad de los alimentos y elimina algún tiempo de comida tanto en adultos como en menores. Estos hallazgos solo fueron visibles en el AFC con la inclusión del coeficiente $\rho_{t_{SN}}$ propuesto. El método de estimación propuesto permite analizar

ABSTRACT

Food security in Mexico is evaluated using the Mexican Food Security Scale (EMSA), composed of dichotomous-response items that measure access to food in households with and without children (members under 18 years-old). One way to validate EMSA is through Confirmatory Factor Analysis (CFA), by comparing the structures of latent variables with the observed data. The correlation between EMSA items is obtained using tetrachoric correlation on a double-entry contingency table, which assumes latent variables with a normal distribution. However, the symmetry assumption does restrict the admission of variables that do not satisfy this assumption, such as economic variables, which are characterized by a skewed distribution. The aim of this research was to propose an estimator of the tetrachoric correlation for different levels of skewness. This coefficient was denoted $\tilde{\rho}_{t_{SN}}$, which minimizes the difference between the proportion of coincidences of the dichotomous variables under study and the probability of the Bivariate Skew Normal distribution. $\tilde{\rho}_{t_{SN}}$ was characterized by its statistical consistency and robustness at the different levels of skewness considered. The CFA models with EMSA 2014 data confirmed the theoretical structure of the scale for adults. In households with children, the CFA suggested a confusion in the comprehension of items related to hunger experiences. The model suggests that a lack of money or resources limits the variety of food and forces either adults or children to skip one meal. These findings were only visible by the CFA with the inclusion of the proposed coefficient $\rho_{t_{SN}}$. The proposed estimation method helps analyze the correlation between dichotomous variables with a certain level of skewness, which can be defined with knowledge of the topic under study.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2020. Aprobado: agosto, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 55: 55-71. 2021.

la correlación entre variables dicotómicas con cierto nivel de asimetría, el cual puede definirse a partir del conocimiento del tema en estudio.

Palabras clave: correlación tetracórica, normal asimétrica, simulación Monte Carlo, análisis de factores confirmatorio, validez, Escala Mexicana de Seguridad Alimentaria.

INTRODUCCIÓN

La medición de la seguridad alimentaria en México se realiza por medio de la Escala Mexicana de Seguridad Alimentaria (EMSA). Esta escala es un conjunto de 12 reactivos de respuesta dicotómica que permite la identificación de cuatro posibles grados de inseguridad alimentaria: inseguridad alimentaria severa; inseguridad alimentaria moderada; inseguridad alimentaria leve, y seguridad alimentaria. A partir de los grados de inseguridad alimentaria se construye el indicador de carencia por acceso a la alimentación, de modo que la población considerada como carente es aquella que vive en hogares con inseguridad alimentaria moderada o severa (CONEVAL, 2010).

Ya que las escalas se utilizan para cuantificar conceptos teóricos que no se pueden medir directamente, la validez de dichos instrumentos constituye un elemento básico en la comprensión del tema en cuestión. Es decir, que las escalas, como todos los instrumentos de medición, deben tener la capacidad de medir el constructo que pretenden cuantificar, de modo que, los resultados que se generan a partir de ellas adquieren sentido únicamente si provienen de una herramienta válida desde el punto de vista científico (Pérez-Gil, 2000). La validez se refiere a la capacidad de reflejar el rasgo que se pretende medir por medio de las variables observables, es decir, el grado en el cual la teoría y la evidencia empírica respaldan las conclusiones obtenidas por medio de los resultados de la escala. Asimismo, en el caso de las escalas de seguridad alimentaria, la validez posibilita la identificación de los grupos de riesgo y vulnerables en el tema de la alimentación y enfrentar de manera efectiva la problemática de la seguridad alimentaria.

Con base en la metodología propuesta por FAO (2012), Villagómez *et al.* (2014) realizaron pruebas de validación a la EMSA por medio del ordenamiento de reactivos, coeficiente de Cronbach, paralelismo de curvas de prevalencia y el modelo de Rasch;

Key words: tetrachoric correlation, skew normal, Monte Carlo simulation, confirmatory factor analysis, validity, Mexican Food Security Scale (EMSA).

INTRODUCTION

Food security in Mexico is measured using the Mexican Food Security Scale (EMSA). This scale is a set of 12 dichotomous-response items that allow the identification of four possible degrees of food insecurity: severe food insecurity, moderate food insecurity, mild food insecurity and food security. From the degrees of food insecurity, the indicator of lack of access to food is constructed; thus, the population that is considered deprived is formed by those who live in households with moderate or severe food insecurity (CONEVAL, 2010).

Since the scales are used to quantify theoretical concepts that cannot be measured directly, the validity of such instruments constitutes a basic element in the comprehension of the subject at hand. That is, scales, like all measurement instruments, must be able to measure the construct which they intend to quantify, so that results produced from them are only meaningful if they come from a scientifically validated tool (Pérez-Gil, 2000). Validity refers to the ability to reflect the trait to be measured using observable variables, *i.e.* the degree to which theory and empirical evidence support the conclusions obtained by the results of the scale. Likewise, in the case of food security scales, validity helps identifying groups at risk and vulnerable groups in terms of food security, in order to tackle the problem of food security in an effective way.

Based on the methodology proposed by FAO (2012), Villagómez *et al.* (2014) performed validation tests on EMSA by sorting of items, calculating the Cronbach coefficient, the parallelism of prevalence curves and the estimation of Rasch model. They concluded that the EMSA has the conceptual and technical solidity of its results. However, there are statistical alternatives to analyze the validity of the scale, and therefore reinforce its scientific basis. The Confirmatory Factor Analysis (CFA) is one of them, and uses correlation matrix of the observed variables as an input. In addition, the CFA is considered an adequate analytical tool to empirically test the theoretical structure of an instrument. From the relationship between the latent characteristics it

concluyeron que la EMSA cuenta con la solidez conceptual y técnica de sus resultados. Sin embargo, existen otras alternativas estadísticas para analizar la validez de la escala y con ello, reforzar su fundamento científico. El Análisis de Factores Confirmatorio (AFC) es una de ellas y utiliza como insumo la matriz de correlación de las variables observadas. Además, el AFC se considera como una herramienta analítica apropiada para probar de manera empírica la estructura teórica de un instrumento. A partir de la relación entre los rasgos latentes que representa y sus variables manifiestas, permite la incorporación de una teoría o hipótesis establecida previamente para formalizar el modelo que será puesto a prueba.

La correlación entre los reactivos de la EMSA se obtiene por medio de la correlación tetracórica, la cual se basa en variables latentes con distribución Normal. Sin embargo, el supuesto de simetría restringe la admisión de variables que no cumplen con este supuesto, como las económicas que se caracterizan por su distribución asimétrica.

Por lo tanto, en esta investigación se propone un método para estimar la correlación tetracórica que incluye el nivel de asimetría y realizar la validación de la EMSA por medio del AFC con matrices de correlación que consideran distintos niveles de asimetría.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de información

La Escala Mexicana de Seguridad Alimentaria (EMSA) es un conjunto de 12 reactivos que miden el concepto teórico de la seguridad alimentaria a través de preguntas con las cuales es posible conocer, si por falta de dinero o recursos, los hogares enfrentan cambios tanto en la cantidad como en la calidad de los alimentos, e incluso, si han tenido experiencias de hambre. Los reactivos son de respuesta dicotómica (Sí=1, No=0), se ordenan en un continuo de severidad y permiten distinguir el acceso a los alimentos de los adultos y el de los menores de 18 años (Villagómez *et al.*, 2014). Los reactivos de la EMSA son los siguientes:

Reactivos para adultos

ALIM_01: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez usted o algún adulto en su hogar tuvo una alimentación basada en muy poca variedad de alimentos?

ALIM_02: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez usted o algún adulto en su hogar dejó de desayunar, comer o cenar?

representa, and its manifest variables, CFA helps incorporate a previously established theory or hypothesis to formalize the model to be tested.

The correlation between EMSA items is obtained by tetrachoric correlation, which is based on latent variables with a normal distribution. However, the symmetry assumption does restrict the admission of variables that do not satisfy this assumption, such as economic variables, which are characterized by their skewed distribution.

Therefore, this research proposes a method to estimate the tetrachoric correlation that includes the level of skewness; and to validate EMSA using CFA with correlation matrices considering different levels of skewness.

MATERIALS AND METHODS

Data source

The Mexican Food Security Scale (EMSA) is a set of 12 items that measure the theoretical concept of food security using questions to find out if households face changes in food quantity and quality, or even if they have experienced hunger, due to lack of money or resources. The items have dichotomous responses (Yes=1, No=0), they are ordered in a continuum of severity and are used to identify degrees of access to food in adults and members under 18 years-old (Villagómez *et al.*, 2014). The EMSA items are as follows:

Items for adults

ALIM_01: In the past three months, due to lack of money or resources, have you or has any adult in your household had a diet based on a very little variety of food?

ALIM_02: In the past three months, due to lack of money or resources, have you or has any adult in your household had to skip breakfast, lunch or dinner?

ALIM_03: In the past three months, due to lack of money or resources, have you or has any adult in your household eaten less than you think you should have?

ALIM_04: In the past three months, due to a lack of money or resources, have you run out of food?

ALIM_05: In the past three months, due to lack of money or resources, were you or was any adult in your household hungry, but did not eat?

ALIM_06: In the past three months, due to lack of money or resources, have you or has any adult in your household eaten only once a day or not at all in an entire day?

ALIM_03: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez usted o algún adulto en su hogar comió menos de lo que usted piensa debía comer?

ALIM_04: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez se quedaron sin comida?

ALIM_05: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez usted o algún adulto en su hogar sintió hambre pero no comió?

ALIM_06: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez usted o algún adulto en su hogar sólo comió una vez al día o dejó de comer todo un día?

Reactivos para menores de 18 años

ALIM_07: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez algún menor de 18 años en su hogar tuvo una alimentación basada en muy poca variedad de alimentos?

ALIM_08: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez algún menor de 18 años en su hogar comió menos de lo que debía?

ALIM_09: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez tuvieron que disminuir la cantidad servida en las comidas a algún menor de 18 años del hogar?

ALIM_10: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez algún menor de 18 años en su hogar sintió hambre pero no comió?

ALIM_11: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez algún menor de 18 años en su hogar se acostó con hambre?

ALIM_12: En los últimos tres meses, por falta de dinero o recursos, ¿alguna vez algún menor de 18 años en su hogar comió una vez al día o dejó de comer todo un día?

Los resultados de la EMSA son de acceso público y están disponibles en la página oficial del Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL).

El Análisis de Factores Confirmatorio es una técnica estadística que se utiliza en la validación de escalas. Con base en la correlación existente entre las variables medibles se contrasta la correspondencia teórica con el constructo que se quiere cuantificar a partir de la especificación de un modelo hipotético (Suárez, 2015).

Análisis de Factores Confirmatorio

El Análisis de Factores Confirmatorio (AFC) es una técnica estadística que permite especificar la relación entre la variable latente o constructo que se desea medir y las variables observables, también llamadas variables manifiestas.

Items for individuals under 18 years-old

ALIM_07: In the past three months, due to lack of money or resources, has any underage person in your household had a diet based on a very little variety of food?

ALIM_08: In the past three months, due to lack of money or resources, has any underage person in your household eaten less than you think they should have?

ALIM_09: In the past three months, due to lack of money or resources, did you ever have to serve less food to any underage person in your household?

ALIM_10: In the past three months, due to lack of money or resources, was any underage person in your household hungry but did not eat?

ALIM_11: In the past three months, due to lack of money or resources, did any underage person in your household go to bed hungry?

ALIM_12: In the past three months, due to lack of money or resources, has any underage person in your household eaten only once a day or not at all in an entire day?

The results of the EMSA are of public access and available on the official website of the Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL).

The Confirmatory Factor Analysis is a statistical technique used to validate scales. Based on the existing correlation between measurable variables, the theoretical correspondence is contrasted with the construct to be quantified from the specification of a hypothetical model (Suárez, 2015).

Confirmatory Factor Analysis

The Confirmatory Factor Analysis (CFA) is a statistical technique to specify the relation between a latent variable or construct to be measured and observed variables, also called manifest variables.

The matrix representation of the existing relation between observed and latent variables corresponds to the following model:

$$\underline{X} = \Lambda \underline{F} + \underline{\varepsilon} \quad (1)$$

where \underline{X} is the p -dimensional vector of observable endogenous indicators, Λ is the $p \times m$, dimensional factorial loadings matrix, \underline{F} is the m -dimensional vector of factors or latent variables and $\underline{\varepsilon}$ is the p -dimensional vector of measurement errors. The CFA model considers that the factors and the measurement errors are independent, *i.e.* $\text{corr}(\underline{F}, \underline{\varepsilon}) = 0$.

La representación matricial de la relación existente entre las variables observables y las variables latentes corresponde al siguiente modelo:

$$\underline{X} = \Lambda \underline{F} + \underline{\varepsilon} \quad (1)$$

donde \underline{X} es el vector de p indicadores endógenos observables, Λ es la matriz de cargas factoriales de dimensión $p \times m$, \underline{F} es el vector de m factores o variables latentes y $\underline{\varepsilon}$ es el vector de los p errores de medición. El modelo AFC considera que los factores y los errores de medición son independientes, es decir, $\text{corr}(\underline{F}, \underline{\varepsilon}) = 0$.

Si $\underline{F} \sim N_m(\underline{0}, I)$ y $\underline{\varepsilon} \sim N_p(\underline{0}, \Theta_\varepsilon)$, entonces $\underline{X} \sim N_p(\underline{0}, \Sigma)$. Dado que $\text{Cov}(\underline{F}, \underline{X}) = \Lambda$, la matriz de varianzas y covarianzas Σ puede expresarse como:

$$\Sigma = \Lambda \Lambda' + \Theta_\varepsilon \quad (2)$$

En la diagonal principal de Θ_ε se encuentran las varianzas de los errores de medición de cada indicador endógeno observable y fuera de la diagonal están las covarianzas entre los errores de medición. Por lo tanto, la matriz Θ_ε forma parte del modelo de AFC. Lo anterior representa una de las principales ventajas del AFC, dado que permite incluir explícitamente al error de medición ($\underline{\varepsilon}$) en el modelo, a diferencia de los modelos clásicos de regresión.

La hipótesis principal a contrastar en el AFC es que si el modelo es correcto, la matriz de varianzas y covarianzas poblacional (Σ) puede reproducirse por la matriz de varianzas y covarianzas asociada con el modelo teórico ($\Sigma(\theta)$). Donde θ puede sustituirse por $\hat{\theta}$, un estimador de máxima verosimilitud, mínimos cuadrados ordinarios, mínimos cuadrados generalizados, entre otros, a fin de que la diferencia entre $\Sigma(\hat{\theta})$ y Σ sea mínima. Dado que Σ no es conocida, se utiliza la matriz de covarianzas de la muestra (S) como el estimador de Σ en (2).

Medidas de bondad de ajuste

Kline (2011) propuso que la evaluación del ajuste del modelo se realice en función de índices de ajuste globales e individuales. Los índices globales evalúan el grado de ajuste del modelo en su conjunto, mientras que los índices individuales permiten la evaluación de los parámetros del modelo. Los índices de ajuste global que se usan con mayor frecuencia se enuncian a continuación (Acock, 2013).

Índice Comparativo de Ajuste (CFI), por sus siglas en inglés). Compara el ajuste del modelo propuesto y el ajuste de un modelo

If $\underline{F} \sim N_m(\underline{0}, I)$ and $\underline{\varepsilon} \sim N_p(\underline{0}, \Theta_\varepsilon)$, then $\underline{X} \sim N_p(\underline{0}, \Sigma)$. Given $\text{Cov}(\underline{F}, \underline{X}) = \Lambda$, variances and covariances matrix Σ can be expressed as:

$$\Sigma = \Lambda \Lambda' + \Theta_\varepsilon \quad (2)$$

In the main diagonal Θ_ε there are the variances of the measurement errors of each observed endogenous indicator; and outside the diagonal, there are the covariances between measurement errors. Hence, matrix Θ_ε is a part of the CFA model. This is one of the main advantages of the CFA, since it helps explicitly include measurement error ($\underline{\varepsilon}$) in the model, unlike classic regression models.

The main hypothesis to contrast in the AFC is that, if the model is correct, variance and covariance population matrix (Σ) can be reproduced with the variance and covariance matrix associated with the theoretical model ($\Sigma(\theta)$), where θ can be substituted for $\hat{\theta}$, a maximum likelihood estimator, ordinary least squares, generalized least squares, and others, so that the difference between $\Sigma(\hat{\theta})$ and Σ be minimal. Given that Σ is unknown, sample covariance matrix (S) is used as the estimator of Σ in (2).

Goodness-of-fit Indices

Kline (2011) proposed that evaluation of the goodness of fit of the model be carried out based on global and individual fit indices. Global indices evaluate the degree of fit of the model in its entirety, whereas individual indices help evaluate parameters of the model. The most frequently used global fit indices are presented below (Acock, 2013).

Comparative Fit Index (CFI). It compares the adjustment of the proposed model and the adjustment of a model of independent variables, *i.e.* the one in which all covariances are equal to zero. The CFI is defined as follows:

$$CFI = 1 - \frac{\text{máximo}[(\chi_m^2 - g_m^l), 0]}{\text{máximo}[(\chi_0^2 - g_0^l), 0]}$$

where χ_m^2 and g_m^l are the values of the chi-square statistic and the degrees of freedom for the proposed model, respectively; χ_0^2 and g_0^l are the values of the chi-square statistic and the degrees of freedom for the independent variables model, respectively.

Root Mean Square Error of Approximation (RMSEA). It measures the difference between $\Sigma(\hat{\theta})$ and S. This is a

de variables independientes; es decir, en el cual todas las covarianzas son cero. El CFI se calcula como:

$$CFI = 1 - \frac{\text{máximo} \left[\left(\chi_m^2 - g_m \right), 0 \right]}{\text{máximo} \left[\left(\chi_0^2 - g_0 \right), 0 \right]}$$

donde χ_m^2 y g_m son los valores del estadístico ji-cuadrada y los grados de libertad del modelo propuesto, respectivamente; χ_0^2 y g_0 son los valores del estadístico ji-cuadrada y los grados de libertad del modelo de variables independientes, respectivamente.

Error de aproximación cuadrático medio (RMSEA, por sus siglas en inglés). Mide la diferencia entre las matrices $\Sigma(\hat{\theta})$ y S . Este es un índice de parsimonia, ya que su valor disminuye a medida que el modelo tiene más grados de libertad o el tamaño de muestra (n) crece.

$$RMSEA = \sqrt{\text{máximo} \left\{ \left[\frac{\left(\chi_m^2 - g_m \right), 0}{g_m (n - 1)} \right], 0 \right\}}$$

Residuo cuadrático medio estandarizado (SRMR, por sus siglas en inglés). Es la raíz cuadrada del promedio de los residuales al cuadrado. Si el cálculo de los residuales se realiza a partir de las matrices de correlación, el SRMR estará en términos de la correlación residual media y facilita su interpretación porque las correlaciones están en la misma escala, lo cual no sucede con las covarianzas que varían respecto a la variable y a la unidad de medida.

Residuales estandarizados (STD RES, por sus siglas en inglés). Diferencia estandarizada entre las covarianzas observadas (S) y las covarianzas estimadas por el modelo $\Sigma(\hat{\theta})$.

Los índices de ajuste individual, o índices de ajuste del modelo de medida, se refieren a la evaluación de la significancia estadística del vector de parámetros estimados $\hat{\theta}$, los porcentajes de varianza explicada por el factor y el porcentaje explicado por los errores de medición, así como la magnitud y el sentido de las cargas factoriales.

Cuando las variables observables consideradas en el AFC son de tipo cuantitativo, la estimación de los parámetros del modelo se realiza a partir de la matriz de varianzas y covarianzas, mientras que para variables de tipo cualitativo se realiza a partir de la matriz de correlación (Byrne, 2016). En el caso de variables dicotómicas, la prueba χ^2 de independencia de dos variables no indica la magnitud ni la dirección de la asociación. Una alternativa para ello es la correlación tetracórica (Pearson, 1900), la cual permite

parsimony index, since its value decreases as the model has more degrees of freedom or the sample size (n) grows.

$$RMSEA = \sqrt{\text{máximo} \left\{ \left[\frac{\left(\chi_m^2 - g_m \right), 0}{g_m (n - 1)} \right], 0 \right\}}$$

Standardized Root Mean Square Residual (SRMR). It is the square root of the average square of residuals. If the calculation of residuals is obtained from correlation matrices, the SRMR will result in terms of the mean residual correlation, thus making its interpretation easier, because correlations are in the same scale. This is not the case with covariances, due to they vary in relation to the variable and the measurement unit.

Standardized Residuals (STD RES). Standardized difference between observed covariances (S) and the covariances estimated using the model $\Sigma(\hat{\theta})$.

Individual fit indices, or measurement model fit indices, refer to the evaluation of statistical significance of the vector of estimated parameters $\hat{\theta}$, the proportion of variance explained by the factor and the proportion explained by measurement errors, as well as the magnitude and the direction of the factor loadings.

When observed variables considered in the CFA are quantitative, estimation of parameters of the model is carried out from the variance and covariance matrix, whereas for qualitative variables, is carried out from the correlation matrix (Byrne, 2016). In the case of dichotomous variables, the χ^2 test of independence of two variables does not indicate the magnitude nor the direction of the association. An alternative for this is the tetrachoric correlation (Pearson, 1900), which helps finding the magnitude and the direction of the association. Kline (2011) proposed the use of the tetrachoric correlation in the CFA model (1) to analyze dichotomous variables.

Tetrachoric correlation

If we consider that the measurement of two variables, X and Y , with dichotomous response (0 and 1) of n individuals is summarized in a contingency table, where a , b , c and d represent the observed frequencies of each combination of levels of X and Y ; then, the proportions related to these frequencies are displayed in Figure 1.

Let us suppose that observed variables X and Y are related to continuous latent variables X^* and Y^* , respectively. Let z_1 and z_2 be the thresholds to identify each one of the categories of dichotomous variables X and Y as follows:

conocer la magnitud y la dirección de la asociación. Kline (2011) propuso utilizar la correlación tetracórica en el modelo de AFC (1) para analizar variables dicotómicas.

Correlación tetracórica

Si se considera que la medición de dos variables, X y Y , con respuesta dicotómica (0 y 1) de n individuos se resume en una tabla de contingencia, donde a, b, c y d representan las frecuencias observadas de cada combinación de los niveles de X y Y ; entonces, las proporciones asociadas con estas frecuencias se muestran en la Figura 1.

Al suponerse que las variables observables, X y Y , se relacionan con variables latentes continuas X^* y Y^* , respectivamente; y cuando z_1 y z_2 son umbrales que permiten identificar cada una de las categorías de las variables dicotómicas X y Y de la siguiente manera:

$$X = \begin{cases} 0 & \text{si } X^* \leq z_1 \\ 1 & \text{si } X^* > z_1 \end{cases} \quad Y = \begin{cases} 0 & \text{si } Y^* \leq z_2 \\ 1 & \text{si } Y^* > z_2 \end{cases}; \text{ se asume que el vector aleatorio } (X^*, Y^*)' \text{ tiene una distribución Normal estándar}$$

bivariada $N_2(\underline{0}, \underline{\Omega})$, donde $\underline{\Omega} = \begin{pmatrix} 1 & \rho_t \\ \rho_t & 1 \end{pmatrix}$ y ρ_t es la correlación entre las variables latentes X^* y Y^* .

Los cuantiles que definen las proporciones marginales de X y Y a partir de la función de distribución Normal Estándar Φ son:

$$z_1 = \Phi^{-1}\left(\frac{a+b}{n}\right) \\ z_2 = \Phi^{-1}\left(\frac{a+c}{n}\right)$$

Los umbrales z_1 y z_2 definen el punto de corte que divide a la distribución Normal estándar bivariada en cuatro cuadrantes, cuyas probabilidades corresponden a las proporciones observadas (Figura 1).

El coeficiente de correlación tetracórica ρ_t , definido por Pearson (1900), satisface que:

$$\frac{a}{n} = \int_{-\infty}^{z_2} \int_{-\infty}^{z_1} \varphi(x^*, y^*, \rho_t) dx^* dy^*$$

donde $\varphi(\cdot)$ es la función de densidad de la Normal estándar bivariada.

Este coeficiente de correlación no considera el nivel de asimetría en las variables latentes, el cual puede incorporarse por medio de la distribución normal asimétrica.

		Y		
		0	1	
X	0	$\frac{a}{n}$	$\frac{b}{n}$	$\frac{a+b}{n}$
	1	$\frac{c}{n}$	$\frac{d}{n}$	$\frac{c+d}{n}$
		$\frac{a+c}{n}$	$\frac{b+d}{n}$	1

Figura 1. Tabla de proporciones de las combinaciones de las variables dicotómicas X y Y .

Figure 1. Table of proportions for the combinations of dichotomous variables X and Y .

$$X = \begin{cases} 0 & \text{si } X^* \leq z_1 \\ 1 & \text{si } X^* > z_1 \end{cases} \quad Y = \begin{cases} 0 & \text{si } Y^* \leq z_2 \\ 1 & \text{si } Y^* > z_2 \end{cases};$$

The random vector $(X^*, Y^*)'$ is assumed to have a bivariate standard normal distribution $N_2(\underline{0}, \underline{\Omega})$, where $\underline{\Omega} = \begin{pmatrix} 1 & \rho_t \\ \rho_t & 1 \end{pmatrix}$ and ρ_t is the correlation between latent variables X^* and Y^* .

The quantiles that define marginal proportions of X and Y from a standard normal distribution function Φ are:

$$z_1 = \Phi^{-1}\left(\frac{a+b}{n}\right) \\ z_2 = \Phi^{-1}\left(\frac{a+c}{n}\right)$$

Thresholds z_1 and z_2 define the cut-off point dividing bivariate standard normal distribution into four quadrants, the probabilities of which correspond to the observed proportions (Figure 1).

The tetrachoric correlation coefficient ρ_t , defined by Pearson (1900), satisfies:

$$\frac{a}{n} = \int_{-\infty}^{z_2} \int_{-\infty}^{z_1} \varphi(x^*, y^*, \rho_t) dx^* dy^*$$

where, $\varphi(\cdot)$ is the normal bivariate standard density function.

This correlation coefficient does not consider the level of skewness in the latent variables, which can be incorporated through a skew normal distribution.

Distribución Normal Asimétrica

Azzallini (1985) dio a conocer de manera formal la definición de la familia de distribuciones Normales Asimétricas (SN, por sus siglas en inglés), como una generalización de la familia de distribuciones Normales. La familia SN incluye, además de los parámetros de localidad y escala, un parámetro de forma (α) que permite regular la asimetría de la distribución. La distribución SN ha sido de gran interés porque comparte muchas de las propiedades de la distribución Normal (Azzallini y Capitanio, 2014).

Distribución Normal Asimétrica univariada

Una variable aleatoria continua X tiene distribución Normal Asimétrica con parámetro de forma α , denotada como $X \sim SN(\alpha)$, si su función de densidad es:

$$f_x = 2 \varphi(x) \Phi(\alpha x) \quad \forall x \in \mathfrak{R}; \alpha \in \mathfrak{R}$$

donde $\varphi(\cdot)$ y $\Phi(\cdot)$ corresponden a las funciones de densidad y distribución de la Normal estándar, respectivamente.

Distribución Normal Asimétrica bivariada

Sean $\underline{X} = (X_1, X_2)'$ una variable aleatoria continua en \mathfrak{R}^2 , $\varphi_2(\cdot)$ la función de densidad de la distribución Normal bivariada con media $\underline{0}$ y matriz de correlación $\underline{\Omega} = \begin{pmatrix} 1 & \omega \\ \omega & 1 \end{pmatrix}$, $\Phi(\cdot)$ la función de distribución de la Normal estándar y $\underline{\alpha} = (\alpha_1, \alpha_2)' \in \mathfrak{R}^2$. La función de densidad de \underline{X} es:

$$f_{\underline{X}} = 2\varphi_2(\underline{x}, \underline{\Omega})\Phi(\underline{\alpha}'\underline{x}) \tag{3}$$

donde \underline{X} tiene distribución Normal Asimétrica bivariada con parámetro de forma $\underline{\alpha}$ y se denota como $\underline{X} \sim SN_2(\underline{\Omega}, \underline{\alpha})$.

Distribuciones marginales de la Normal Asimétrica bivariada

Si $\underline{X} = (X_1, X_2)' \sim SN_2(\underline{\Omega}, \underline{\alpha})$, las distribuciones marginales de X_1 y X_2 son $SN(\bar{\alpha}_1)$ y $SN(\bar{\alpha}_2)$ (Azzallini y Capitanio, 1999), respectivamente, donde los parámetros de forma son:

$$\bar{\alpha}_1 = \frac{\alpha_1 + \omega\alpha_2}{\sqrt{1 + (1 - \omega^2)\alpha_2^2}} \tag{4}$$

$$\bar{\alpha}_2 = \frac{\alpha_2 + \omega\alpha_1}{\sqrt{1 + (1 - \omega^2)\alpha_1^2}} \tag{5}$$

Skew Normal Distribution

Azzallini (1985) formally published the definition of Skew Normal distribution family (SN), as a generalization of the Normal distribution family. The SN family includes location and scale parameters, and also a parameter of shape (α), which helps regulate the skewness of the distribution. SN distribution has been of great interest, because it shares many properties of the normal distribution (Azzallini and Capitanio, 2014).

Univariate Skew Normal Distribution

A continuous random variable X has a skew normal distribution with a parameter of shape α , denoted as $X \sim SN(\alpha)$, if its density function is:

$$f_x = 2 \varphi(x) \Phi(\alpha x) \quad \forall x \in \mathfrak{R}; \alpha \in \mathfrak{R}$$

where $\varphi(\cdot)$ and $\Phi(\cdot)$ correspond to the density and distribution functions of the standard Normal, respectively.

Bivariate Skew Normal Distribution

Let $\underline{X} = (X_1, X_2)'$ be a continuous random variable in \mathfrak{R}^2 ; $\varphi_2(\cdot)$, the density function of bivariate normal distribution with mean $\underline{0}$ and correlation matrix $\underline{\Omega} = \begin{pmatrix} 1 & \omega \\ \omega & 1 \end{pmatrix}$, $\Phi(\cdot)$ the standard normal distribution function and $\underline{\alpha} = (\alpha_1, \alpha_2)' \in \mathfrak{R}^2$. Then, the density function of \underline{X} is:

$$f_{\underline{X}} = 2\varphi_2(\underline{x}, \underline{\Omega})\Phi(\underline{\alpha}'\underline{x}) \tag{3}$$

where \underline{X} has a bivariate skew normal distribution with a parameter of shape $\underline{\alpha}$ and is denoted as $\underline{X} \sim SN_2(\underline{\Omega}, \underline{\alpha})$.

Marginal distributions of Bivariate Skew Normal Distribution

Let be $\underline{X} = (X_1, X_2)' \sim SN_2(\underline{\Omega}, \underline{\alpha})$; then the marginal distributions of X_1 and X_2 are $SN(\bar{\alpha}_1)$ and $SN(\bar{\alpha}_2)$ (Azzallini and Capitanio, 1999), respectively, where the parameters of shape are:

$$\bar{\alpha}_1 = \frac{\alpha_1 + \omega\alpha_2}{\sqrt{1 + (1 - \omega^2)\alpha_2^2}} \tag{4}$$

$$\bar{\alpha}_2 = \frac{\alpha_2 + \omega\alpha_1}{\sqrt{1 + (1 - \omega^2)\alpha_1^2}} \tag{5}$$

Coefficiente de correlación en la distribución Normal Asimétrica bivariada

Sea $\underline{X} = (X_1, X_2)'$ con distribución $SN_2(\underline{\Omega}, \underline{\alpha})$. El coeficiente de correlación entre X_1 y X_2 (Azzallini y Dalla-Valle, 1996) es:

$$\rho_{x_1, x_2} = \frac{\omega - \frac{2}{\pi} \delta_1 \delta_2}{\sqrt{\left(1 - \frac{2}{\pi} \delta_1^2\right) \left(1 - \frac{2}{\pi} \delta_2^2\right)}}$$

donde $\underline{\delta} = (\delta_1, \delta_2) = \frac{\underline{\Omega} \underline{\alpha}}{\sqrt{1 + \underline{\alpha}' \underline{\Omega} \underline{\alpha}}}$

Propuesta para calcular la correlación tetracórica con base en la distribución Normal Asimétrica

Si se considera que el vector aleatorio $\underline{X} = (X_1, X_2)'$ tiene distribución Normal Asimétrica bivariada $SN_2(\underline{\Omega}_{SN}, \underline{\alpha})$, donde $\underline{\Omega}_{SN} = \begin{pmatrix} 1 & \omega_{SN} \\ \omega_{SN} & 1 \end{pmatrix}$; entonces, el coeficiente ω_{SN} satisface que:

$$\frac{a}{n} = \int_{-\infty}^{z_1} \int_{-\infty}^{z_2} f_{\underline{x}}(x_1, x_2, \omega_{SN}) dx_1 dx_2 \tag{6}$$

donde $f_{\underline{x}}(\cdot)$ es la función de densidad de la distribución $SN_2(\underline{\Omega}_{SN}, \underline{\alpha})$ definida en (3).

De acuerdo con (4) y (5), los cuantiles z_1 y z_2 se obtienen como:

$$z_1 = \Phi_{\alpha_1}^{-1} \left(\frac{a+b}{n} \right) \tag{7}$$

$$z_2 = \Phi_{\alpha_2}^{-1} \left(\frac{a+c}{n} \right) \tag{8}$$

La correlación tetracórica con base en la Normal Asimétrica, denotada como ρ_{1SN} , está dada por:

$$\rho_{\tau_{SN}} = \frac{\omega_{SN} - \frac{2}{\pi} \delta_1 \delta_2}{\sqrt{\left(1 - \frac{2}{\pi} \delta_1^2\right) \left(1 - \frac{2}{\pi} \delta_2^2\right)}} \tag{9}$$

Correlation coefficient in Bivariate Skew Normal Distribution

Let $\underline{X} = (X_1, X_2)'$ be with distribution $SN_2(\underline{\Omega}, \underline{\alpha})$; then, the correlation coefficient between X_1 and X_2 (Azzallini and Dalla-Valle, 1996) is:

$$\rho_{x_1, x_2} = \frac{\omega - \frac{2}{\pi} \delta_1 \delta_2}{\sqrt{\left(1 - \frac{2}{\pi} \delta_1^2\right) \left(1 - \frac{2}{\pi} \delta_2^2\right)}}$$

donde $\underline{\delta} = (\delta_1, \delta_2) = \frac{\underline{\Omega} \underline{\alpha}}{\sqrt{1 + \underline{\alpha}' \underline{\Omega} \underline{\alpha}}}$

Proposal to calculate tetrachoric correlation based on Skew Normal Distribution

If the random vector $\underline{X} = (X_1, X_2)'$ is considered to have a bivariate skew normal distribution $SN_2(\underline{\Omega}_{SN}, \underline{\alpha})$ where $\underline{\Omega}_{SN} = \begin{pmatrix} 1 & \omega_{SN} \\ \omega_{SN} & 1 \end{pmatrix}$, then the coefficient ω_{SN} satisfies:

$$\frac{a}{n} = \int_{-\infty}^{z_1} \int_{-\infty}^{z_2} f_{\underline{x}}(x_1, x_2, \omega_{SN}) dx_1 dx_2 \tag{6}$$

where $f_{\underline{x}}(\cdot)$ is the density function of distribution $SN_2(\underline{\Omega}_{SN}, \underline{\alpha})$ defined in (3).

According to (4) and (5), quantiles z_1 and z_2 are obtained as:

$$z_1 = \Phi_{\alpha_1}^{-1} \left(\frac{a+b}{n} \right) \tag{7}$$

$$z_2 = \Phi_{\alpha_2}^{-1} \left(\frac{a+c}{n} \right) \tag{8}$$

The tetrachoric correlation based on skewed normal, denoted as ρ_{1SN} , is given by:

$$\rho_{\tau_{SN}} = \frac{\omega_{SN} - \frac{2}{\pi} \delta_1 \delta_2}{\sqrt{\left(1 - \frac{2}{\pi} \delta_1^2\right) \left(1 - \frac{2}{\pi} \delta_2^2\right)}} \tag{9}$$

Procedimiento para la estimación Monte Carlo del coeficiente de correlación tetracórica con base en la distribución Normal Asimétrica

Debido a que no es posible evaluar analíticamente la doble integral en (6) para despejar a ω_{SN} y luego obtener a ρ_{tSN} en (9), el problema de estimación de dichos parámetros se aborda a través de simulación Monte Carlo.

Ya que la proporción $\frac{a}{n}$ representa el área de la distribución Normal Asimétrica bivariada determinada por los cuantiles z_1 y z_2 , la ecuación (6) puede expresarse como la probabilidad conjunta de dos eventos; es decir:

$$P(X_1 \leq z_1, X_2 \leq z_2) = \int_{-\infty}^{z_1} \int_{-\infty}^{z_2} f_{\underline{x}}(x_1, x_2, \omega_{SN}) dx_1 dx_2 = \frac{a}{n}$$

El procedimiento de estimación consiste en los siguientes pasos:

1. Definir una partición de tamaño k del intervalo $[-1, 1]$, al cual pertenece $\omega_{SN, i}$
2. Para cada valor de $\omega_{SN, i}$ elemento de la partición, se realiza el siguiente procedimiento:
 - 2.1. Simular una muestra pseudo aleatoria de tamaño n de la distribución $SN_2(\Omega_{SN, i}, \underline{\alpha}_0)$, donde $\underline{\alpha}_0 = (\alpha_{0,1}, \alpha_{0,2})'$.
 - 2.2. Contar la proporción de parejas (x_1, x_2) de la muestra simulada que cumplan simultáneamente que $x_1 \leq z_1$ y $x_2 \leq z_2$. Los cuantiles z_1 y z_2 se determinan a partir de las expresiones (7) y (8) que son función de las proporciones marginales observadas.
 - 2.3. Para no depender de los resultados de una muestra, los pasos 2.1 y 2.2 se repiten l veces. En cada una de las l muestras asimétricas bivariadas se obtiene la proporción $\frac{m_{ij}}{n}$, $j=1, 2, \dots, l$, de parejas en la muestra que cumplen con la condición establecida en el paso 2.2.
 - 2.4. La proporción asociada a $\omega_{SN, i}$ es $\left(\frac{m_i}{n}\right) = \frac{\sum_{j=1}^l \frac{m_{ij}}{n}}{l}$, $i=1, 2, \dots, k$.
3. La proporción observada $\frac{a}{n}$ se compara con cada una de las proporciones $\frac{m_{ij}}{n}$ obtenidas en 2.4, de modo que el valor $\omega_{SN, i}$ asociado con la diferencia mínima corresponde a la estimación de ω_{SN} denotado como $\tilde{\omega}_{SN}$, el cual permite obtener la estimación de ρ_{tSN} , es decir, $\tilde{\rho}_{tSN}$, de acuerdo con (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la consistencia de $\tilde{\rho}_{tSN}$ se realizó por medio de un estudio de simulación Monte Carlo con 1000 repeticiones con el paquete *sn* (Azzallini, 2018) del programa R Core Team (2019). A partir de muestras

Monte Carlo estimation procedure for tetrachoric correlation coefficient based on Skew Normal Distribution

Due to the impossibility of analytically analyzing the double integral in (6) to find ω_{SN} and then obtain ρ_{tSN} in (9), the problem of estimating these parameters is tackled using a Monte Carlo simulation.

Since the proportion $\frac{a}{n}$ represents the area of the bivariate skew normal distribution determined by quantiles z_1 and z_2 , equation (6) can be expressed as the joint probability of two events, *i.e.* as follows:

$$P(X_1 \leq z_1, X_2 \leq z_2) = \int_{-\infty}^{z_1} \int_{-\infty}^{z_2} f_{\underline{x}}(x_1, x_2, \omega_{SN}) dx_1 dx_2 = \frac{a}{n}$$

The estimation procedure consists of the following steps:

1. Defining a k -sized partition of interval $[-1, 1]$, to which $\omega_{SN, i}$ belongs.
2. For each value of $\omega_{SN, i}$ element of the partition, the following procedure is applied:
 - 2.1. Simulating a pseudo-random n -sized sample of the $SN_2(\Omega_{SN, i}, \underline{\alpha}_0)$ distribution, where $\underline{\alpha}_0 = (\alpha_{0,1}, \alpha_{0,2})'$.
 - 2.2. Counting the proportion of vectors (x_1, x_2) in the simulated sample that simultaneously satisfy that $x_1 \leq z_1$ and $x_2 \leq z_2$. Quantiles z_1 and z_2 are determined from the expressions (7) and (8), which are functions of the observed marginal proportions.
 - 2.3. In order to avoid dependency on the results of a sample, steps 2.1 and 2.2 are repeated l times. Each of the l bivariate skew samples gives the proportion $\frac{m_{ij}}{n}$, $j=1, 2, \dots, l$, of vector pairs in the sample that comply with the condition established in step 2.2.
 - 2.4. The proportion associated to $\omega_{SN, i}$ is $\left(\frac{m_i}{n}\right) = \frac{\sum_{j=1}^l \frac{m_{ij}}{n}}{l}$, $i=1, 2, \dots, k$.
3. The $\frac{a}{n}$ observed proportion is compared with each proportion $\frac{m_{ij}}{n}$ obtained in 2.4, so that value $\omega_{SN, i}$ related to the minimum difference, corresponds to the estimation of ω_{SN} denoted as $\tilde{\omega}_{SN}$, which helps obtain the estimation of ρ_{tSN} that is, $\tilde{\rho}_{tSN}$, according to (9).

RESULTS AND DISCUSSION

A consistency analysis of $\tilde{\rho}_{tSN}$ was performed using a Monte Carlo simulation study with 1000 iterations using the *sn* package (Azzallini, 2018) of the R Core Team (2019) program. From pseudo-random n -sized samples with $SN_2(\Omega_{SN}, \underline{\alpha})$ distribution,

pseudo aleatorias de tamaño n de la distribución $SN_2(\Omega_{SN}, \underline{\alpha})$, donde $\omega_{SN} = 0.9$, $\alpha_1 = \alpha_2 = 0.8$ y $\rho_{\tau_{SN}} = 0.825$, se construyeron variables dicotómicas con base en los cuantiles asociados con proporciones marginales fijas $\left(\frac{a+b}{n}\right)_0 = 0.7064$ y $\left(\frac{a+c}{n}\right)_0 = 0.8550$. La tabla de proporciones de las variables dicotómicas construidas proporcionó el insumo necesario para la aplicación del método de estimación de $\rho_{\tau_{SN}}$, donde $k=150$, $l=30$, y $n \in \{30, 100, 500, 1000, 5000, 10\ 000\}$.

El estudio de simulación Monte Carlo mostró que $\tilde{\rho}_{\tau_{SN}}$ es un estimador robusto al nivel de asimetría y consistente en Error Cuadrático Medio (ECM). Los resultados señalaron una reducción importante de la varianza, y en consecuencia del ECM, a partir de las muestras de tamaño $n=100$. Además, la estimación fue más cercana al valor de referencia $\rho_{\tau_{SN}} = 0.825$ conforme aumentó el tamaño de muestra, lo cual fue evidencia de la consistencia del estimador propuesto (Cuadro 1).

La distribución de las simulaciones mostró que las estimaciones se concentran alrededor del valor de referencia $\rho_{\tau_{SN}}$ (representado por la línea vertical) a medida que el tamaño de muestra aumenta (Figura 2).

El método propuesto permitió la identificación de la relación inversa entre nivel de asimetría y la magnitud de la correlación $\tilde{\rho}_{\tau_{SN}}$ (Cuadro 2).

Los resultados mostraron que, ante la presencia de asimetría, la correlación tiende a ser menor a la obtenida en el caso $\alpha_0 = 0$. Sin embargo, el grado de asociación no se vio afectado, pues en todos los escenarios definidos se observó una correlación

where $\omega_{SN} = 0.9$, $\alpha_1 = \alpha_2 = 0.8$ and $\rho_{\tau_{SN}} = 0.825$, dichotomous variables were constructed, based on the quantiles associated with fixed marginal proportions $\left(\frac{a+b}{n}\right)_0 = 0.7064$ and $\left(\frac{a+c}{n}\right)_0 = 0.8550$. The proportions table of the constructed dichotomous variables provided the required input for the application of the estimation method of $\rho_{\tau_{SN}}$, where $k=150$, $l=30$, and $n \in \{30, 100, 500, 1000, 5000, 10\ 000\}$.

Monte Carlo simulation study showed that $\tilde{\rho}_{\tau_{SN}}$ is a robust estimator at the skewness level and it is a mean-squared-error consistent estimator (ECM). The results indicated a significant reduction in variance, and consequently, on its ECM, from samples of size $n=100$. In addition, the estimation came closer to the reference value $\rho_{\tau_{SN}} = 0.825$ as the sample size increased, which was evidence of the consistency of the proposed estimator (Table 1).

The distribution of simulations showed that estimations are concentrated around the reference value $\rho_{\tau_{SN}}$ (represented by the vertical line) as the sample size increases (Figure 2).

The proposed method helped identifying the inverse relationship between level of skewness and magnitude of correlation $\tilde{\rho}_{\tau_{SN}}$ (Table 2).

Results showed that, given the presence of skewness, the correlation tends to be lower than the one obtained when $\alpha_0 = 0$. However, the degree of association was not affected, since in all the defined scenarios, a high positive correlation was observed, along with a marginal decrease in correlation from $\alpha_0 = 2.7$.

Cuadro 1. Estimación del coeficiente $\rho_{\tau_{SN}}$, según tamaño de muestra. Simulación Monte Carlo con 1000 repeticiones.
Table 1. Estimation of coefficient $\rho_{\tau_{SN}}$, according to sample size. Monte Carlo simulation with 1000 iterations.

Tamaño de muestra (n)	$\tilde{\rho}_{\tau_{SN}}$				
	Media	Mediana	Sesgo	ECM	Varianza
30	0.6791	0.7690	-0.14586	0.13790	0.11675
100	0.8178	0.8349	-0.00721	0.01481	0.01478
500	0.8271	0.8349	0.00211	0.00302	0.00302
1 000	0.8240	0.8349	-0.00103	0.00149	0.00149
5 000	0.8250	0.8349	0.00003	0.00030	0.00030
10 000	0.8245	0.8349	-0.00050	0.00017	0.00017

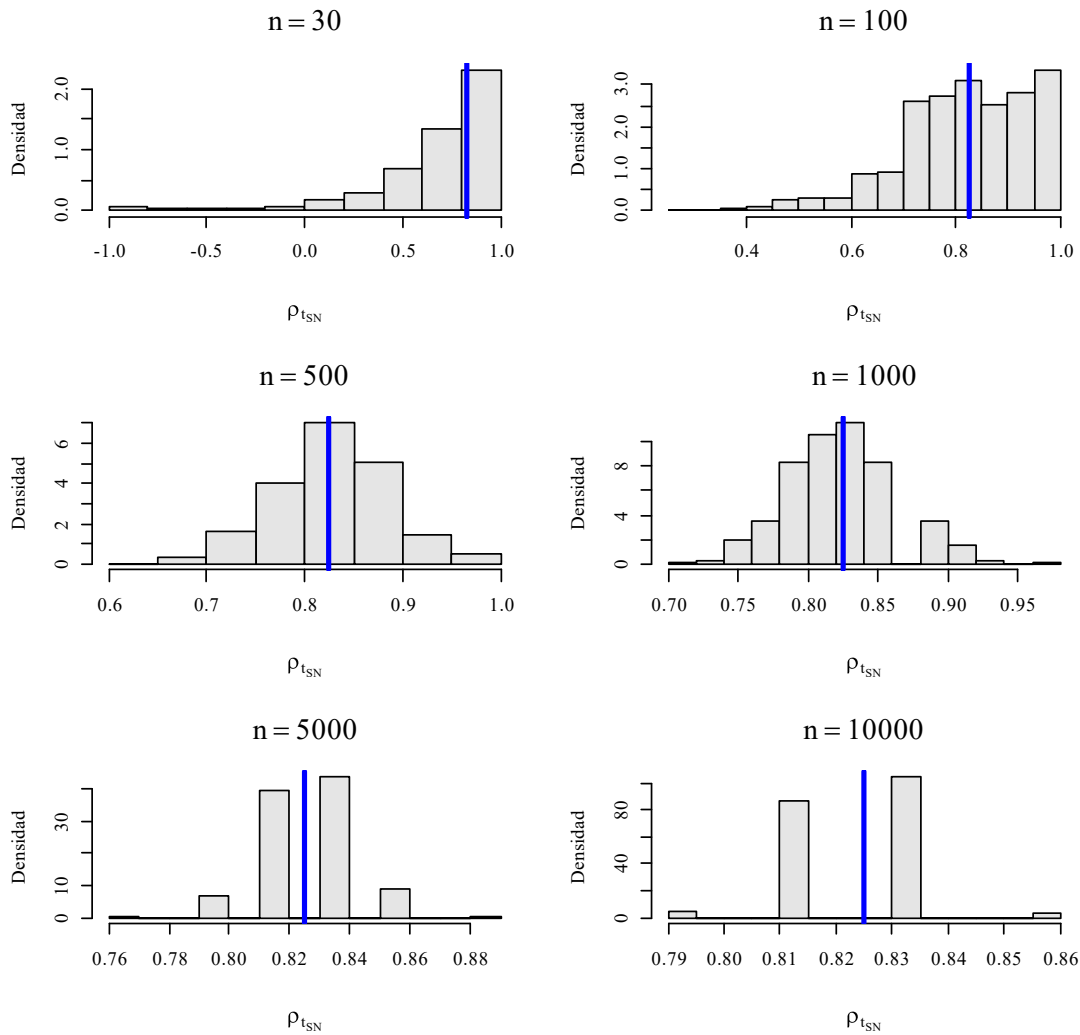


Figura 2. Distribución de $\tilde{\rho}_{tSN}$, según tamaño de muestra.
Figure 2. Distribution of $\tilde{\rho}_{tSN}$, according to sample size.

Cuadro 2. Estimación del coeficiente ρ_{tSN} , según parámetro de forma. Primeros dos reactivos HSM, EMSA 2014.

Table 2. Estimation of coefficient ρ_{tSN} , according to parameter of shape. First two items HSM, EMSA 2014.

α_0	$\frac{a}{n}$	$\frac{m}{n}$	$\left \frac{m}{n} - \frac{a}{n} \right $	$\tilde{\omega}_{SN}$	$\tilde{\rho}_{tSN}$
0.0	0.6947	0.6946	0.0001	0.8657	0.8657
0.8	0.6947	0.6942	0.0005	0.9194	0.8575
1.5	0.6947	0.6936	0.0011	0.9194	0.8218
2.7	0.6947	0.6938	0.0008	0.9194	0.8034
3.4	0.6947	0.6939	0.0007	0.9194	0.7997
4.2	0.6947	0.6939	0.0007	0.9194	0.7974
5.0	0.6947	0.694	0.0007	0.9194	0.7961
6.0	0.6947	0.694	0.0007	0.9194	0.7951
7.0	0.6947	0.6941	0.0005	0.9194	0.7945

positiva alta y una disminución marginal en la correlación a partir de $\alpha_0 = 2.7$.

Validación de la EMSA por medio del Análisis de Factores Confirmatorio

El contraste de las estructuras por cada tipo de hogar se realizó con la información de la EMSA 2014. La muestra consta de un total de 58 125 hogares a nivel nacional, de los cuales 22 486 son hogares sin menores (HSM) y 35 639 son hogares con menores (HCM). Las Figuras 3 y 4 muestran las estructuras hipotéticas utilizadas en el AFC correspondientes a cada tipo de hogar.

Para estimar los modelos se contemplaron las matrices de correlación obtenidas bajo tres niveles de asimetría: $\alpha_0 = 0$, $\alpha_0 = 0.8$ y $\alpha_0 = 2.7$. Dichas matrices se construyeron a partir del método propuesto para la estimación de ρ_{iSN} . Los resultados señalaron que existe una correlación positiva alta entre los reactivos de la escala, lo cual refleja el grado de coherencia entre ellos como variables manifiestas del concepto teórico de la seguridad alimentaria en los hogares.

Las medidas de bondad de ajuste para los HSM (Cuadro 3) mostraron un buen ajuste, con excepción del RMSEA. En todos los casos, los residuales estandarizados indicaron discrepancia mínima entre la matriz de correlaciones observada y la matriz de correlaciones reproducida por el modelo. Por lo tanto, los reactivos de la EMSA cuantificaron en forma adecuada el concepto teórico de la seguridad alimentaria

Validation of EMSA using Confirmatory Factor Analysis

The contrast of the structures for each type of household was carried out with the information from EMSA 2014. The sample consists of a total of 58 125 households nationwide, 22 486 of which are households without children (HSM) and 35 639 are households with children (HCM). Figures 3 and 4 show hypothetical structures used in CFA corresponding to each type of household.

To estimate the models, the correlation matrices obtained under three levels of skewness were considered: $\alpha_0 = 0$, $\alpha_0 = 0.8$ and $\alpha_0 = 2.7$. These matrices were created using the proposed method for the estimation of ρ_{iSN} . Results indicated that there is a high positive correlation between items of the scale, which reflects the degree of coherence between them as manifest variables of the theoretical concept of food security in households.

The goodness-of-fit indices for HSM (Table 3) showed a good fit, with the exception of RMSEA. In all cases, the standardized residuals indicated a minimum discrepancy between the observed correlation matrix and the correlation matrix reproduced by the model. Therefore, EMSA items adequately quantified the theoretical concept of food security in HSM, and they support the relationship between theoretical structure and empirical evidence.

The CFA model for HCM with the original structure proposed (Figure 4) did not show an

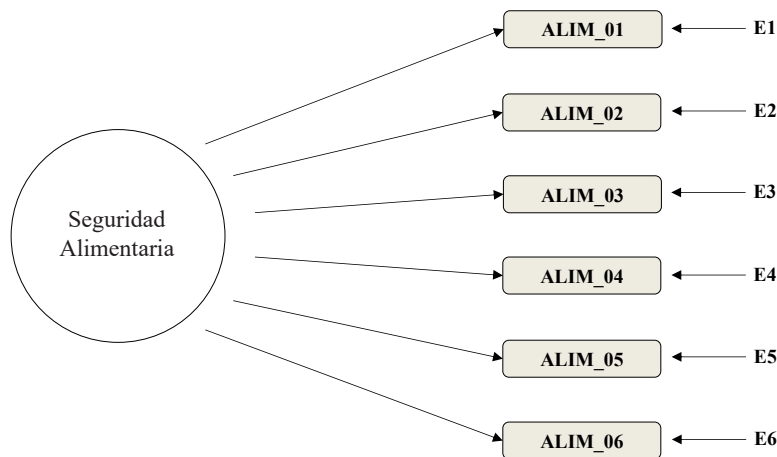


Figura 3. Modelo factorial para la seguridad alimentaria en HSM.
Figure 3. Factorial model for food security in HSM.

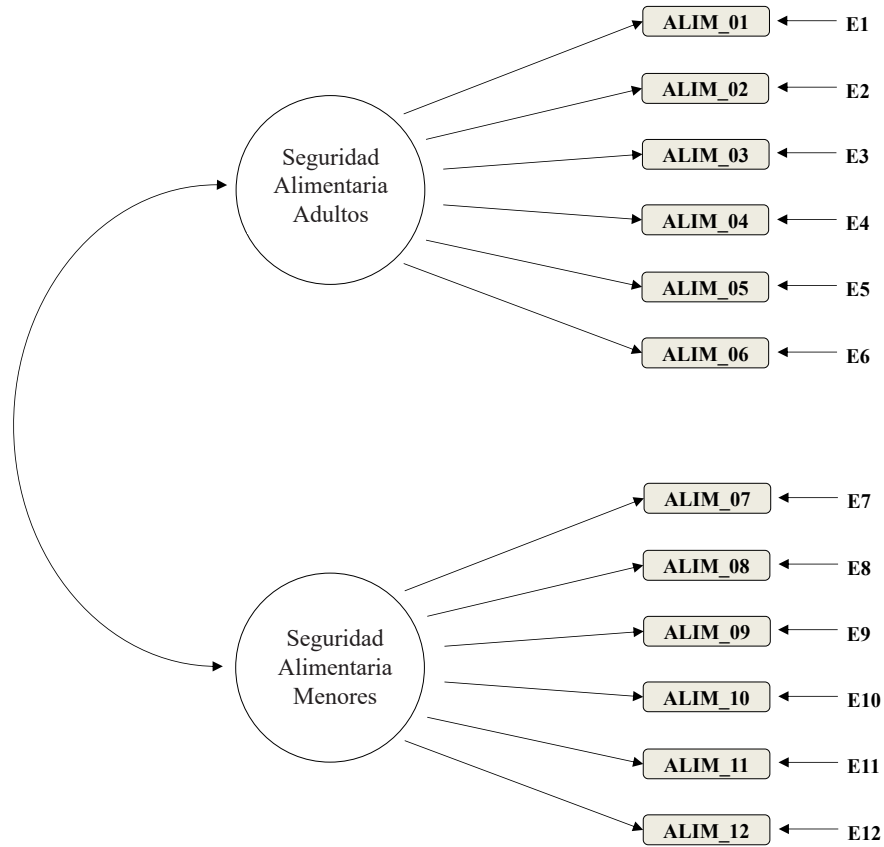


Figura 4. Modelo factorial para la seguridad alimentaria en HCM
Figure 4. Factorial model for food security in HCM

en los HSM y respaldan la correspondencia entre la estructura teórica y la evidencia empírica.

El modelo de AFC para HCM con la estructura original planteada (Figura 4) no mostró un ajuste adecuado para ninguno de los niveles de asimetría considerados. Sin embargo, al incorporar en el modelo tres relaciones adicionales entre los errores de medición (*E*) de las variables *ALIM_01*, *ALIM_06*,

adequate fit for any of the levels of skewness considered. However, by incorporating into the model three additional relations between the measurement errors (*E*) of the variables *ALIM_01*, *ALIM_06*, *ALIM_07*, *ALIM_10*, *ALIM_11* and *ALIM_12* (Figure 5), the global fit indices improved substantially. These additional relationships were obtained from the modification indices, which

Cuadro 3. Medidas de bondad de ajuste para los modelos de HSM, 2014.
Table 3. Goodness-of-fit indices for HSM models, 2014.

Medida	Nivel de asimetría			Criterio de aceptación
	$\alpha_0 = 0$	$\alpha_0 = 0.8$	$\alpha_0 = 2.7$	
CFI	0.964	0.958	0.953	Mayor a 0.90
RMSEA	0.190	0.196	0.190	Menor a 0.08
SRMR	0.015	0.019	0.024	Menor a 0.08
STD_RES (valor máximo)	0.038	0.061	0.072	Menor a 0.10

ALIM_07, *ALIM_10*, *ALIM_11* y *ALIM_12* (Figura 5), las medidas de ajuste global mejoraron sustancialmente. Dichas relaciones adicionales se obtuvieron a partir de los índices de modificación, los cuales estiman la variación que puede producirse en el modelo al introducir una nueva relación entre variables que no se haya considerado y contribuye con la mejora del ajuste del modelo.

La relación entre los errores de medición *E1* y *E7* indicó que la presencia de una situación adversa que provoca cambios en la variedad de los alimentos tiene repercusiones a nivel hogar, de modo que las afectaciones son tanto para los adultos como para los menores de 18 años. Una situación similar ocurre cuando la severidad de la inseguridad alimentaria se incrementa al nivel de eliminar algún tiempo de comida para todos los integrantes del hogar, lo cual se señala por la relación entre *E6* y *E12*. Estas relaciones son reflejo del marco conceptual en el que se basa la EMSA, de modo que cada una de las dimensiones

estimate the variation that can occur in the model by introducing a new relationship between variables that had not been considered, and contributes to the improvement of the fit of the model.

The relationship between measurement errors *E1* and *E7* indicated that the presence of an adverse situation that causes changes in the variety of food has repercussion at the household level, so the impacts are both for adults and underage individuals. A similar situation occurs when the severity of food insecurity increases until it deprives everyone in the household from some meal, which is pointed out by the relationship between *E6* and *E12*. These relationships reflect the conceptual framework upon which EMSA is based, so each one of the underlying dimensions in the measurement of household food security affects children after adults (FAO, 2012). Finally, the relationship between *E10* and *E11* suggests a confusion in the comprehension of items related to hunger experiences.

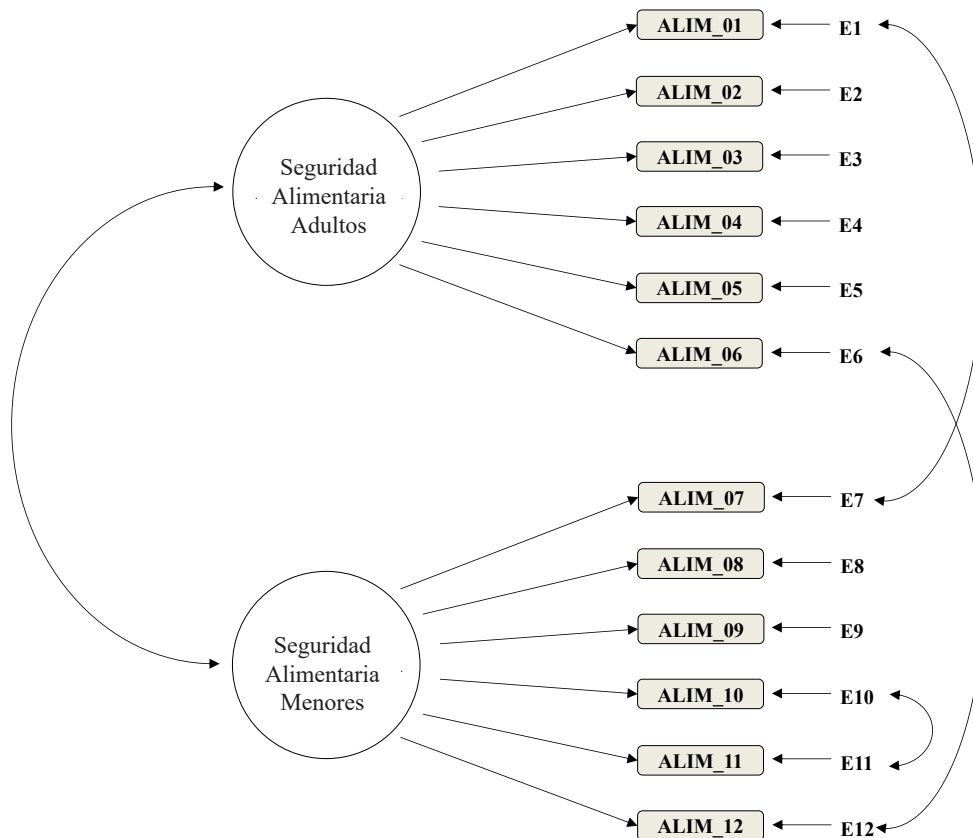


Figura 5. Modelo factorial para la seguridad alimentaria en HCM, de acuerdo con los índices de modificación.
Figure 5. Factorial model for food security in HCM, according to modification indices.

subyacentes a la medición de la seguridad alimentaria en los hogares afecta a los menores después de que ha afectado a los adultos (FAO, 2012). Por último, la relación entre *E10* y *E11* sugiere confusión en el entendimiento de los reactivos asociados con experiencias de hambre.

La incorporación de las relaciones entre los errores de medición (Figura 5) contribuyó con un mejor ajuste (Cuadro 4).

CONCLUSIONES

El método de estimación de ρ_{tSN} permitió analizar el comportamiento de la correlación entre variables dicotómicas por medio de variables latentes en presencia de diferentes niveles de asimetría. El estimador Monte Carlo $\tilde{\rho}_{tSN}$ presentó un comportamiento consistente y de poca varianza.

De acuerdo con los resultados de los modelos del Análisis de Factores Confirmatorio, los reactivos de la EMSA explicaron en forma adecuada el concepto teórico de la seguridad alimentaria para los hogares sin menores. En los hogares con menores, los resultados indicaron colinealidad entre los errores de medición de las variables que corresponden a la variedad de los alimentos, la eliminación de algún tiempo de comida y las experiencias de hambre.

En tal caso se sugiere revisar los reactivos correspondientes a *ALIM_10* y *ALIM_11* pues existe confusión en su redacción. La nueva estructura teórica se confirmó y fue robusta en presencia de niveles de asimetría diferentes. Estos hallazgos solo fueron visibles al considerar las matrices de correlación obtenidas por medio del estimador $\tilde{\rho}_{tSN}$ propuesto.

The incorporation of relationships between measurement errors (Figure 5) contributed to a better fit (Table 4).

CONCLUSIONS

The estimation method of ρ_{tSN} helped analyzing the behavior of correlation between dichotomous variables by latent variables in the presence of different levels of skewness. The Monte Carlo estimator $\tilde{\rho}_{tSN}$ showed a consistent and low variance behavior.

According to the results of Confirmatory Factor Analysis models, EMSA items adequately explained the theoretical concept of food security for households without children. In households with children, the results indicated collinearity between measurement errors of the variables regarding variety of food, the elimination of some meal and hunger experiences.

In such a case, a revision is suggested of items *ALIM_10* and *ALIM_11*, because there was confusion in their wording. The new theoretical structure was confirmed and it was robust in presence of different levels of skewness. These findings were only visible when considering correlation matrices obtained using the proposed estimator $\tilde{\rho}_{tSN}$.

—End of the English version—

-----*-----

Cuadro 4. Medidas de bondad de ajuste para los modelos de HCM, 2014.
Table 4. Goodness-of-fit indices for HCM models, 2014.

Medida	Nivel de asimetría			Criterio de aceptación
	$\alpha_0 = 0$	$\alpha_0 = 0.8$	$\alpha_0 = 2.7$	
CFI	0.811	0.914	0.895	Mayor a 0.90
RMSEA	0.305	0.183	0.188	Menor a 0.08
SRMR	0.032	0.031	0.043	Menor a 0.08
STD_RES (valor máximo)	0.091	0.083	0.155	Menor a 0.10

LITERATURA CITADA

- Acock, A. 2013. *Discovering Structural Equation Modeling using Stata*. Stata Press. Texas. 306 p.
- Azzallini, A. 1985. A class of distributions which includes the normal ones. *Scandinavian Journal of Statistics*. 12: 171 - 178.
- Azzallini, A., and A. Dalla-Valle. 1996. The multivariate skew-normal distribution. *Biometrika*. 83: 715 - 726.
- Azzallini, A., and A. Capitanio. 1999. Statistical applications of the multivariate skew normal distribution. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*. 61: 579 - 602.
- Azzallini, A., and A. Capitanio. 2014. *The skew-normal and related families*. Institute of Mathematical Statistics Monographs. Cambridge University Press. 262 p.
- Azzallini, A. 2018. The R package sn: the skew-normal and related distributions such as the skew-t (version 1.5-3). *Università di Padova*. Italia. 79 p.
- Byrne, B. 2016. *Structural equation modeling with AMOS: basic concepts, applications and programming*. 3a. ed. Taylor and Francis Group. New York. 438 p.
- CONEVAL (Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social). 2010. *Metodología para la medición multidimensional de la pobreza en México*. México. 128 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2012. *Escala Latinoamericana y Caribeña de Seguridad Alimentaria (ELCSA): manual de uso y aplicaciones*. Roma. 85 p.
- Kline, R. 2011. *Principles and practice of structural equation modeling*. 3a. ed. The Guilford Press. New York. 427 p.
- Pearson, K. 1900. *Mathematical contributions to the theory of evolution*. VII. On the correlation of characters not quantitatively measurable. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 195: 1 - 47.
- Pérez-Gil, J., S. Chacón, y R. Moreno. 2000. Validez de constructo: el uso de análisis factorial exploratorio - confirmatorio para obtener evidencias de validez. *Psicothema*. 12: 442 - 446.
- Suárez, A. 2015. La estadística en la validación de escalas, una visión práctica para su construcción o su adaptación. *Revista I3+*. 2: 46 - 61.
- Villagómez, P., P. Hernández, B. Carrasco, K. Barrios, R. Pérez, y H. Melgar. 2014. Validez estadística de la Escala Mexicana de Seguridad Alimentaria y la Escala Latinoamericana y Caribeña de Seguridad Alimentaria. *Salud Pública de México*. 56: S5 - S11.

MARCAJE DE LARVAS DE *Ceraeochrysa valida* (Banks) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) CON COLORANTES LIPOSOLUBLES INCORPORADOS A LA DIETA

MARKING *Ceraeochrysa valida* (Banks) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) LARVAE WITH LIPOSOLUBLE COLORS INCORPORATED IN THE DIET

Elba López-Duran¹, Juan A. Villanueva-Jiménez^{1*}, Mónica de la Cruz Vargas-Mendoza¹, Martín Palomares-Pérez²

¹ Campus Veracruz. Colegio de Postgraduados. 91690. Manlio Fabio Altamirano, Veracruz. (lopez.elba@colpos.mx), (javj@colpos.mx), (mvargas@colpos.mx), ²Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, SENASICA-DGSV, km 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC, Colonia Tepeyac, Colima. 28110. México. (mpalomares@colpos.mx).

RESUMEN

Las técnicas de marcaje de insectos en estudios poblacionales se utilizan para seguir el desarrollo de los organismos. Por ello, los colorantes no deben afectar su biología, comportamiento o camuflaje, tal como los utilizados en coleópteros, lepidópteros, dípteros, isópteros e himenópteros. El objetivo del estudio fue evaluar la efectividad de dos colorantes liposolubles en el marcaje del neuróptero *Ceraeochrysa valida* (Banks) y su efecto en el desarrollo y supervivencia de larvas y pupas; bajo la hipótesis de que al menos uno de los colorantes marcaría bien al insecto sin afectar a los organismos para su evaluación. Los colorantes Sudan Red 7B (rojo) y Sudan Blue 670 (azul) se evaluaron mezclados en la dieta de las larvas, más un testigo sin colorante; se usaron 40 larvas recién eclosionadas por tratamiento. El número de insectos marcados y la duración de los periodos larvario y pupal se evaluaron, y esta información se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon. El porcentaje de supervivencia durante los periodos larval, de larva a pupa y de pupa a adulto se analizó con la prueba de Chi-cuadrada. Todas las larvas se marcaron adecuadamente con Sudan Blue 670 y el 98% lo hizo con Sudan Red 7B. La duración de los periodos larvario y pupal presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.0001$). Las larvas mostraron un desarrollo larval más prolongado cuando se alimentaron con el colorante rojo (mediana de 16 d) o azul (15.5 d), respecto al testigo (14 d; $p \leq 0.0004$). Sin embargo, el periodo pupal fue mayor con el colorante rojo (13 d) que con el colorante azul (11 d; $p = 0.0003$) o el testigo (11 d; $p \leq 0.0001$), sin diferencias entre estos dos últimos ($p = 0.42$). Los porcentajes de supervivencia de larvas, larvas a pupa, emergencia de adulto

ABSTRACT

Techniques for marking insects in population studies are used to follow the development of the organisms. For this purpose, dyes must not affect their biology, behavior, or camouflage; such as those utilized in coleopterans, lepidopterans, dipterans, isopterans and hymenopterans. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of two liposoluble dyes in marking the neuropteran *Ceraeochrysa valida* (Banks), and the effect of dyes on the development and survival of larvae and pupae; under the hypothesis that at least one of the two dyes would adequately mark the insects without affecting them for evaluation. The dyes Sudan Red 7B (red) and Sudan Blue 670 (blue) were evaluated mixed in the diet for larvae, plus a not dyed control; 40 recently hatched larvae were used per treatment. The number of marked insects and the duration of the larval and pupal periods were evaluated. This information was analyzed with the Kruskal-Wallis test and the Wilcoxon rank sum test. The percentage of survival as larva, from larva to pupa, and from pupa to adult periods was analyzed with the Chi-square test. All of the larvae were adequately marked with Sudan Blue 670 and 98% with Sudan Red 7B. The duration of the larval and pupal periods presented significant differences ($p \leq 0.0001$). Larvae showed a longer period of larval development when they were fed with the red dye (median of 16 d) or blue dye (15.5 d), compared to the control (14 d; $p \leq 0.0004$). However, the pupal period was longer with the red dye (13 d) than with the blue dye (11 d; $p = 0.0003$) or the control (11 d; $p \leq 0.0001$), with no differences between the latter two ($p = 0.42$). The percentages of survival of larvae, larva to pupa, emergence of adults, or larva to emergence of adult did not show significant differences among treatments ($p > 0.63$). Therefore, Sudan Blue 670 was the dye chosen for the evaluations of *C. valida* in the field; which gave an unequivocal color to the larvae.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2020. Aprobado: septiembre, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 55: 73-80. 2021.

o de larva a emergencia adulto no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.63$). Por tanto, Sudan Blue 670 fue el colorante de elección para las evaluaciones de *C. valida* en campo, además de aportar a la larva un color inconfundible.

Palabras clave: crisopa, *Ceraeochrysa valida*, desarrollo larval, liberación-recaptura, Sudan Blue, Sudan Red.

INTRODUCCIÓN

Dentro del orden Neuroptera, la familia Chrysopidae resalta por la capacidad de depredación de sus larvas sobre insectos de cuerpo blando (Giffoni *et al.*, 2007), los cuales incluyen plagas de importancia económica (Dhandapani *et al.*, 2016; Rodríguez-Palomera *et al.*, 2012). *Ceraeochrysa valida* (Banks) tiene una capacidad alta de depredación en laboratorio sobre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Pacheco-Rueda *et al.*, 2015; Palomares-Pérez *et al.*, 2016), una de las plagas más dañinas de los cítricos por ser vector del Huanglongbing (HLB), enfermedad con gran potencial destructivo (Mora-Aguilera *et al.*, 2016).

Las larvas de *C. valida* presentan mandíbulas prognatas que sobresalen en la parte anterior del cuerpo, con las que atrapa y succiona el contenido de sus presas (Tauber *et al.*, 2000). Sus cuerpos campodeiformes presentan un exoesqueleto semitransparente que se oscurece sólo en algunas áreas quitinosas, lo cual permite ver el hemocele que presenta áreas blanquecinas formadas por lípidos (Monserrat, 2016). El tubo digestivo de las larvas no está conectado con el ano; por ello, los desechos alimenticios se acumulan en su desarrollo y sólo se excretan durante la metamorfosis (Ribera y Melic, 2015).

Pacheco-Rueda *et al.* (2015) y Jose-Pablo *et al.* (2017) estudiaron el ciclo biológico y la capacidad depredadora de *C. valida* en confinamiento, sin información sobre su movimiento y permanencia en campo tras su liberación (Palomares-Pérez *et al.*, 2016). Las investigaciones de la dinámica de insectos en campo se realizan principalmente con la técnica de marcado-liberación-recaptura, que permite evaluar su dispersión, comportamiento alimenticio y otras interacciones (Badii *et al.*, 2012). Para ello, se requiere un método de marcaje confiable y duradero, que no afecte la biología y comportamiento del insecto, ni cause toxicidad a otros organismos en el ambiente (Arredondo *et al.*, 2017).

Key words: green lacewing, *Ceraeochrysa valida*, larval development, release-recapture, Sudan Blue, Sudan Red.

INTRODUCTION

Within the order Neuroptera, the family Chrysopidae stands out for the predatory capacity of larvae on soft-bodied insects (Giffoni *et al.*, 2007), including economically important pests (Dhandapani *et al.*, 2016; Rodríguez-Palomera *et al.*, 2012). *Ceraeochrysa valida* (Banks) has a high predatory capacity in the laboratory on *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Pacheco-Rueda *et al.*, 2015; Palomares-Pérez *et al.*, 2016), one of the most damaging pests of citrus for being the vector of the Huanglongbing disease (HLB), which has highly destructive potential (Mora-Aguilera *et al.*, 2016).

The larvae of *C. valida* present prognathic jaws that protrude in the anterior portion of the body, with which they trap and suck the content of preys (Tauber *et al.*, 2000). A campodeiform body presents a semitransparent exoskeleton that darkens only in some chitinous areas; this makes it possible to observe the hemocele, which shows whitish areas formed by lipids (Monserrat, 2016). Larval digestive tube is not connected with the anus; therefore, the food waste accumulates along the larval development, and it is only excreted during metamorphosis (Ribera and Melic, 2015).

Pacheco-Rueda *et al.* (2015) and Jose-Pablo *et al.* (2017) studied the biological cycle and predatory capacity of *C. valida* in confinement, without information of movement nor permanence in the field after release (Palomares-Pérez *et al.*, 2016). Field research on insect dynamics is made principally with the marking-release-recapture technique, making it possible to evaluate their dispersion, feeding behavior, and other interactions (Badii *et al.*, 2012). For this purpose, a reliable and lasting marking method is required, which does not affect insect biology or behavior, nor cause toxicity to other organisms in the environment (Arredondo *et al.*, 2017).

The liposoluble dyes can be stored in the hemocele or insect adipose tissues after ingestion (Lindig *et al.*, 1980). Although there are molecular techniques for marking insects (Leung *et al.*, 2020), the addition of colorants in the diet is an inexpensive technique, which does not require much manipulation. Furthermore,

Los colorantes liposolubles se pueden almacenar en el hemocele o en los tejidos adiposos de los insectos después de ingerirlos (Lindig *et al.*, 1980). Aunque existen técnicas moleculares de marcaje de insectos (Leung *et al.*, 2020), la administración de colorantes en la dieta es una técnica de costo bajo, sin requerir gran manipulación del insecto. Además, los colores se identifican con facilidad y pueden permanecer durante varias etapas de su desarrollo (Arredondo *et al.*, 2017). Qureshi *et al.* (2005) informaron marcajes exitosos con tintes liposolubles en pruebas de marcaje-liberación con coleópteros, lepidópteros, dípteros, isópteros e himenópteros. Sin embargo, no se encontraron reportes sobre el uso de estos colorantes en neurópteros, ya que las investigaciones sobre comportamiento y depredación se realizan principalmente en laboratorio e invernadero.

Dentro del desarrollo de nuevas herramientas y estrategias de manejo integrado de plagas, el marcaje adecuado de *C. valida* es un instrumento que contribuirá al estudio de la ecología y el comportamiento depredador tras su liberación en campo. Por ello, es necesario conocer cuál colorante marca de manera adecuada a las larvas de *C. valida*, sin afectar la emergencia de adultos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de dos colorantes liposolubles en el marcaje de *C. valida* y su efecto en el desarrollo y supervivencia de larvas y pupas, hasta la emergencia de adultos; bajo la hipótesis de que al menos uno de los dos colorantes marcaría bien al insecto sin afectar a los organismos para su evaluación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, México. Larvas recién emergidas de primer estadio se tomaron de una cría de *C. valida* establecida en el laboratorio, y recolectada en un huerto cítrico local. Los colorantes liposolubles evaluados fueron Sudan Red 7B (CAS No. 6368-72-5) y Sudan Blue 670 (CAS No. 17354-14-2, Sigma-Aldrich® México), incorporados en la dieta de las larvas. La dieta se elaboró al mezclar 50 g de huevos de *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) mantenidos en congelación, con 1 g de colorante (Ostlie *et al.*, 1984) y 14 g de miel de abeja (Mudassar *et al.*, 2013). Para cada tratamiento se utilizaron 40 larvas. Cada larva se mantuvo en una caja de Petri de plástico (60 x 15 mm), con aproximadamente 5 g de alimento, dentro de un cuarto de cría mantenido a 25 ± 2 °C, 60 a 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 h luz. El alimento se sustituyó cada 4 d.

colors are easily identified and can remain during various stages of insect development (Arredondo *et al.*, 2017). Qureshi *et al.* (2005) reported successful markings with liposoluble dyes in marking-release trials with coleopterans, lepidopterans, dipterans, isopterans and hymenopterans. However, reports on the use of these dyes in neuropterans were not found, since research on behavior and predation are mainly carried out in laboratory and greenhouse.

On developing new integrated pest management tools and strategies, the adequate marking of *C. valida* is an instrument that will contribute to the study of their ecology and predatory behavior after releasing in the field. Therefore, it is necessary to know which dye adequately marks the larvae of *C. valida* without affecting the emergence of adults. Thus, the objective of this study was to evaluate the effectiveness of two liposoluble dyes in the marking of *C. valida* and their effect on the development and survival of larvae and pupae until they emerged as adults; under the hypothesis that at least one of the two dyes adequately would mark insects without affecting individuals for their evaluation.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in the Laboratorio de Sanidad Vegetal of the Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Mexico. Recently emerged larvae from the first instar were taken from a brood of *C. valida* established in the laboratory, after collected parental individuals in a local citrus orchard. The liposoluble dyes evaluated were Sudan Red 7B (CAS No. 6368-72-5) and Sudan Blue 670 (CAS No. 17354-14-2, Sigma-Aldrich® Mexico), incorporated in the diet of the larvae. The diet was elaborated by mixing 50 g of frozen-stored eggs of *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) with 1 g of dye (Ostlie *et al.*, 1984) and 14 g of honey (Mudassar *et al.*, 2013). Forty larvae were used in each treatment. Each larva was maintained in a plastic Petri dish (60 x 15 mm), with approximately 5 g of food, within a breeding room maintained at 25 ± 2 °C, 60 to 70% relative humidity, and a photoperiod of 12 h light. Food was replaced every 4 d.

Recently emerged adults were placed in transparent plastic rectangular boxes (2 L); water was supplied using a sponge submerged in a container of 15 mL, attached with Parafilm® paper. The rectangular boxes were covered with cheese-cloth. Adults food was a diet based on brewer's yeast (30 g), condensed milk (15 mL), sugar (20 g), egg (1 yolk + 2 whites), wheat germ (50 g), honey (30 g), and distilled water (45 mL) (Cañedo and Lizárraga, 1989).

Los adultos recién emergidos se colocaron en cajas rectangulares de plástico transparente (2 L); se les suministró agua por medio de una esponja sumergida en un recipiente de 15 mL, sostenida con papel Parafilm[®]. Las cajas rectangulares se cubrieron con gasa para pañal (cheese cloth). El alimento de los adultos fue una dieta base de levadura de cerveza (30 g), leche condensada (15 mL), azúcar (20 g), huevo (1 yema + 2 claras), germen de trigo (50 g), miel (30 g) y agua destilada (45 mL) (Cañedo y Lizárraga, 1989).

El número de larvas se contabilizó en las cuales se podía apreciar el marcaje abdominal a simple vista y se registró la duración en días de los estadios de larva y pupa. Dado que no se cumplieron los supuestos de normalidad de los datos, verificados por medio de la prueba de Shapiro-Wilk ($p \leq 0.05$), se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon. Además, se realizaron observaciones para detectar cambios de apariencia o malformaciones. La supervivencia de las larvas se registró cada día. El porcentaje de supervivencia de las pupas se calculó a partir del número de adultos emergidos. La prueba de Chi-cuadrada se usó para comparar el porcentaje de supervivencia de larvas, de larvas a pupa, de pupa a la emergencia de adultos, y del número inicial de larvas a la emergencia de adultos. Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico R (STHDA, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos colorantes permitieron el marcaje de las larvas a las 24 h de proporcionar la dieta. A simple vista se observó el color azul en el abdomen de todas las larvas alimentadas con la dieta adicionada con Sudan Blue 670. La dieta con Sudan Red 7B marcó de rojo el abdomen del 98% de las larvas que la recibieron (Figura 1).

The number of larvae was counted, wherein the abdominal marking was clearly visible; and the duration in days of the instars of larvae and pupae were registered. Since normality assumptions for data were not met, this was verified using the Shapiro-Wilk test ($p \leq 0.05$), then, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used, followed by the Wilcoxon rank sum test. In addition, observations were made to detect changes in appearance or malformations. Larval survival was registered each day. Pupal survival percentage was calculated from the number of emerged adults. The Chi-square test was used to compare the survival percentage of larvae, from larva to pupa, from pupa to adult emergence, and of the initial number of larvae to adult emergence. The analysis of data was performed with the statistical software R (STHDA, 2020).

RESULTS AND DISCUSSION

Both dyes allowed the marking of the larvae 24 h after providing the diet. Blue color was visible with the naked eye in the abdomen of all of the larvae fed with the diet added with Sudan Blue 670. The diet with Sudan Red 7B marked in red the abdomen of 98% of the larvae that received it (Figure 1).

The marked larvae showed no evident alterations of appearance or malformations. With Sudan Red, 39 larvae obtained the expected coloring, although it was almost indistinguishable later in the adults. Furthermore, the red coloring of the marked larvae could be sometimes confused with the natural coloring of some larvae of *C. valida*. In contrast, Sudan Blue provided a blue coloring in the 40 larvae and was also observable until the adult stage. The blue color is clearly distinguishable, with no similarity to the natural coloring of the insect.

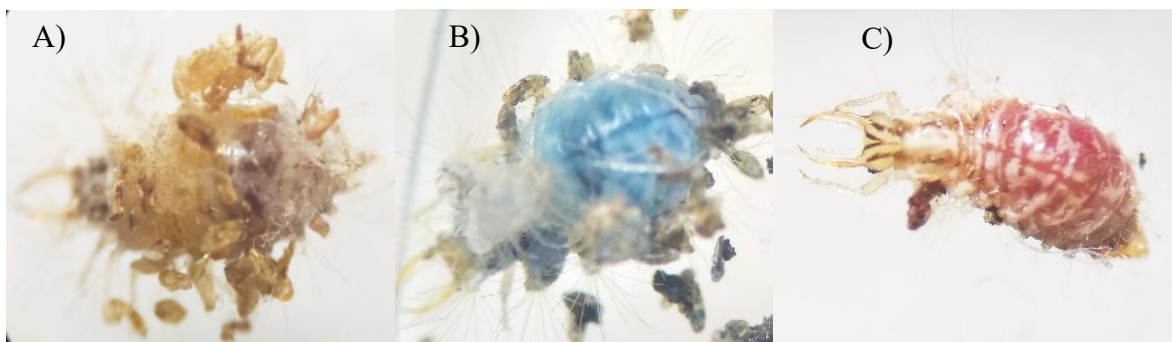


Figura 1. Larvas de *Ceraeobrysa valida* alimentadas con dieta mezclada con los tratamientos muestran la coloración del abdomen: A) testigo sin colorante, B) Sudan Blue 670, C) Sudan Red 7B.

Figure 1. Larvae of *Ceraeobrysa valida* fed with diet mixed with the treatments showing their abdomen coloration: A) control with no dye, B) Sudan Blue 670, C) Sudan Red 7B.

Las larvas marcadas carecieron de alteraciones evidentes de apariencia y no presentaron malformaciones. Con Sudan Red, las 39 larvas obtuvieron la coloración esperada, aunque después fue casi indistinguible en los adultos. Incluso, el color rojizo de las larvas marcadas puede confundirse en ocasiones con la coloración natural de algunas larvas de *C. valida*. En cambio, Sudan Blue proporcionó una coloración azul en las 40 larvas y se pudo observar también hasta la edad adulta. El color azul se distingue con claridad, sin semejanza con los matices del color natural del insecto.

El periodo larvario tuvo una duración de 14 a 16 d y presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.001$). En el testigo, el desarrollo larval fue el más corto [mediana 14 d; $p \leq 0.0004$; media 14.00 ± 0.83 (D.E.) d], mientras que en los tratamientos con Sudan Red [16 d; media 16.09 ± 1.75 (D.E.) d] y Sudan Blue [15.5 d; media 15.47 ± 1.66 (D.E.) d] fue más prolongado (Figura 2). Sin embargo, los valores del desarrollo larval con las dietas con colorante, en ambos casos son menores a los 18.5 d registrados por Jose-Pablo *et al.* (2017), bajo condiciones similares de laboratorio y dieta, pero sin la adición de colorantes.

En la duración del periodo pupal hubo diferencias significativas ($p \leq 0.0001$). Las larvas alimentadas con la dieta roja presentaron un periodo pupal más prolongado [mediana 13 d; $p \leq 0.0004$; media 12.8 ± 0.80 (D.E.) d] (Figura 2), cercano al valor registrado por Barbosa *et al.* (2002) para *Ceraeochrysa everes* (Banks). Sin embargo, se observó un periodo pupal similar cuando se utilizó la dieta azul o la del testigo [mediana azul 11 d, $p = 0.42$, media 11.6 ± 1.42 (D.E.) d; mediana roja 11 d, media 11.3 ± 1.18 (D.E.) d]. Estos valores son menores que lo indicado por Jose-Pablo *et al.* (2017) para *C. valida*, e incluso para otras especies de *Ceraeochrysa* [*C. caligata* (Banks) (Castro *et al.*, 2009), y *C. paraguayaria* (Navás) (De Bortoll y Murata, 2007)].

En promedio, en este estudio sobrevivieron el 81.7% de las larvas de *C. valida*, de las cuales 88.8% se desarrolló a pupa, y 93.1% de las pupas se desarrolló al estado adulto, sin diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($p > 0.85$) (Cuadro 1). Los porcentajes de supervivencia de los estadios larvales, de larvas a pupa y de pupa a adulto no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.85$). La supervivencia del 86.6% de las larvas

The larval period had a duration of 14 to 16 d and showed significant differences among treatments ($p \leq 0.001$). In the control, larval development was the shortest [median 14 d; $p \leq 0.0004$; mean 14.00 ± 0.83 (SD) d], while in the treatments with Sudan Red [16 d; mean 16.09 ± 1.75 (SD) d] and Sudan Blue [15.5 d; mean 15.47 ± 1.66 (SD) d] it was longer (Figure 2). However, larval development values with the diets with dye, in both cases, were lower than the 18.5 d reported by Jose-Pablo *et al.* (2017), under similar conditions of laboratory and diet, but without the addition of dyes.

In the duration of the pupal period, there were significant differences ($p \leq 0.0001$). The larvae fed with the red diet showed a longer pupal period [median 13 d; $p \leq 0.0004$; mean 12.8 ± 0.80 (SD) d] (Figure 2), close to the value recorded by Barbosa *et al.* (2002) for *Ceraeochrysa everes* (Banks). However, a similar pupal period was observed when the blue diet was used or that of the control [median blue 11 d, $p = 0.42$, mean 11.6 ± 1.42 (SD) d; median red 11 d, mean 11.3 ± 1.18 (SD) d]. These values are lower than those indicated by Jose-Pablo *et al.* (2017) for *C. valida* and even for other species of *Ceraeochrysa* [*C. caligata* (Banks) (Castro *et al.*, 2009), and *C. paraguayaria* (Navás) (De Bortoll and Murata, 2007)].

On average, in this study, 81.7% of *C. valida* larvae survived, of which 88.8% developed to pupae, and 93.1% of the pupae developed to the adult stage, with no significant difference among treatments ($p > 0.85$) (Table 1). The percentages of survival as larva, from larva to pupa, and from pupa to adult stage did not show significant difference among treatments ($p > 0.85$). The 86.6% survival of the larvae that developed to pupa in the control of our study was similar to the value (81%) obtained by Jose-Pablo *et al.* (2017) for this species under similar laboratory conditions.

Also, it coincides with what was found by Walton and Colong (2008), who obtained 89% survival in larvae of *Eldana saccharina* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) marked with Sudan Red 7B. Furthermore, Qureshi *et al.* (2005) observed 90% survival in larvae of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) when using the dye Sudan Red 7B, although only 73% survived with Sudan Blue 670. Survival of adults fed with a diet containing red dye was 89.7%, similar to that obtained using the blue dye (94.1%). Although the survival of the initial number

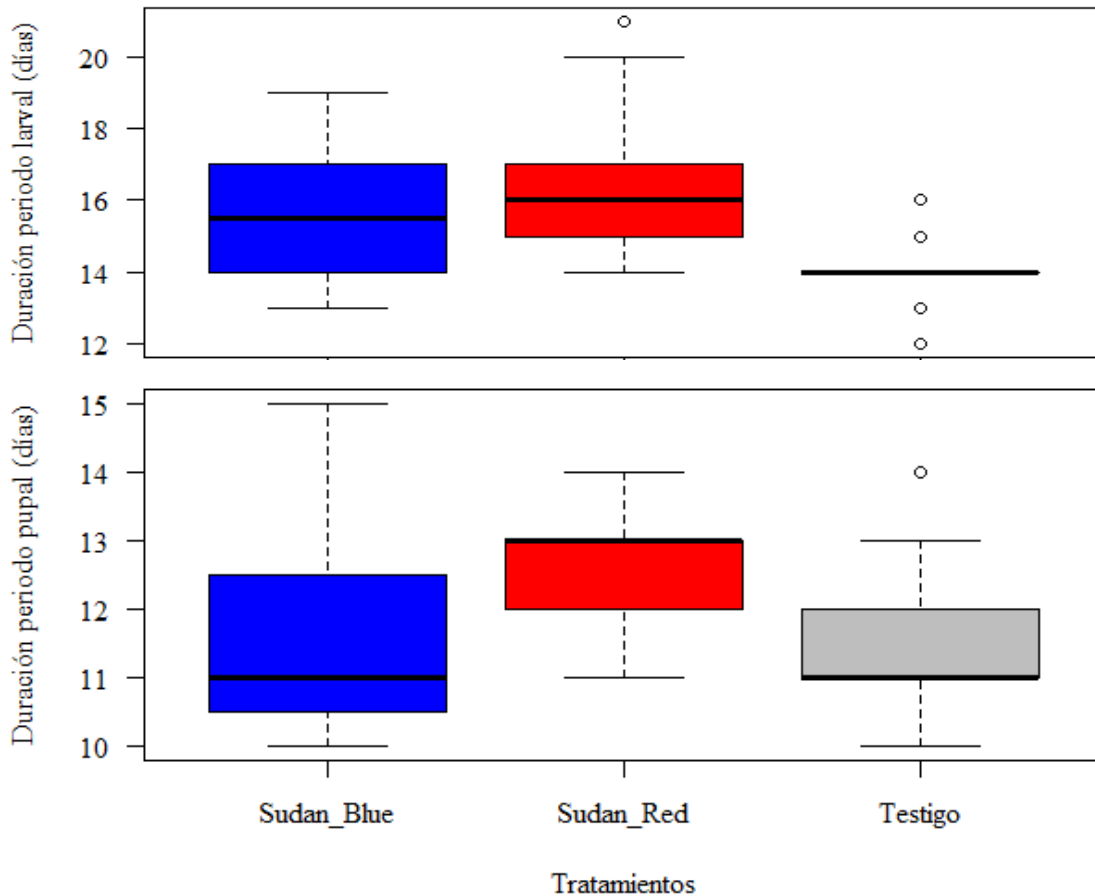


Figura 2. Comparación de la duración del periodo larval y pupal de *Ceraeochrysa valida* (Banks), alimentada con dos colorantes liposolubles incorporados en la dieta y un testigo. Línea oscura = mediana; bordes de las cajas = 25 y 75% de la muestra. Líneas extendidas desde la caja = valores mínimo y máximo. Puntos = valores atípicos.

Figure 2. Comparison of the duration of the larval and pupal periods of *Ceraeochrysa valida* (Banks), fed with two liposoluble dyes incorporated in the diet and a control. Dark line = median; edges of the boxes = 25 and 75% of the sample. Lines extended from the box = minimum and maximum values. Points = atypical values.

que pasaron a pupa en el testigo del presente estudio fue similar a la obtenida (81%) por Jose-Pablo *et al.* (2017) para esta especie en condiciones semejantes en laboratorio.

Además coincide con lo encontrado por Walton y Colong (2008) quienes obtuvieron 89% de supervivencia en larvas de *Eldana saccharina* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) marcadas con Sudan Red 7B. También, Qureshi *et al.* (2005) observaron 90% de supervivencia en larvas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) al usar el colorante Sudan Red 7B, aunque sólo sobrevivió 73% con el Sudan Blue 670. La supervivencia de adultos alimentados con dieta con colorante rojo fue 89.7%, similar a lo obtenido con el uso del colorante azul (94.1%). A pesar de que la supervivencia del número inicial

de larvae until the emergence of adults was 80.0% for Sudan Blue, there was no significant difference ($p = 0.63$) respect to survival obtained with Sudan Red (65%) or the control (57.5%).

Both colorants were associated with the increase in the duration of the larval period (15.5 to 16 d) respect to the control (14 d). Values are close to those reported for this species under similar conditions. Some effects associated with this difference could influence the objectives of later use; however, the attainment of survival levels similar to the control implies a reduced effect of the colorants on insect physiology, which even permits development until reaching the adult stage.

According to Jose-Pablo *et al.* (2017), the larvae of *C. valida* are voracious predators that can consume

Cuadro 1. Supervivencia de larvas, larvas que pasaron a pupa y emergencia de adultos (%) de *Ceraeochrysa valida* alimentados con colorantes liposolubles incorporados en la dieta. Condiciones de cría: 25 ± 2 °C, 60-70 % H.R., fotoperiodo de 12:12 h L:O.**Table 1. Survival of larvae, larvae that pupated, and adult emergence (%) of *Ceraeochrysa valida* fed with liposoluble dyes incorporated in the diet. Breeding conditions: 25 ± 2 °C, 60-70 % H.R., photoperiod of 12:12 h L:D.**

Tratamiento	Supervivencia de larvas (%)	Larvas que pasaron a pupa (%)	Emergencia de adultos (%)	Supervivencia de larva a emergencia de adulto (%)
[n ₀ = 40] [†]	[n ₁] [‡]	[n ₂] [§]	[n ₃] [¶]	[n ₀ a n ₃] [‡]
Sudan Red 7B	80.0 a ^{††} [32]	90.6 a [29]	89.7 a [26]	65.0 a
Sudan Blue 670	90.0 a [36]	94.4 a [34]	94.1 a [32]	80.0 a
Testigo	75.0 a [30]	86.6 a [26]	88.5 a [23]	57.5 a
	n.s. (p = 0.85)	n.s. (p = 0.97)	n.s. (p = 0.98)	n.s. (p = 0.63)
Promedio	81.7 (32.7)	88.8 (29.7)	93.1 (27.0)	67.5 %

[†]Número inicial de larvas [n₀] por tratamiento. [‡]Supervivencia de larvas [n₁] al último estadio larval, respecto a n₀. [§]Pupas formadas [n₂], respecto a n₁. [¶]Emergencia de adultos [n₃], respecto a pupas formadas [n₂]. [‡]Supervivencia de larva a emergencia de adulto [n₀ a n₃]. ^{††}Porcentajes con la misma letra en la misma columna no muestran diferencia significativa (Chi-cuadrada). ♦ [†]Initial number of larvae [n₀] per treatment. [‡]Survival of larvae [n₁] at the final larval instar, respect to n₀. [§] Formed pupae [n₂] respect to n₁. [¶]Emergence of adults [n₃] respect to formed pupae [n₂]. [‡]Survival of larvae to the emergence of adult [n₀ to n₃]. ^{††}Percentages with the same letter per column indicate no significant difference (Chi-square).

de larvas hasta la emergencia de adultos fue 80.0% para Sudan Blue, no hubo diferencias significativas (p=0.63) respecto a la supervivencia obtenida con Sudan Red (65%) o el testigo (57.5%).

Ambos colorantes se asociaron con el aumento en la duración del periodo larvario (15.5 a 16 d) respecto al testigo (14 d), los valores son cercanos a los documentados para esta especie en condiciones similares. Algunos efectos asociados con esta diferencia podrían influir en los objetivos de su uso posterior; sin embargo, el obtener niveles de supervivencia similares al testigo implica un efecto reducido de los colorantes en la fisiología del insecto, que incluso permite su desarrollo hasta alcanzar el estado adulto. De acuerdo con Jose-Pablo *et al.* (2017), las larvas de *C. valida* son depredadoras voraces que pueden llegar a consumir 153 ninfas-1 de *D. citri* en las primeras 6 h de exposición. En este contexto, un periodo larvario prolongado permitiría al depredador consumir un mayor número de presas y no representaría un inconveniente grave para el insecto. El fin es marcar a las larvas para después liberarlas y observar su comportamiento depredador en campo para su recaptura. Bajo esta premisa, el colorante Sudan Blue 670 mostró buen desarrollo larvario y pupal, con una supervivencia adecuada y una marca fácil de visualizar e inconfundible en condiciones de campo. Por lo tanto es factible que su uso facilite el marcaje

153 nymphs-1 of *D. citri* in 6 h of exposure. In context, a longer larval period would permit predators to consume larger numbers of prey, and it would not represent a problem for the insect. The goal is to mark the larvae to release them later and to observe their predatory behavior in the field before their recapture. Under this premise, the dye Sudan Blue 670 showed good larval and pupal development, with good survival and a mark that is easily visual and unequivocal under field conditions. Therefore, it is plausible that using dye facilitates the marking of *C. valida* larvae in marking-release-recapture studies.

CONCLUSIONS

The marking method was efficient; the coloring provided was persistent and easy to detect, especially the blue. Larvae showed a longer larval development when fed with the red (Sudan Red 7B) or the blue (Sudan Blue 670) dye, compared to the control.

Green lacewing pupal period was longer with the red dye than with the blue one or the control, with no significant differences between the latter two. Sudan Blue 670 was the colorant of choice for field evaluations of *Ceraeochrysa valida*.

—End of the English version—

-----*

de larvas de *C. valida* en estudios de marcado-liberación-recaptura.

CONCLUSIONES

El método de marcaje resultó eficiente, la coloración proporcionada fue persistente y fácil de detectar, en especial, el color azul. Las larvas mostraron un desarrollo larval más largo cuando se alimentaron con el colorante rojo (Sudan Red 7B) o el azul (Sudan Blue 670), respecto al testigo.

El periodo pupal de la crisopa fue mayor con el colorante rojo que con el colorante azul o el testigo, sin diferencias entre estos últimos. Sudan Blue 670 fue el colorante de elección para las evaluaciones de *Ceraeochrysa valida* en campo.

LITERATURA CITADA

- Arredondo, J., L. Ruiz, G. López, and F. Díaz-Fleischer. 2017. Visibility and persistence of marker dyes and effect on the quality and mating competitiveness of mass-reared flies (Diptera: Tephritidae): *Anastrepha obliqua* and bisexual and genetic sexing (Tapachula-7) strains of *A. ludens*. J. Econ. Entomol. 110: 1653-1657. <https://doi.org/10.1093/jee/tox154>
- Barbosa, R. L., S. de Freitas, and A. Machado. 2002. Biological aspects of the immature stages of *Ceraeochrysa everes* (Banks) (Neuroptera: Chrysopidae). Scient. Agric. 59: 581-583.
- Badii, M. H., A. Guillen, J. Landeros, E. Cerna, Y. Ochoa, y J. Valenzuela. 2012. Muestreo por métodos de captura-recaptura. Int. J. Good Sci. 7: 97-131.
- Cañedo, T., y T. Lizárraga. 1989. Dietas artificiales para crianza en laboratorio de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae). Rev. Peru. Ent. 31: 83-85.
- Castro, A. L., G. I. Cruz, I. F. Silva, C. S. Paula, M. L. Leão, T. E. Ferreira, e A. P. Menezes. 2009. Biología de *Ceraeochrysa caligata* (Banks, 1945) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphidae). Rev. Bras. Agroecol. 4: 2537-2540.
- De Bortoll, S. A., e A. T. Murata. 2007. Aspectos biológicos de *Ceraeochrysa paraguayana* (Navás, 1920) (Neuroptera: Chrysopidae) em condições de laboratorio. Bol. San. Veg. Plagas. 33: 35-42.
- Dhandapani, N., P. Sarkar, and G. Mishra. 2016. Chrysopids. In: Omkar (ed). Ecofriendly Pest Management for Food Security. ELSEVIER. pp: 311-327.
- Giffoni, J., N. Valera, F. Díaz, y C. Vázquez. 2007. Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. Bioagro. 19: 109-113.
- Jose-Pablo, R., J. A. Villanueva-Jiménez, M. C. Vargas-Mendoza, and A. Huerta-de-la-Peña. 2017. Life cycle and larval predation by *Ceraeochrysa valida* (Banks) on nymphs of *Diaphorina citri* Kuwayama. Southwest. Entomol. 42: 61-72.
- Leung, K., E. Ras, K. B. Ferguson, S. Ariëns, D. Babendreier, P. Bijma, K. Bourtzis, J. Brodeur, M. A. Bruins, A. Centurión, S. R. Chattington, M. Chinchilla-Ramírez, M. Dicke, N. E. Fatouros, J. González-Cabrera, T. V. M. Groot, T. Haye, M. Knapp, P. Koskinioti, S. Le Hesran, M. Lyrakis, A. Paspati, M. Pérez-Hedo, W. N. Plouvier, C. Schlötterer, J. M. Stahl, A. Thiel, A. Urbaneja, L. van de Zande, E. C. Verhulst, L. E. M. Vet, S. Visser, J. H. Werren, S. Xia, B. J. Zwaan, S. Magalhães, L. W. Beukeboom, and B. A. Pannebakker. 2020. Next-generation biological control: the need for integrating genetics and genomics. Biol. Rev. doi: 10.1111/brv.12641.
- Lindig, O. H., G. Wiygul, J. E. Wright, J. R. Dawson, and J. Roberson. 1980. Rapid method for mass-marking boll weevils. J. Econ. Entomol. 73: 385-386.
- Montserrat, V. J. 2016. Los Coniopterígidos de la Península Ibérica e Islas Baleares (Insecta: Neuropterida, Neuroptera: Coniopterygidae). Rev. Graell. 72: 1-114.
- Mora-Aguilera, G., P. Robles-García, J. I. López-Arroyo, J. Flores-Sánchez, G. Acevedo-Sánchez, S. Domínguez-Monge, A. Gutiérrez-Espinosa, y E. Loeza-Kuk. 2016. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. Rev. Mex. Fitopatol. 32: 108-119.
- Mudassar, M. T., Ehsan-ul-Haq, M. Naemullah, M. Shakeel, M. Ashfaq, A. U. Nisa, and J. Khan. 2013. Economic rearing of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) in insectary. Pakistan J. Agric. Res. 26: 309-315.
- Ostlie, K. R., L. G. Higley, L. V. Kaster, and W. B. Showers. 1984. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) development, larval survival and adult vigor on meridic diets containing marker dyes. J. Econ. Entomol. 77: 118-120.
- Pacheco-Rueda, I., J. Lomelí-Flores, J. I. López-Arroyo, H. González-Hernández, J. Romero-Nápoles, M. T. Santillán-Galicia, y J. Suarez-Espinoza. 2015. Preferencia de tamaño de presa en seis especies de Chrysopidae (Neuroptera) sobre *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Rev. Colomb. Entomol. 41: 187-193.
- Palomares-Pérez, M., M. A. Ayala-Zermeño, B. Rodríguez-Vélez, J. J. de la Cruz-Llanas, J. A. Sánchez-González, H. C. Arredondo-Bernal, y E. G. Cordoba-Urtiz. 2016. Abundancia y depredación de *Ceraeochrysa valida* (Neuroptera: Chrysopidae) sobre *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México. Chil. J. Agric. Anim. Sci. 32: 234-243.
- Qureshi, J. A., L. L. Buschman, J. E. Throne, and S. B. Ramaswamy. 2005. Adult dispersal of *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Crambidae) and its implications for resistance management in Bt-maize. J. Appl. Entomol. 129: 281-292.
- Ribera, I., y A. Melic. 2015. Orden Neuroptera s. s. (Planipennia). Rev. IDE@ 58: 1-12.
- Rodríguez-Palomera, M., J. Cambero-Campos, A. Robles-Bermúdez, C. Carvajal-Cazola, y O. Estrada-Virgen. 2012. Enemigos naturales asociados a *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en Nayarit, México. Acta Zool. Mex. 28: 625-629.
- STHDA (Statistical Tools for High-throughput Data Analysis). 2020. Kruskal-Wallis test in R. <http://www.sthda.com/english/wiki/kruskal-wallis-test-in-r>. (Consulta: mayo 2020).
- Tauber, C., T. de León, N. D. Penny, and M. J. Tauber. 2000. The genus *Ceraeochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae) of America North of Mexico: Larvae, adults, and comparative biology. Ann. Entomol. Soc. Am. 93: 1195-1221.
- Walton, A. J., and D. E. Colong. 2008. Use oil soluble dyes to mark adult *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Pyralidae). Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 81: 298-309.

MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO POTENCIAL DE RAÍZ DE *Pinus patula* PRODUCIDO EN CHAROLAS CON PODA RADICAL

MORPHOLOGY AND ROOT GROWTH POTENTIAL OF *Pinus patula* PRODUCED IN TRAYS WITH ROOT PRUNING

Manuel Aguilera-Rodríguez¹, Arnulfo Aldrete^{1*}, J. Jesús Vargas-Hernández¹, Javier López-Upton¹, Miguel Ángel López-López¹, Víctor M. Ordaz-Chaparro²

¹Ciencias Forestales, ²Edafología. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. (aaldrete@colpos.mx).

RESUMEN

La planta producida en charolas desarrolla raíces envolventes que afectan su crecimiento posterior. El objetivo del estudio fue evaluar la morfología y el crecimiento radical de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. producido en tres tipos de charolas con cavidades de 170 cm³, dos de plástico y una de poliestireno, con y sin recubrimiento de cobre para podar la raíz de la planta. La hipótesis fue que la planta producida en charolas con recubrimiento de Cu(OH)₂ al 7%, al trasplantarse a envases de mayor capacidad, presenta crecimientos radicales superiores a los producidos en las mismas charolas sin recubrimiento. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 3 × 2 (tres tipos de charola, sin y con impregnación), y cuatro repeticiones por tratamiento. Un tratamiento adicional de charola con diseño para poda radical aérea se incluyó para comparar ambos tipos de poda. Las diferencias estadísticas entre tratamientos se detectaron con ANDEVA, con el procedimiento GLM y la comparación de medias con la prueba de Tukey (p ≤ 0.05). A los nueve meses en vivero, las plantas producidas en charolas con recubrimiento de cobre y diseño para poda radical aérea desarrollaron menos raíces envolventes que las producidas en las mismas charolas sin este tratamiento o diseño (0.1 vs. 3.3 y 0.2 vs. 3.5). Las pruebas de crecimiento radical se realizaron en macetas de 13.2 L durante 1.5 meses. Las plantas con poda radical, por efecto del cobre y del aire, desarrollaron tasas de crecimiento relativo mensual de raíz superiores a las plantas sin poda, en crecimiento horizontal (0.28 vs. 0.15 y 0.18 vs. 0.12 g g⁻¹ por mes) y en crecimiento total de raíces (0.37 vs. 0.29 y 0.30 vs. 0.25 g g⁻¹ por mes). La planta producida en charolas de poliestireno fue superior en calidad morfológica y radical que la planta de las charolas de plástico.

ABSTRACT

Plants grown in trays develop spiraling lateral roots that affect their later growth. The objective of the study was to evaluate root morphology and growth of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. produced in three types of trays with 170 cm³ cavities. Two trays were plastic and one polystyrene, with and without copper coating to prune the plant root. The hypothesis was that the plant produced in trays with 7% Cu(OH)₂ coating would have better root growth than those produced without coating when transplanted to larger containers. The experimental design was completely randomized with a factorial array of 3 × 2 (three types of tray, with and without Cu coating) and four replications per treatment. An additional treatment, a tray designed to air-prune roots, was included to compare the two types of pruning. Statistical differences between treatments were detected with an ANOVA, using the GLM procedure and the Tukey test for comparison of means (p ≤ 0.05). After nine months in the nursery, plants produced in trays with copper coating and those designed for air root pruning developed fewer spiraling lateral roots than those produced in the same trays without this treatment or design (0.1 vs. 3.3 and 0.2 vs. 3.5). Root growth potential test was conducted in 13.2-L pots for 1.5 months. Plants whose roots were pruned, by effect of copper and air, developed higher monthly relative root growth rates than plants whose roots had not been pruned: horizontal (0.28 vs. 0.15 and 0.18 vs. 0.12 g g⁻¹ per month) and total root growth (0.37 vs. 0.29 and 0.30 vs. 0.25 g g⁻¹ per month). Plants produced in polystyrene trays had better morphological and root quality traits than plants grown in plastic trays.

Key words: *Pinus patula*, root deformation in nursery, chemical root pruning.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: Abril, 2020. Aprobado: Octubre, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 55: 81-97. 2021.

Palabras clave: *Pinus patula*, deformación radical en vivero, poda radical química.

INTRODUCCIÓN

Al producir planta de especies forestales en charolas (contenedores) o en bolsas de polietileno no existe el riesgo de que las raíces laterales (RL), que emergen de la raíz principal, se deformen y crezcan hacia abajo al hacer contacto con las paredes de las cavidades (Sung y Dumroese, 2013). En ocasiones, algunas RL desarrollan longitudes mayores a la raíz principal y crecen en forma envolvente en la periferia del cepellón, esto ocurre de manera notable cuando se utilizan charolas con cavidades de volumen reducido ($\leq 150 \text{ cm}^3$) y cuando la planta permanece en ellas más tiempo del necesario (Dumroese y Landis, 2015; Sung *et al.*, 2019).

En reforestaciones hechas con planta producida sin poda radical, la raíz conserva el patrón de crecimiento envolvente y emite pocas raíces laterales en la capa fértil del suelo (Cortina *et al.*, 2006). Esta deformación puede ocasionar un anclaje inadecuado en el suelo y en consecuencia provoca supervivencia baja, crecimiento lento, doblamiento de los árboles por vientos y nevadas, y susceptibilidad mayor a fitopatógenos y roedores, en comparación con plantas de regeneración natural o producidas con poda radical en vivero (Nilsson *et al.*, 2010; Landis *et al.*, 2014).

Para prevenir la deformación radical se utilizan dos técnicas de poda de los ápices de las RL: 1) poda radical química (PRQ), la cual consiste en impregnar con sales de cobre (Cu) las paredes interiores de las cavidades, y 2) poda radical aérea (PRA), consistente en utilizar charolas con cavidades de plástico y aberturas en sus paredes o cavidades con pared de malla biodegradable (*jiffy*[®]). La planta producida con poda radical desarrolla un eje central y múltiples RL cortas, menores de 2 cm. En campo, estas RL reinician su crecimiento normal, en sentido horizontal, similar a como lo hacen las plantas de regeneración natural (Landis *et al.*, 2014). De acuerdo con Landis *et al.* (2014) y Sung y Haywood (2016), las plantas con poda radical química o aérea son más eficientes en campo que las plantas sin poda.

En México sólo las charolas de poliestireno se impregnan con soluciones de Cu, más con el fin de prevenir que se incrusten las raíces en las paredes de las charolas y al extraer las plantas, se dañen las raíces y las

INTRODUCTION

When producing forest species in trays (containers) or in polyethylene bags, there is a risk that lateral roots (LR) that emerge from the taproot become deformed and grow downwards when they make contact with the walls of the cavities (Sung and Dumroese, 2013). Occasionally, some LR grow longer than the taproot and grow in spiral around the periphery of the root plug. This occurs more notably when trays with smaller cavities ($\leq 150 \text{ cm}^3$) are used and when the plant remains there longer than necessary (Dumroese and Landis, 2015; Sung *et al.*, 2019).

In reforestations with plants produced without root pruning, roots keep the spiraling growth pattern and emit few lateral roots in the fertile soil layer (Cortina *et al.*, 2006). This deformation can cause inadequate anchoring in the soil and consequently low survival, slow growth, bending by winds and snow, and greater susceptibility to phytopathogens and rodents, compared with plants that regenerate naturally or are produced with root pruning in the nursery (Nilsson *et al.*, 2010; Landis *et al.*, 2014).

To prevent root deformation, two techniques are used to prune LR apices: 1) chemical root pruning (PRQ), which consists of coating the interior walls of the cavities with copper (Cu) salts, and 2) air root pruning (PRA), consisting of using plastic trays with cavities that have openings in their walls or that are made of biodegradable mesh (*jiffy*[®]). The plant produced with root pruning develops a central axis and multiple short LR less than 2 cm long. In the field, these LR reinitiate their normal horizontal growth, similar to plants that regenerate naturally (Landis *et al.*, 2014). According to Landis *et al.* (2014) and Sung and Haywood (2016), plants with chemical or air pruning are more efficient in the field than plants that are not pruned.

In Mexico, only polystyrene trays are coated with Cu solutions, more to prevent the roots from incrusting into the tray walls and damaging both roots and trays when the plants are extracted. Owners of nurseries usually are not interested in producing plants with an adequate root system structure. For this reason, rigid plastic trays are not coated with Cu solutions, as it is done in other countries (Escobar, 2012); and the use of plastic trays designed for air root pruning is incipient. The scarcity of experiments

charolas. Los dueños de los viveros tienen poco interés en producir planta con una estructura adecuada del sistema radical. Por ello, las charolas de plástico rígido no se impregnan con soluciones de Cu, como se hace en otros países (Escobar, 2012); en tanto que las charolas de plástico con diseño para poda radical aérea tienen un uso incipiente. La escasez de experimentos en campo sobre las bondades de las plantas con poda radical adecuada respecto a las plantas sin poda, ha contribuido a que las personas involucradas en la reforestación no le den la importancia debida a este aspecto.

Los estudios de campo sobre el efecto de la poda radical en especies nativas son escasos, quizá porque demandan periodos de observación de al menos dos años para tener resultados tangibles. Una alternativa de corto plazo para pronosticar el comportamiento en campo de la planta producida con y sin poda radical, es la prueba de crecimiento potencial de raíz (CPR), la cual consiste en evaluar durante dos a seis semanas una muestra representativa de 25 a 50 plantas, en macetas, melgas o estructuras de crecimiento hidropónico, para determinar la longitud, volumen, peso seco, arquitectura, posición u orientación de las raíces nuevas (Ritchie *et al.*, 2010).

En este contexto, el objetivo principal del estudio fue evaluar el efecto de la poda radical química de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. en la morfología de la planta en la etapa de vivero y el crecimiento potencial de la raíz al desarrollarse en cavidades de mayor capacidad volumétrica, para contar con evidencias que permitan predecir el desarrollo de la planta en campo. La hipótesis fue que la planta producida con poda radical química desarrolla número menor de raíces laterales envolventes en vivero y, después del trasplante en envases de capacidad mayor, emiten más biomasa radical en sentido horizontal y total que la planta sin poda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

La planta se produjo de octubre de 2016 a julio de 2017, en el vivero del ejido Peñuelas Pueblo Nuevo, Chignahuapan, Puebla, México (19° 57' 34.59" N y 98° 06' 23.03" O, y a una altitud de 2600 m). El clima de la zona es C (w₁) (w), templado subhúmedo con lluvias en verano, precipitación y temperatura medias anuales de 750 mm y 12.7 °C (CONAGUA, 2018). El

in the field on the benefits of plants with adequately pruned roots compared to plants that were not pruned has contributed to the fact that people involved in reforestation do not consider the importance of this issue.

Field studies on the effect of root pruning in native species are scarce, perhaps because they demand observation periods of at least two years to produce tangible results. One short-term alternative to predict behavior in the field of plants produced with and without root pruning is the test of root growth potential (RGP). Test consists of evaluating a representative sample of 25 to 50 plants for two to six weeks in pots, planting strips or hydroponic growth structures to determine length, volume, dry weight, architecture, and position or orientation of new roots (Ritchie *et al.*, 2010).

In this context, the main objective of this study was to evaluate the effect of chemical root pruning of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. in the nursery stage on plant morphology and root growth potential when they develop in larger containers to have evidence that would predict plant development in the field. The hypothesis was that plants produced with chemical root pruning develop a smaller number of spiraling lateral roots in the nursery and, after out-planting to larger containers, they emit more total root biomass and more horizontal root growth, than plants without pruning.

MATERIALS AND METHODS

Study location

Plants were produced from October 2016 to July 2017 in the nursery belonging to the ejido Peñuelas Pueblo Nuevo, Chignahuapan, Puebla, Mexico (19° 57' 34.59" N and 98° 06' 23.03" W, at an altitude of 2600 m). The climate in the zone is C (w₁) (w), temperate subhumid with summer rains, mean annual precipitation of 750 mm and mean annual temperature 12.7 °C (CONAGUA, 2018). The experiment was conducted inside the production area that has protective metal structures 3 m high with black 50% shade cloth and a fixed micro-aspersion irrigation system and 70-cm-high metal tables for the trays.

The root growth potential test (RGP) was conducted over 1.5 months, from the fourth week of July to the third week of September 2017 in a greenhouse that is part of the nursery belonging to the Graduate Program in Forestry Sciences, at Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco,

experimento se desarrolló al interior del área de producción que tiene estructuras metálicas de protección de 3 m de alto, con malla sombra al 50% de color negro y sistema de riego fijo por micro aspersión y mesas metálicas porta charolas de 70 cm de alto.

La prueba de crecimiento potencial de raíz (CPR) se realizó durante 1.5 meses, de la cuarta semana de julio a la tercera de septiembre de 2017, en un invernadero del vivero del Postgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, estado de México. El invernadero es una estructura metálica de 20 × 12 × 5 m, con cubierta plástica cenital y paredes con malla anti áfidos, ambas transparentes. La temperatura promedio al interior del invernadero durante la prueba fue 25.5 °C.

Producción de planta en vivero

Sustratos

La mezcla de sustrato se elaboró con aserrín de *P. patula* sin compostar, perlita, vermiculita y turba de musgo (*peat moss*) en proporción 70:10:10:10, con una porosidad total de 80%, porosidad de aireación de 34%, porosidad de retención de humedad de 46%, pH 5.1 y CE 0.1 dS m⁻¹. Estos valores están dentro de los intervalos recomendados para producir coníferas en charolas (Prieto *et al.*, 2012). En el laboratorio del vivero se determinó la porosidad, conforme con el procedimiento descrito por Prieto *et al.* (2012). Para el pH y la CE se utilizó un recipiente de 5 L, donde se vertió 1 L de sustrato y 1 L de agua potable, 24 h después se hizo su medición con medidor digital portátil de la marca HANNA® instruments, modelo H198130 (EUA).

En la mezcla de sustrato se adicionó fertilizante de liberación controlada a razón de 8.0 g L⁻¹ de Osmocote® Plus, fórmula 15-9-12, más micro elementos de 8-9 meses de liberación, y 1.0 g L⁻¹ de fertilizante de liberación lenta Micromax® (micro elementos). Estos insumos se utilizan en el vivero desde el 2003 para la producción de coníferas de clima templado (Hernández *et al.*, 2014).

Charolas utilizadas y cobrizado

Cuatro tipos de charolas con cavidades semicilíndricas de 170 cm³ se usaron en este experimento y sus características se describen en el Cuadro 1 e ilustran en la Figura 1.

Las cavidades de cuatro charolas de cada uno de los tipos P-54, PS-77 y RT-42 se impregnaron con una solución al 7.0% de Cu(OH)₂. En un recipiente de plástico con 100 mL de agua a 80 °C se disolvieron 83 g de Cu(OH)₂ comercial en polvo, con una pureza de 77% de Cu(OH)₂ (Hidromet®); ya disuelto el hidróxido se adicionó 1 L de sellador acrílico 5 x 1 (Comex®) y se

Mexico. The greenhouse is a metal structure measuring 20 × 12 × 5 m, with a plastic roof and walls made of anti-aphid screen, both transparent. Average interior temperature during the test was 25.5 °C.

Plant production in the nursery

Substrates

Substrate was a mixture of non-composted *P. patula* sawdust, perlite, vermiculite and peat moss in a proportion of 70:10:10:10 with total porosity of 80%, aeration porosity of 34%, moisture retention porosity of 46%, pH 5.1, and EC 0.1 dS m⁻¹. These values are within the recommended intervals for conifer production in trays (Prieto *et al.*, 2012). In the nursery laboratory, porosity was determined following the procedure described by Prieto *et al.* (2012). For pH and EC, we used a 5-L recipient with 1 L of substrate and 1 L of tap water; 24 h later, measurements were made with a portable digital meter (HANNA® instruments, model H198130, USA).

The substrate mixture was supplemented with 8.0 g L⁻¹ of the controlled-release fertilizer Osmocote® Plus, formula 15-9-12, and Micromax® (micro elements). These inputs have been used in this nursery since 2003 to produce temperate climate conifers (Hernández *et al.*, 2014).

Trays and copper coating

Four types of trays with 170 cm³ semi-cylindrical cavities were used in this experiment. Their features are described in Table 1, and illustrated in Figure 1.

The cavities of the four types of trays (P-54, PS-77 and RT-42) were coated with a 7.0% Cu(OH)₂ solution. In a plastic recipient, 83 g of commercial Cu(OH)₂ (Hidromet®) in powder form with a purity of 77% Cu(OH)₂ was dissolved in 100 mL water at 80 °C. Once the hydroxide was dissolved, 1 L of 5 x 1 acrylic sealer (Comex®) was added, and the mixture homogenized. The internal walls of the cavities were coated once with a 2-cm wide brush and dried in the sun for a week before filling them with substrate.

Treatments

The seven treatments were defined by the tray type and root pruning. P-54, PS-77 and RT-42 were used without copper coating (treatments T1, T2 and T3), and these same tray types were coated with Cu (treatments T4, T5 and T6). In addition, tray RTa-42, designed for air root pruning, was treatment T7. The control was T3 (tray RT-42, without Cu coating).

Cuadro 1. Características de cuatro contenedores con cavidades de 170 cm³ utilizados para producir planta de *P. patula*.**Table 1. Characteristics of four trays with 170 cm³ cavities, types used to produce *P. patula* plants.**

Charola	Ancho	Largo	Alto	Densidad m ⁻²	DS (mm)	Altura (cm)	Fabricante
PS-77	35.0	60.0	15.2	366	4.3	15.2	I
P-54	30.8	50.0	13.8	348	4.8	13.8	II
RT-42	37.3	37.5	23.4	298	4.8	13.8	
RTa-42							

DS: diámetro superior; I: Aislantes y Empaques, S.A. de C.V. Guadalajara, Jalisco; II: Innovaciones Industriales y Forestales, S.A. de C.V. Azcapotzalco, Estado de México. PS-77: Charola de poliestireno con 77 cavidades; P-54: charola de plástico de 54 cavidades; RT-42: rejilla con 42 tubetes de plástico; RTa-42: rejilla con 42 tubetes de plástico con tres filas de aberturas circundantes de 3 mm de ancho. ❖ DS: cell diameter; I: Aislantes y Empaques, S.A. de C.V. Guadalajara, Jalisco; II: Innovaciones Industriales y Forestales, S.A. de C.V., Azcapotzalco, México. PS-77: Polystyrene tray with 77 cavities; P-54: plastic tray with 54 cavities; RT-42: rack with 42 plastic tubes; RTa-42: rack with 42 plastic tubes with three equidistant 3 mm peripheral slots for lateral air pruning.

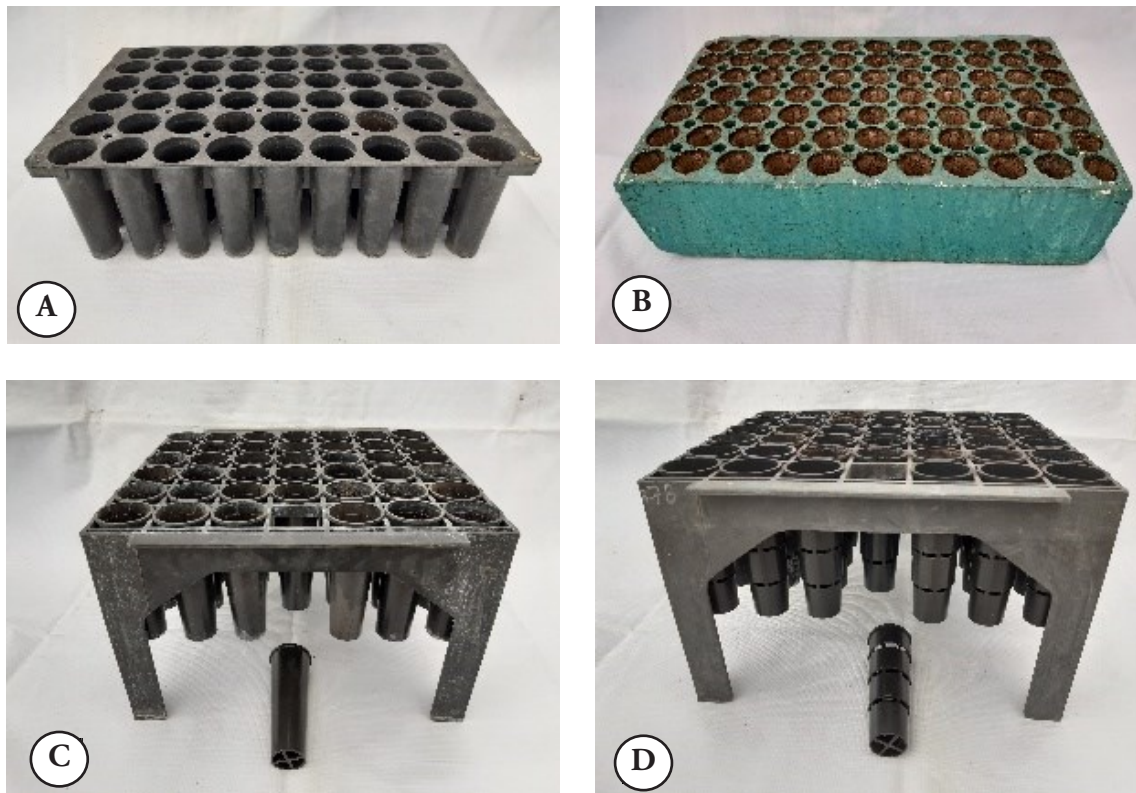


Figura 1. A) charolas P-54 plástico con 54 cavidades; B) PS-77 poliestireno expandido con 77 cavidades; C) RT-42 rejilla con 42 tubetes de plástico; D) RTa-42 rejilla con 42 tubetes de plástico con tres hileras de aberturas circundantes de 3 mm de ancho.

Figure 1. A) P-54 plastic trays with 54 cavities; B) PS-77 expanded polystyrene tray with 77 cavities; C) RT-42 rack with 42 plastic tubes; D) RTa-42 rack with 42 plastic tubes with three equidistant of 3 mm peripheral slots for lateral air pruning.

homogenizaron los ingredientes. Las paredes internas de las cavidades se impregnaron, una vez, con brocha de 2 cm de ancho; después las charolas se secaron al sol durante una semana, antes de su llenado con sustrato.

Tratamientos

Los siete tratamientos se definieron según los tipos de charola utilizados y de la poda de raíz efectuada. Las P-54, PS-77 y RT-42 se usaron sin recubrimiento de Cu (tratamientos T1, T2 y T3) y este mismo tipo de charolas se recubrieron con Cu (tratamientos T4, T5 y T6). Además, la charola RTa-42, con diseño para poda radical aérea, fue tratamiento T7; y el testigo fue el T3 (charola RT-42, sin recubrimiento de Cu).

Manejo de la producción

La siembra se realizó en la primera semana de octubre de 2016, con semilla de *P. patula* recolectada en septiembre de ese año en el ejido Llano Grande, municipio de Chignahuapan, Puebla. Antes de la siembra, la semilla se remojó 24 h en agua potable, que se cambió cada 6 h, y al final se desinfectó durante 30 min en solución al 10% de agua oxigenada comercial. Recién desinfectada se impregnó con biofungicida en polvo Bactiva^{MR}. En cada cavidad se depositaron dos semillas. De una a dos semanas después de ocurrida la germinación se realizó la reposición de planta en las cavidades vacías y el trasplante desde las cavidades con dobles plantas. Durante la etapa de establecimiento (germinación y crecimiento inicial) se aplicaron riegos ligeros cada 3 d, durante la etapa de crecimiento rápido y lignificación se aplicaron riegos pesados (hasta saturar el sustrato) cada 2 d. Desde la siembra y hasta mayo de 2017, el área de producción estuvo protegida con malla sombra al 50%, de color negro; después, de junio a julio de 2017, estuvo en condiciones de intemperie para su lignificación.

Durante la etapa de vivero se registró la temperatura del sitio donde se colocó el conjunto de charolas, así como del sustrato en cada tipo de charola. La temperatura del sitio se midió cada hora con un equipo de medición de la marca HOBO®, modelo U12-012 (EUA). La temperatura del sustrato se midió de lunes a viernes a las 07:00, 14:00 y 18:00 h cada día, en cavidades elegidas en forma aleatoria de cada tipo de charola, con un termómetro digital de aguja de aluminio de 15 cm de largo (HANNA® Instruments, modelo HI 145, EUA). Durante el período de producción, la temperatura media del sitio fue 13.7 °C y la del sustrato fue 13.5, 11.5, 11.4 y 10.6 °C, para las charolas PS-77, P-54, RT-42 y RTa-42, respectivamente.

Production management

Sowing was carried out in the first week of October 2016 with *P. patula* seed collected in September of the same year in the ejido Llano Grande, municipality of Chignahuapan, Puebla. Before sowing, the seed was soaked for 24 h in tap water, which was changed every 6 h and finally disinfected in commercial 10% hydrogen peroxide for 30 min. Immediately after disinfection, the seed was impregnated with powdered biofungicide BactivaTM. In each cavity two seeds were sown. One or two weeks after germination, plants from cavities with two plants were transplanted to empty cavities. During the establishment stage (germination and initial growth), light irrigation was applied every 3 d; during the stage of rapid growth and lignification, heavy irrigation (until substrate saturation) was applied every 2 d. From sowing and until May 2017 the production area was protected with black 50% shade cloth. Later, from June to July 2017 the cloth was removed for seedling lignification.

During the nursery stage, the temperature of the site where the set of trays was placed, as well as that of the substrate in each type of tray, were recorded. Site temperature was measured every hour with a HOBO® datalogger, model U12-012 (USA). Temperature of the substrate was measured Monday through Friday at 07:00, 14:00 and 18:00 h every day in randomly selected cavities of each tray type with a 15 cm long needle tip digital thermometer (HANNA® Instruments, model HI 145, USA). During the production period, mean site temperature was 13.7 °C and that of the substrate was 13.5, 11.5, 11.4 and 10.6 °C in trays PS-77, P-54, RT-42 and RTa-42, respectively.

Experimental design

The experimental design was completely randomized with a 3 × 2 factorial array: three types of tray (P-54, PS-77, RT-42) and two levels of chemical root pruning (with and without pruning), with four replications (trays) per treatment. For the additional treatment T7 (air root pruning), four trays were used and, together with treatments 1 to 6, placed randomly in the central part of the nursery production area.

Evaluated variables

Plant morphological characteristics

Nine-month-old plants were evaluated. From the central part of each of the four trays per treatment, 15 plants were extracted systematically. The root plugs were washed with tap water to

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 3×2 , tres tipos de charola (P-54, PS-77, RT-42) y dos niveles de PRQ (sin poda y con poda), con cuatro repeticiones (charolas) por tratamiento. Para el tratamiento adicional T7 (poda radical aérea) se utilizaron cuatro charolas, que junto con las de los tratamientos 1 al 6 se acomodaron en forma aleatoria en la parte central del área de producción del vivero.

VARIABLES EVALUADAS

Características morfológicas de la planta

La planta se evaluó a los nueve meses de edad. De cada tratamiento se extrajeron, en forma sistemática, 15 plantas de la parte central de cada una de las cuatro charolas por tratamiento. Para remover el sustrato y dejar libres las raíces, los cepellones de las plantas se lavaron con agua potable. En cada planta se midió la altura de la parte aérea (A), el diámetro del cuello del tallo (D) y el número de raíces laterales gruesas y envolventes (RLGE) con diámetro ≥ 1 mm y longitud \geq a la longitud del cepellón y con crecimiento en la parte externa del cepellón. Las plantas se seccionaron a la altura del cuello del tallo y ambas partes se colocaron por separado en bolsas de papel y se secaron en un horno eléctrico BINDER® ED- 720 durante 72 h a 70 °C. Para determinar el peso seco de la raíz (PSR) y de la parte aérea (PSA) se utilizó una báscula digital Ohaus® PA-214 a centésimas de gramo. Con los valores anteriores se calcularon: relación peso seco aéreo/peso seco radical (PSA/PSR), índice de robustez (IR = A/D) e índice de calidad de Dickson ICD = PST / (IR + PSA/PSR).

CreCIMIENTO POTENCIAL DE RAÍZ

La segunda parte del experimento consistió en las pruebas de crecimiento de la raíz, para las cuales se seleccionaron 10 plantas, de cada charola, con tallas promedio en diámetro y altura, para un total de 40 plantas por tratamiento. Para el crecimiento de la planta se utilizaron diez macetas de plástico por tratamiento, con diámetro inferior, diámetro superior y altura de 20, 30 y 27 cm, respectivamente, y capacidad volumétrica de 13.2 L. Las macetas se llenaron con sustrato nuevo, adicionado con fertilizantes, similar al sustrato utilizado para producir la planta en vivero. En cada maceta se plantaron cuatro plantas separadas en forma equidistante, a las cuales se les midieron el diámetro y la altura iniciales (D_0 , A_0). Las macetas se rotularon y se acomodaron en un diseño completamente al azar, en el piso de la parte central del invernadero. Durante la prueba se aplicaron dos riegos por semana.

remove the substrate from the roots. The shoot height (A), stem collar diameter (D) and number of thick spiraling lateral roots (RLGE) were measured on each plant ≥ 1 mm in diameter and with a length \geq the length of the root plug and with growth on the external part of the root plug. The plants were sectioned at the stem collar and the two parts were placed separately in paper bags and dried in an electric oven BINDER® ED- 720 for 72 h at 70 °C. To determine root (PSA) and shoot (PSR) dry weight, a digital scale Ohaus® PA-214, with precision to hundredths of a gram, was used. With these values, we calculated the shoot dry weight/root dry weight (PSA/PSR), robustness index (IR = A/D), and the Dickson quality index ICD = PST / (IR + PSA/PSR).

Root growth potential

The second part of the experiment consisted of root growth tests. For these tests, 10 plants with average stem diameter and height were selected from each tray, for a total of 40 plants per treatment. For plant growth, 10 plastic pots with bottom diameter, top diameter and height of 30, 30 and 27 cm, respectively, and volume of 13.2 L were used per treatment. Pots were filled with new substrate similar to the substrate in which plants were produced in the nursery, and fertilizer was added. Four plants were equidistantly planted in each pot and initial diameter and height (D_0 , A_0) were measured. Pots were labeled and arranged in a completely randomized design on the floor in the central part of the greenhouse. During the test the pots were irrigated twice per week.

After 1.5 months, plants were extracted and the root system washed, procuring that the root plug did not lose its initial shape in order to differentiate the roots emitted during the test. On each plant, final diameter and height (D_1 , A_1) were measured, and separately, the roots with horizontal growth (R_h) emitted from the periphery of the root plug and the roots with vertical growth (R_v) emitted from the base of the root plug were cut off. The stems, root plugs (C_p) and R_h and R_v of each plant were placed separately in paper bags and dried at 70 °C for 72 h in an electric oven (BINDER®, model ED- 720, Germany). Dry weight of each component was registered on centigram precision digital scale (Ohaus®, modelo PA214, USA).

For each treatment, we calculated the monthly relative growth rate in dry weight of roots with horizontal growth (T_{crmR_h}), that of roots with vertical growth (T_{crmR_v}), and of total roots emitted (T_{crmR_t}), with the formula $T_{crmR} = [(\ln Y_2 - \ln Y_1) / (T_2 - T_1)]$, where: Y_1 = value of the variable at the beginning of the test, Y_2 = the value of the variable at the end of the test; T_1 = plant age at the beginning of the test (9 months); T_2 = plant age at the end of the test (10.5 months). We considered as the initial value of dry root plugs, the weight without substrate (PSCp) and the final weight was that initial weight (PSCp) plus

A 1.5 meses de la prueba, se extrajo la planta y se lavó su sistema radical procurando que los cepellones no perdieran la forma que presentaban al inicio, con el propósito de diferenciar las raíces emitidas durante la prueba. En cada planta se midió el diámetro y la altura finales (D_1 , A_1), por separado se cortaron las raíces con crecimiento horizontal (R_h), emitidas desde la periferia del cepellón y las raíces con crecimiento vertical (R_v), emitidas a partir de la base del cepellón. Los tallos, cepellones (Cp) y R_h y R_v de cada planta se colocaron por separado en bolsas de papel y se secaron a 70 °C durante 72 h, en horno eléctrico de la marca BINDER®, modelo ED- 720 (Alemania). El peso seco de cada componente se determinó en báscula digital a centésimas de gramo (Ohaus®, modelo PA214, USA).

Para cada tratamiento se calculó la tasa de crecimiento relativo mensual en peso seco de raíces con crecimiento horizontal (T_{crmR_h}), raíces con crecimiento vertical (T_{crmR_v}) y para el total de raíces emitidas (T_{crmR_t}), con la fórmula: $T_{crmR} = [(\ln Y_2 - \ln Y_1) / (T_2 - T_1)]$, donde: Y_1 = valor de la variable al inicio de la prueba Y_2 = valor de la variable al final de la prueba; T_1 = edad de la planta al inicio de la prueba (9 meses); T_2 = edad de la planta al final de la prueba (10.5 meses). Para las variables R_h , R_v y R_t se consideró como valor inicial el peso seco del cepellón sin sustrato (PSCp) y como valor final el mismo peso (PSCp) más el peso de R_h , R_v y R_t , respectivamente. Al calcular el logaritmo de las variables R_h , R_v y R_t se consideró que no hubo cambios en el peso seco del cepellón sin sustrato (PSCp) durante el desarrollo de la prueba.

Análisis estadístico

Los análisis de varianza se realizaron con el programa SAS® versión 9.0 (SAS Institute, 2002), para las variables morfológicas de la planta producida y las tasas de crecimiento relativo al final de la prueba de crecimiento potencial de la raíz. A los factores con efectos significativos se les aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Para analizar el efecto del tratamiento adicional con poda radical aérea T7 (RTa-42), se realizó otro análisis de varianza y se incluyeron el tratamiento testigo T3 (RT-42 sin poda) y el T6 (RT-42 con recubrimiento de Cu).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de las plantas

El tipo de contenedor tuvo efectos significativos ($p \leq 0.05$) en las variables D, A, PSA, PSR, IR e ICD, más no en las variables relación PSA/PSR y RLGE, lo cual indica que la solución de Cu utilizada tuvo un efecto similar en los tres tipos de charola utilizadas con respecto al crecimiento de la parte aérea y de la

the weight of R_h , R_v and R_t , respectively. When calculating the logarithm of the variables R_h , R_v and R_t , there were no changes in root plug dry weight without substrate (PSCp) during the test.

Statistical analysis

The analyses of variance were performed with SAS® version 9.0 (SAS Institute, 2002) for the morphological variables of the plant and the relative growth rates at the end of the root growth potential test. The Tukey test ($p \leq 0.05$) was conducted on factors that had significant effects. To analyze the effect of the additional treatment with air root pruning T7 (RTa-42), another analysis of variance was performed, wherein the control treatment T3 (RT-42 without pruning) and T6 (RT-42 with Cu coating) were included.

RESULTS AND DISCUSSION

Plant growth

Type of container had significant effects ($p \leq 0.05$) on the variables D, H, PSA, PSR, IR and ICD, but not on the variables PSA/PSR ratio or RLGE, indicating that the Cu solution used had a similar effect in the three tray types used, regarding shoot and root growth. The plants produced in polystyrene trays without Cu pruning developed stems (D, A) and dry weights (PSA, PSR) greater than those of individuals grown in the two types of plastic trays and in PS-77 with Cu pruning.

Root pruning had significant ($p \leq 0.05$) effect on all the variables. Plants with root pruning had lower values than plants without pruning, except in the variables IR and RLGE. In all the treatments, plants grown in 170 cm³ cavities had sizes and quality indexes according with recommended values for native fast-growing pine species (Prieto and Sáenz, 2011), except D, plants in plastic trays developed slightly lower D values (Table 2).

When comparing the plants of the additional treatment T7 (RTa-42) with those of the control T3 (RT-42 without Cu coating) and with T6 (RT-42 with Cu coating) significant differences ($p \leq 0.05$) were found in the average values of the variables evaluated, by effect of root pruning type. Plants without pruning developed morphological variables and quality indexes that were qualitatively superior to the root-pruned plants, except RLGE. Plants with PRQ were superior to plants with PRA in size, dry weights and ICD. The set of plants with (chemical

raíz. La planta producida en charolas de poliestireno, sin poda debido al cobrizado, desarrolló tallas (D, A) y pesos secos (PSA, PSR) superiores a las de los individuos crecidos en dos tipos de charola de plástico y en PS-77 con podas por cobrizado.

Para los conjuntos de tratamientos sin y con poda radical el efecto fue significativo ($p \leq 0.05$) en todas las variables; las plantas con poda radical presentaron valores inferiores a las plantas sin poda, excepto en las variables IR y RLGE. En todos los tratamientos se produjo planta con tallas e índices de calidad acordes con los valores recomendados para pinos nativos de crecimiento rápido, producidos en charolas con cavidades de 170 cm³ (Prieto y Sáenz, 2011), excepto en D, donde la planta en charolas de plástico desarrolló valores ligeramente inferiores (Cuadro 2).

Al comparar la planta del tratamiento adicional T7 (RTa-42), con su tratamiento testigo T3 (RT-42 sin cubierta de Cu) y con el T6 (RT-42 con cubierta de Cu), se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los valores promedio de las variables evaluadas por efecto del tipo de poda radical. La planta sin poda desarrolló variables morfológicas e índices de calidad cualitativamente superiores a las

and air) root pruning, developed a better IR and a minimum number of RLGE, compared with plants without pruning (Table 3).

Chemical and air root pruning affected growth of plant lateral roots and, consequently, their shoot growth. South *et al.* (2016) stated that in nurseries in southwestern United States using Cu-coated trays, the production period can be up to 20% longer than in nurseries where this treatment is not applied. The longer period enables the plants to develop enough roots with firm root plugs to avoid damage or losses during extraction from the trays for packing.

Plants produced in polystyrene trays (PS-77) had higher values in the evaluated morphological variables, followed by plants grown in plastic trays with fused cavities (RT-42), with interchangeable cavities (P-54) and with interchangeable cavities with openings in the walls (RTa-42), respectively. This growth pattern was seemingly influenced by the mean temperature of the substrate: 13.5, 11.5, 11.4 and 10.6 °C in trays PS-77, P-54, RT-42 and RTa-42, respectively. Landis *et al.* (2014) mentioned that in some forest nurseries in the United States and Canada, located in extreme climate regions, the

Cuadro 2. Comparación de medias y niveles significativos en variables morfológicas de *Pinus patula* producido en tres charolas con y sin poda radical química, a los 9 meses en vivero.

Table 2. Comparison of means and significant levels in morphological variables of *Pinus patula* produced in three tray types with and without chemical root pruning in nursery at 9 months.

Tr	CT	FV	D (mm)	A (cm)	PSR (g)	PSA (g)	PSA/PSR	IR	ICD	RLGE
1	P-54		3.89bcd [†]	21.05cd	1.18b	2.18bcd	2.26a	5.45b	0.47ab	3.18a
2	PS-77	SP	4.16a	24.67a	1.31a	2.56a	2.39a	5.97a	0.49a	3.20a
3	T-42		3.95bc	21.72bc	1.22ab	2.30bc	2.29a	5.54b	0.48ab	3.50a
4	P-54		3.76d	19.50e	0.91d	1.99d	1.87b	5.23b	0.44bc	0.08b
5	PS-77	CP	4.07ab	22.48b	1.03c	2.42ab	1.99b	5.57b	0.41cd	0.08b
6	T-42		3.85cd	20.28de	0.95cd	2.10cd	1.91b	5.26b	0.39d	0.07b
	<i>p</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.064	<0.001	<0.006	<0.17
		SP	4.00a	22.48a	1.24a	2.35a	2.31a	5.65a	0.48a	3.29a
		CP	3.89b	20.76b	0.96b	2.17b	1.92b	5.35b	0.41b	0.06b
	<i>p</i>		<0.006	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	VR		≥4.0	15-25			1.5-2.5	≤6.25	≥0.40	

Tr: tratamiento; Ct: contenedor; FV: factor de variación; PSA: peso seco aéreo; PSR: peso seco radical; IR: índice de robustez; ICD: índice de calidad de Dickson; RLGE: raíces laterales gruesas envoltantes; P-54: charolas de plástico con 54 cavidades; PS-77: charola de poliestireno con 77 cavidades; RT-42: rejilla con 42 tubetes de plástico; SP: sin poda; CP: con poda; VR: valores recomendados para pinos nativos no cespitosos (Prieto y Sáenz, 2011). [†]Letras diferentes en una columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Tr: treatment; Ct: container; FV: factor of variation; PSA: shoot dry weight; PSR: root dry weight; IR: robustness index; ICD: Dickson quality index, RLGE: thick spiraling lateral roots; P-54: plastic trays with 54 cavities; PS-77: polystyrene tray with 77 cavities; RT-42: rack with 42 plastic tubes; SP: without pruning; CP: with pruning; VR: recommended values for native pines with non-grass growth stage (Prieto and Sáenz, 2011). [†]Different letters in a column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

plantas con poda, con excepción de RLGE. La planta con PRQ fue superior a la planta con PRA en tallas, pesos secos e ICD. El conjunto de plantas con poda radical (química y aérea) desarrolló un IR mejor y un número mínimo de RLGE, en comparación con las plantas sin poda (Cuadro 3).

La poda radical química y aérea afectó el crecimiento de las raíces laterales de las plantas y en consecuencia el crecimiento aéreo de las mismas. Al respecto, South *et al.* (2016) señalaron que, en algunos viveros del sureste de los Estados Unidos donde se utilizan charolas impregnadas con soluciones de Cu, el periodo de producción puede ser hasta 20% más largo al de los viveros donde no se aplica este tratamiento. Esto, para lograr que las plantas desarrollen suficientes raíces con cepellones firmes y prevenir daños o pérdidas de planta durante su extracción de las charolas para su embalaje.

La planta producida en charolas de poliestireno (PS-77) presentó los valores más altos en las variables morfológicas evaluadas, seguida por la planta de las charolas de plástico con cavidades fusionadas (RT-42), con cavidades intercambiables (P-54) y con cavidades intercambiables y aberturas en las paredes (RTa-42) respectivamente. Este patrón de crecimiento, al parecer, estuvo influenciado por la temperatura media del sustrato que fue 13.5, 11.5, 11.4 y 10.6 °C, para las charolas PS-77, P-54, RT-42 y RTa-42, respectivamente. Landis *et al.*

use of polystyrene trays predominates because they maintain more stable substrate temperature than plastic trays, higher in cold climates and cooler in hot climates.

Also, the mean temperature of the substrates contained in the cavities of the four tray types (≤ 13.5 °C) could have contributed to reduce nutrient release of the fertilizer Osmocote® Plus, which was used because its technical data sheet establishes that release is over a period of 8 to 9 months at a constant substrate temperature of 21 °C and this even can increase or decrease one month if the temperatures are 15 or 25 °C, respectively.

Aguilera *et al.* (2016) reported production of *Pinus montezumae* Lamb. in polystyrene trays with 160 cm³ cavities in the state of Hidalgo where mean temperature is 15.1 °C. They used two substrates (pine sawdust and peat moss) combined with 8 g L⁻¹ of three commercial brands of controlled release fertilizers. After 9.5 months when the plants were evaluated, they found 14.6, 25.5 and 39.8% of the nominal content of N, P and K remaining in the Multicote® spheres (Aguilera *et al.*, 2016). This result suggests that if the *P. patula* plants of our study had been evaluated at 10 months, those in plastic trays would have reached the minimum recommended diameter of 4 mm.

The plants of the additional treatment T7 (RTa-42) had lower values in size, dry weights and Dickson

Cuadro 3. Comparación de medias y niveles significativos de las variables morfológicas de *Pinus patula* producido en rejillas con tubetes de plástico, con poda radical química y aérea, a los 9 meses en vivero.

Table 3. Comparison of means and significant levels of morphological variables of *Pinus patula* produced in racks with plastic tubes, with chemical and air root pruning in the nursery after 9 months.

Tr	CT	FV	D (mm)	A (cm)	PSR (g)	PSA (g)	PSA/ PSR	IR	ICD	RLGE
3	RT-42	SP	3.95a [†]	21.72a	1.22a	2.30a	1.91b	5.54a	0.48a	3.50a
6		PRQ	3.85a	20.28b	0.95b	2.10b	2.29a	5.26b	0.41b	0.08b
7	RTa-42	PRA	3.67b	18.77c	0.83c	1.77c	2.28a	5.13b	0.36c	0.40b
	<i>p</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.002	<0.001	<0.001
	VR		≥4.0	15-25			1.5-2.5	≤6.25	≥0.40	0.0

Tr: tratamiento; Ct: contenedor, FV: factor de variación, RT-42: rejilla con 42 tubetes de plástico, RTa-42: rejilla con 42 tubetes de plástico con aberturas en sus paredes, D: diámetro del tallo; A: altura de la parte aérea; PSA: peso seco aéreo; PSR: peso seco radical; IR: índice de robustez; ICD: índice de calidad de Dickson, RLGE: raíces laterales gruesas envoltentes; SP: sin poda; PRQ: poda radical química; PRA: poda radical aérea; VR: valores recomendados para pinos nativos no cespitosos (Prieto y Sáenz, 2011). [†]Letras diferentes en una columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Tr: treatment; Ct: container, FV: factor of variation, RT-42: rack with 42 plastic tubes, RTa-42: rack with 42 plastic tubes with openings in their walls, D: stem diameter; A: shoot height; PSA: shoot dry weight; PSR: root dry weight; IR: index of robustness; ICD: Dickson quality index, RLGE: thick spiraling lateral roots; SP: no root pruning; PRQ: chemical root pruning; PRA: air root pruning; VR: values recommended for native pines with non-grass growth stage (Prieto and Sáenz, 2011). [†]Different letters in a column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

(2014) mencionaron que en algunos viveros forestales de Estados Unidos y Canadá, ubicados en zonas con climas extremos, predomina el uso de charolas de poliestireno porque mantienen la temperatura del sustrato más estable que las charolas de plástico, más alta en climas fríos y menos alta en climas cálidos.

También, la temperatura media de los sustratos contenidos en las cavidades de los cuatro tipos de charola (≤ 13.5 °C) pudo contribuir a reducir la liberación de los nutrientes en el fertilizante Osmocote® Plus utilizado, porque en su ficha técnica se establece que el tiempo de liberación de 8 a 9 meses es a temperatura constante de 21 °C en el sustrato, y que puede incrementar o reducir un mes, si las temperaturas son de 15 o 25 °C, respectivamente.

Aguilera *et al.* (2016) documentaron que en un vivero en el estado de Hidalgo con temperatura media de la zona igual a 15.1 °C, se produjo *Pinus montezumae* Lamb. en charolas de poliestireno con cavidades de 160 cm³, en dos sustratos (aserrín de pino y turba de musgo) combinados con 8 g L⁻¹ de tres marcas comerciales de fertilizantes de liberación controlada; a los 9.5 meses, cuando se evaluó la planta, se encontró en las esferas de Multicote® 14.6, 25.5 y 39.8% del contenido nominal de N, P y K. Este resultado permite suponer que, si las plantas de *P. patula* de nuestro estudio se hubiesen evaluado a los 10 meses, aquéllas de las charolas de plástico habrían alcanzado el diámetro mínimo recomendado de 4 mm.

La planta del tratamiento adicional T7 (RTa-42) presentó valores menores en tallas, pesos secos e índice de calidad de Dickson que la planta de los tratamientos T3 y T6 (RT-42, sin y con Cu), lo cual puede atribuirse a pérdidas mayores de agua y de fertilizantes por las aberturas en las paredes de las cavidades (tubetes) y en el sustrato se registró la temperatura promedio más baja de todos los tratamientos. Tal patrón se observó en dos estudios de producción de pinos en charolas con cavidades intercambiables de 220 cm³ y diseño para propiciar la PRA: 1) Sánchez *et al.* (2016) produjeron *Pinus oaxacana* Mirov. y *Pinus greggii* var. *australis* Donahue & López, y registraron valores promedio para tallas y pesos secos superiores en las charolas sin aberturas en sus cavidades de producción (tubetes), respecto a la planta producida en las mismas charolas con aberturas; 2) Castro *et al.* (2018) produjeron *P. greggii* var. *australis*, la cual desarrolló valores promedio para D, A, PSA y PSR, 25, 17, 28 y 38% superiores a los de la planta producida en las mismas charolas con aberturas en sus cavidades.

quality index than the plants from treatments T3 and T6 (RT-42, with and without Cu). This could be attributed to higher losses of water and fertilizers through the openings in the walls of the cavities (tubes) and to the lowest average substrate temperature of all the treatments. This pattern was observed in two studies on pine production in interchangeable 220 cm³ cavities designed for air root pruning. 1) Sánchez *et al.* (2016) produced *Pinus oaxacana* Mirov. and *Pinus greggii* var. *australis* Donahue & López and found higher average values for size and dry weights in plants grown in trays with tubes without openings than in plants grown in the same trays, but with tubes with openings in their walls. 2) Castro *et al.* (2018) produced *P. greggii* var. *australis*; the plants grown in cavities without openings in their walls had 25, 17, 28 and 38% higher average values of D, A, PSA and PSR than plants produced in the same trays with openings.

In order to reduce water and fertilizer loss from the trays designed for PRA, Landis (2005) described those techniques used in nurseries in Canada and the United States: to separate handling of trays without openings; the use of white trays at the edge of the tray tables; the increase in irrigation frequency and in fertilizer doses; and the use of controlled-release fertilizers to reduce losses by lixiviation.

Root growth potential

At the end of the test, average values of D_1 and A_1 and of monthly relative root growth (TcrmR) showed significant differences ($p \leq 0.05$) by effect of the container type. Plants produced in polystyrene (PS-77) trays without root pruning had higher values, except TcrmRt, than those grown in plastic trays (P-54 and RT-42). In TcrmR the (PS-77) tray was outstanding, but with chemical pruning. Chemical root pruning (T4, T5 and T6) had significant effect ($p \leq 0.05$) on TcrmR; plants stopped vertical growth (A_1) and emitted a larger quantity of horizontal (R_h) and total (R_t) roots, even though initial diameter (D_0) was smaller ($p \leq 0.05$) than that of plants without pruning. Plants in the set of treatments without root pruning (T1, T2 and T3) developed greater heights (A_1), diameters (D_1), and roots with vertical growth (R_v) as a consequence of the development of lateral spiraling roots over the surface of the root plug, making difficult the consequent emission of new horizontal roots (Table 4).

Para reducir la pérdida de agua y de fertilizante que se registra en las charolas con diseño para PRA, Landis (2005) describió algunas técnicas utilizadas en viveros de Canadá y Estados Unidos que incluyen: el manejo por separado de charolas sin aberturas; uso de charolas de color blanco en la periferia de las mesas porta charolas; incremento en la frecuencia de riegos y en la dosis de fertilización, uso de fertilizantes de liberación controlada para reducir pérdidas por lixiviación.

Crecimiento potencial de raíz

Al final de la prueba, los valores promedio de D_1 , A_1 y las tasas de crecimiento relativo mensual de raíz (TcrmR) mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), por efecto del tipo de contenedor; con valores superiores en la planta producida en charolas de poliestireno (PS-77) sin poda radical a las producidas en charolas de plástico (P-54 y RT-42), excepto en TcrmRt, en la cual sobresalió la misma charola, pero con la aplicación de poda química. El conjunto de tratamientos con poda radical química (T4, T5 y T6) generó un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en la TcrmR, las plantas frenaron su crecimiento en altura (A_1) y emitieron una cantidad mayor de raíces con crecimiento horizontal (R_h) y total (R_t), a pesar de que al inicio de la prueba el diámetro inicial (D_0) era menor ($p \leq 0.05$) que el de las plantas sin poda. La planta del conjunto de tratamientos sin poda radical (T1, T2 y T3) desarrolló mayores alturas (A_1), diámetros (D_1) y raíces con crecimiento vertical (R_v) como consecuencia de haber desarrollado raíces laterales envolventes sobre la superficie de los cepellones, lo cual dificultó la emisión de raíces nuevas en sentido horizontal (Cuadro 4).

Al comparar la planta del tratamiento adicional T7 (RTa-42) con poda radical aérea, con su tratamiento testigo T3 (RT-42) y con el T6 (RT-42 con Cu), se presentaron diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) en los valores promedio de las tallas finales de las plantas (D_1 y A_1) y en las TcrmR. La planta con poda radical aérea (T7) desarrolló TcrmR_h y TcrmR_t superiores a la planta del tratamiento testigo T3. La planta con poda radical química (T6) presentó TcrmR_h y TcrmR_v superiores a la planta con poda radical aérea (T7) (Cuadro 5).

En la capacidad para emitir nuevas raíces en sentido horizontal (TcrmRh) y total (TcrmRt), la planta de los tratamientos con poda radical química fue

Comparison of the additional air root pruning treatment T7 (RTa-42) with its control treatment T3 (RT-42) and with T6 (RT-42 with Cu) showed statistical differences ($p \leq 0.05$) between average values of the final plant sizes (D_1 and A_1) and in TcrmR. Plants with air root pruning (T7) developed higher TcrmR_h and TcrmR_t than T3 control plants. Plants with chemical root pruning (T6) had higher TcrmR_h and TcrmR_v than plants with air root pruning (T7) (Table 5).

Regarding capacity to emit new horizontal roots (TcrmRh) and total new roots (TcrmRt), plants with chemical root pruning were superior to plants with air root pruning. These latter, in turn were superior to that of plants without root pruning. A fact that can be attributed to chemical root pruning, which made plants was more efficient in terms of lateral root pruning, as it can be seen in Figures 2 and 3.

Results of RGP tests similar to ours were observed in other forest species produced in trays. South *et al.* (2005) evaluated RGP of *Pinus palustris* Mill. plants produced in hydroponics in polystyrene trays with and without Cu coating and in plastic trays with and without openings to favor PRA. After four weeks, the proportion of horizontal and vertical roots emitted was 36 and 64% in plants without root pruning, 78 and 22% in plants with PRQ, and 67 and 33% in plants with PRA.

Chapman and Colombo (2006) measured RGP in *P. banksiana* Lamb. grown in plastic pots. The plants were produced in three types of trays (plastic with and without openings, polystyrene with and without Cu coating, and with biodegradable cavity walls) with 46 to 60 cm³ cavities. After seven months, plants with PRQ emitted more roots and root biomass with horizontal growth, and more homogeneous distribution over all the faces of the taproot than plants produced without root pruning, which developed more roots grown downward and irregularly distributed around the taproot.

Sword *et al.* (2011) also evaluated RGP of *Pinus palustris* Mill. grown in 60, 105 and 170 cm³ polystyrene trays with and without Cu coating, and transplanted to plastic pots. After four weeks of the test, the plants with PRQ emitted on average 33 roots wider than 1 mm in diameter in the upper two thirds of the root plugs and 15 roots in the lower third of the root plugs. While plants without pruning produced 19 and 35 roots in the abovementioned thirds of the root plugs, respectively.

Cuadro 4. Comparación de medias de las variables en la prueba crecimiento potencial de raíz (CPR) a plantas (*Pinus patula*) producidas en tres tipos de charola, con poda radical química.
Table 4. Comparison of means of the variables in the test of root growth potential (RGP) in plants (*Pinus patula*) grown in three tray types with chemical root pruning.

Tr	Ct	FV	D ₀	D ₁	A ₀	A ₁	TcrmR (g g ⁻¹ mes ⁻¹)		
			(mm)		(cm)		R _h	R _v	R _t
1	P-54		4.15 ab [†]	5.67b	23.58c	32.83b	0.13c	0.16b	0.26c
2	PS-77	SP	4.25 a	6.30a	26.05ab	36.68a	0.19b	0.23a	0.36ab
3	RT-42		4.13 ab	5.71b	25.33ab	34.53ab	0.12c	0.16b	0.25c
4	P-54		4.04b	5.24c	21.90d	27.75c	0.26a	0.11c	0.34b
5	PS-77	CP	4.10ab	6.00ab	26.68a	34.90ab	0.29a	0.16b	0.40a
6	RT-42		4.11ab	5.82b	25.18b	33.00b	0.29a	0.11c	0.37ab
	<i>p</i>		<0.131	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		SP	4.18 a	5.89 a	24.98 a	34.68 a	0.15 b	0.18 a	0.29 b
		CP	4.08 b	5.69 b	24.58 a	31.88 b	0.28 a	0.13 b	0.37 a
	<i>p</i>		<0.004	<0.010	<0.177	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Tr: tratamiento; Ct: contenedor; FV: factor de variación; D₀ y D₁: diámetro inicial y final; A₀ y A₁: altura inicial y final; TcrmR: tasa de crecimiento relativo mensual de raíz; R_h, R_v y R_t: raíces con crecimiento horizontal, vertical y total; P-54: charola de plástico con 54 cavidades; PS-77: charola de poliestireno con 77 cavidades; T-42: rejilla con 42 tubetes de plástico; SP: sin poda; CP: con poda. [†]Letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (p≤0.05). ♦ Tr: treatment; Ct: container; FV: factor of variation; D₀ and D₁: initial and final diameter; A₀ and A₁: initial and final height; TcrmR: monthly relative root growth rate; R_h, R_v and R_t: roots with horizontal, vertical and total growth; P-54: plastic tray with 54 cavities; PS-77: polystyrene tray with 77 cavities; T-42: rack with 42 plastic tubes; SP: without pruning; CP: with pruning. [†]Different letters in a column indicate statistical differences (p≤0.05).

superior a la planta de los tratamientos con poda radical aérea, y ésta, a su vez, a la planta sin poda radical. Lo anterior puede atribuirse a que la poda radical química fue más eficiente en cuanto a poda de raíces laterales, como se observa en las Figuras 2 y 3.

In Mexico, RGP tests to evaluate behavior of plants with and without root pruning are still incipient. To date, only the results of a study conducted by Sánchez *et al.* (2016) with *Pinus greggii* var *australis* and *Pinus oaxacana* Mirov. plants produced in plastic

Cuadro 5. Comparación de medias de las variables consideradas en la prueba crecimiento potencial de raíz (CPR) a *Pinus patula* producido en tubetes con poda radical química y aérea.
Table 5. Comparison of means of variables considered in the root growth potential test (RGP) with *Pinus patula* produced in tubes with chemical and air root pruning.

Tr	Ct	FV	D ₀	D ₁	A ₀	A ₁	TcrmR (g g ⁻¹ mes ⁻¹)		
			(mm)		(cm)		R _h	R _v	R _t
3		SP	4.13a [†]	5.71a	25.33a	34.53a	0.12c	0.16a	0.25c
6	RT-42	PRQ	4.11a	5.82a	25.18a	33.00a	0.29a	0.11b	0.37a
7	RTa-42	PRA	3.87b	5.17b	20.65b	26.13b	0.18b	0.13ab	0.30b
	<i>p</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Tr: tratamiento; Ct: contenedor; FV: factor de variación; D₀ y D₁: diámetro inicial y final; A₀ y A₁: altura inicial y final; TcrmR: tasa de crecimiento relativo mensual de raíz; R_h, R_v y R_t: raíces con crecimiento horizontal, vertical y total; RT-42: rejilla con 42 tubetes de plástico; RTa-42: rejilla con 42 tubetes de plástico con aberturas en sus paredes; SP: sin poda, PRQ: poda radical química, PRA: poda radical aérea. [†]Letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (Tukey, p≤0.05). ♦ Tr: treatment; Ct: container; FV: factor of variation; D₀ and D₁: initial and final diameter; A₀ and A₁: initial and final height; TcrmR: monthly relative root growth rate; R_h, R_v and R_t: roots with horizontal, vertical and total growth; RTa-42: rack with 42 plastic tubes with openings in their walls; SP: without pruning; PRQ: chemical root pruning; PRA: air root pruning. [†]Different letters in a column indicate statistical differences (Tukey, p≤0.05).

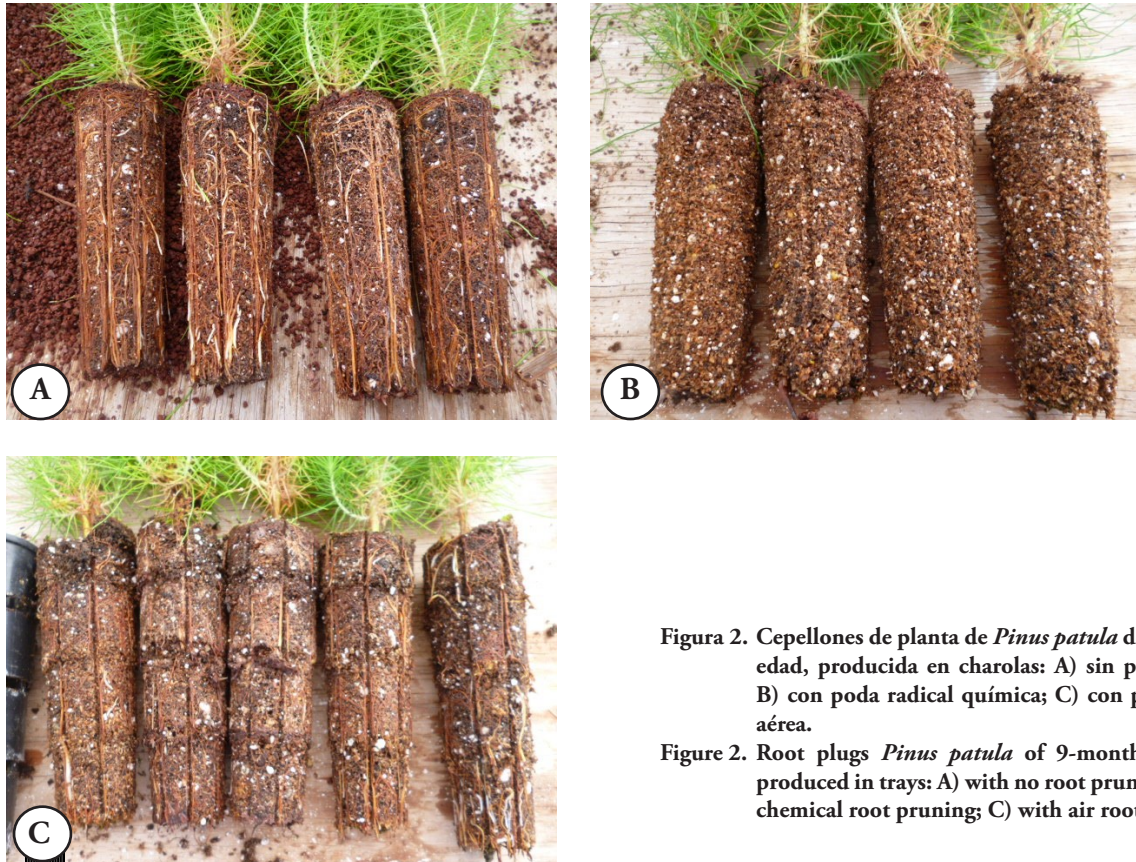


Figura 2. Cepellones de planta de *Pinus patula* de 9 meses de edad, producida en charolas: A) sin poda radical; B) con poda radical química; C) con poda radical aérea.

Figure 2. Root plugs *Pinus patula* of 9-month-old plants produced in trays: A) with no root pruning; B) with chemical root pruning; C) with air root pruning.

Resultados similares a los obtenidos en la presente prueba de CPR se observaron en otras especies forestales producidas en charolas. South *et al.* (2005) evaluaron en condiciones hidropónicas el CPR de plantas de *Pinus palustris* Mill. producidas en charolas de poliestireno, sin y con recubrimiento de Cu, y en charolas de plástico sin y con aberturas para propiciar la PRA; a las cuatro semanas, la proporción de raíces emitidas con crecimiento horizontal y vertical fue 36 y 64% en las plantas sin poda, de 78 y 22% en las plantas con PRQ y de 67 y 33% en las plantas con PRA.

Chapman y Colombo (2006) midieron el CPR de *P. banksiana* Lamb. en macetas de plástico, la cual se produjo en tres tipos de charolas (de plástico con y sin aberturas, de poliestireno con y sin recubrimiento de Cu, y con cavidades de paredes biodegradables) con cavidades de 46 a 60 cm³. A los siete meses, las plantas con PRQ emitieron cantidad mayor de raíces y biomasa radical con crecimiento horizontal y distribución más homogénea en todas las caras de la raíz principal, en comparación con las plantas sin poda

trays with 210 cm³ tubes with and without lateral openings (RT-25 and RTa-25) have been published. After growing in 10 L plastic pots for four weeks, the number of live roots longer than 1 cm was significantly higher in air-root-pruned plants than in unpruned plants: 220 and 167 roots in *P. greggii*, and 373 and 264 roots in *P. oaxacana*.

The root growth of *P. patula* observed in the RGP test can be explained with the results of other studies of growth in the field with *P. palustris* conducted by Sung and Dumroese (2013) and Sung and Haywood (2016). Those authors concurred in observing that LR of root-pruned plants have minimal barriers preventing their free growth in the field. In contrast, LR of unpruned plants form a mesh around the root plug that blocks horizontal root growth. These authors also observed that in the lower tip of the taproot (central axis), and in the LR of unpruned plants, growth form calluses or protuberances when roots reach the drainage hole and make contact with the air. In the field, those calluses generate positively geotropic roots, thus causing plants to develop more



Figura 3. Raíces nuevas emitidas por planta de *Pinus patula* durante la prueba de crecimiento potencial de raíz (1.5 meses); A) sin poda radical; B) con poda radical química; C) con poda radical aérea.

Figure 3. New roots emitted by *Pinus patula* plants during the root growth potential test (1.5 months): A) no root pruning; B) with chemical root pruning; C) with air root pruning.

que desarrollaron mayor cantidad de raíces hacia abajo y con una distribución irregular, en torno a la raíz principal.

Sword *et al.* (2011) también evaluaron en macetas de plástico el CPR de plantas de *Pinus palustris* Mill., las cuales produjeron en charolas de poliestireno de 60, 105 y 170 cm³, sin y con recubrimiento de Cu. A las cuatro semanas de prueba, las plantas con PRQ emitieron en promedio, 33 raíces mayores de 1 mm de diámetro en los dos tercios superiores del cepellón y 15 raíces en el tercio inferior del cepellón mientras que, en las plantas sin poda, el número de raíces fue de 19 y 35, respectivamente.

En México las pruebas de CPR con especies forestales para evaluar el comportamiento de la planta con y sin poda radical, son aún incipientes. A la fecha sólo se han publicado los resultados de un estudio realizado por Sánchez *et al.* (2016) con planta de *Pinus greggii* var *australis* y de *Pinus oaxacana* Mirov., las cuales se produjeron en charolas de plástico con tu-

vertical root growth and more vertical than horizontal root biomass.

CONCLUSIONS

Coating the polystyrene and plastic trays with a vinyl-acrylic solution and 7% copper hydroxide commercial formula, and 84.5% of acrylic primer efficiently pruned lateral roots, resulting in a small number of lateral spiraling roots. Plants grown in polystyrene trays had higher values in size, dry weights and Dickson quality index as a consequence of maintaining higher substrate temperature than in plastic trays in the environmental conditions of the nursery.

In the test of root growth potential, plants with chemical root pruning developed higher total monthly relative root growth and horizontal root growth compared with plants with no root pruning, which developed a higher monthly relative growth

betes de 210 cm³ sin y con aberturas laterales (RT-25 y RTa-25); después de desarrollar las plantas durante cuatro semanas en macetas de plástico de 10 L, el número de raíces vivas mayores a 1 cm de longitud fue significativamente superior en las plantas con poda radical aérea que las plantas sin poda, con 220 y 167 raíces en *P. greggii* y 373 y 264 raíces en *P. oaxacana*.

El crecimiento radical observado en *P. patula* en la prueba de CPR se explica con los resultados de otros estudios de crecimiento en campo con *P. palustris* realizados por Sung y Dumroese (2013) y Sung y Haywood (2016), quienes coincidieron en que las RL de las plantas con poda radical tienen un mínimo de barreras que les impidan crecer libres en campo. En cambio, en las plantas sin poda las RL forman una malla en torno al cepellón que bloquea el crecimiento radical en sentido horizontal. Estos autores también observaron que en el extremo inferior de la raíz principal (eje central) y en las RL de las plantas sin poda se forman callos o protuberancias cuando alcanzan el orificio de drenaje y hacen contacto con el aire. Ya en campo, de estos callos se generan raíces con geotropismo positivo, lo cual ocasiona que la planta desarrolle un número mayor de raíces y más biomasa radical en sentido vertical que horizontal.

CONCLUSIONES

La impregnación de charolas de poliestireno y de plástico con solución vinil-acrílica con 7% de hidróxido de cobre comercial y 84.5% de sellador acrílico, generó planta con poda eficiente de raíces laterales y con un número mínimo de raíces laterales envolventes. La planta obtenida en las charolas de poliestireno presentó valores mayores en tallas, pesos secos e índice de calidad de Dickson; como consecuencia de mantener la temperatura del sustrato más alta que la registrada para las charolas de plástico en las condiciones ambientales del vivero.

En la prueba de crecimiento potencial de raíz, la planta con poda radical química desarrolló mayor tasa de crecimiento relativo mensual de raíces totales y con crecimiento horizontal, en comparación con la planta sin poda radical. Esta última desarrolló mayor tasa de crecimiento relativo mensual de raíces con crecimiento vertical. El tratamiento alternativo de poda radical aérea produjo planta con tallas menores y pesos secos menores que la planta producida en el mismo tipo de charola sin aberturas. En cambio, generó menos raíces laterales envolventes y mayor tasa

rate of vertically growing roots. The alternative air root pruning treatment produced plants with smaller sizes and lower dry weights than plants produced in the same type of tray without openings. In contrast, it generated fewer spiraling lateral roots and higher monthly relative root growth rate of horizontally growing roots.

—End of the English version—

-----*-----

de crecimiento relativo mensual de raíces con sentido horizontal.

LITERATURA CITADA

- Aguilera R., M., A. Aldrete, T. Martínez T., y V. M. Ordaz C. 2016. Producción de *Pinus montezumae* Lamb. con diferentes sustratos y fertilizantes de liberación controlada. *Agrociencia* 50: 107–118.
- Castro G., S. L., A. Aldrete, J. López U., y V. M. Ordaz C. 2018. Efecto del envase, sustrato y fertilización en el crecimiento de *Pinus greggii* var. *australis* en vivero. *Agrociencia* 52: 115–127.
- Chapman, K. A., and S. J. Colombo. 2006. Early root morphology of jack pine seedlings grown in different types of container. *Scand. J. For. Res.* 21: 372–379.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2018. Información Climatológica por estado. <http://smn.cna.gob.mx/es/información-climatológica-ver-stado?estado=pue> (Consulta: marzo 2019).
- Cortina, J., R. M. Navarro y A. del Campo. 2006. Evaluación del éxito de la reintroducción de especies leñosas en ambientes mediterráneos. *In: J. Cortina, J. L. Peñuelas, J. Puértolas, R. Savé, y A. Vilagrosa. Calidad de Planta Forestal para la Restauración en Ambientes Mediterráneos. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España. pp: 151–152.*
- Dumroese, R. K., and T. D. Landis. 2015. Growing container seedlings: three considerations. *Tree Planters' Notes* 58: 58–62.
- Escobar R., R. 2012. Fase de cultivo: Endurecimiento. *In: Buamscha M., G., L. T. Contardi, R. Dumroese K., J. A. Enricci, R. Escobar R., H. E. Gonda, D. Jakobs F., T. Landis D., T. Luna., J. Mexal G., y K. Wilkinson M. Producción de Plantas en Viveros Forestales. Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico. Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires, Argentina. pp: 145–162.*
- Hernández Z., L., A. Aldrete, V. M. Ordaz C., J. López U., y M. A. López L. 2014. Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. en vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. *Agrociencia* 48: 627–637.
- Landis, T. D. 2005. Sideslit or airlit containers. *Summer Forest Nursery Notes*. 19: 17–19.

- Landis, T. D., T. Luna, and R. K. Dumroese. 2014. Containers. *In*: Landis, T. D., D. L. Haase, B. F. Daley, and R. K. Dumroese. Tropical Nursery Manual. Agriculture Handbook 732. USDA, Forest Service. Washington, DC. pp: 123-139.
- Nilsson, U., J. Luoranen, T. Kolström, G. Örlander, and P. Puttonen. 2010. Reforestation with planting in northern Europe. *Scand. J. For. Res.* 25: 283-294.
- Prieto R., J. A., y J. T. Sáenz R. 2011. Indicadores de Calidad de Planta en Viveros Forestales de la Sierra Madre Occidental. Libro Técnico Núm. 3. Campo Experimental Valle del Guadiana. Centro de Investigación Regional Norte Centro. INIFAP. Durango, Durango, México. 210 p.
- Prieto R., J. A., J. L. García R., J. C. Monárrez G., y R. E. Madrid A. 2012. Producción de Planta del Género *Pinus*. Folleto Técnico Núm. 50. Centro de Investigación Regional Norte Centro. INIFAP. Durango, Durango, México. 52 p.
- Ritchie, G. A., Landis, T. D., R. K. Dumroese, and D. L. Haase. 2010. Shredding plant quality. *In*: Landis, D. L. Haase, B. F. Daley, and R. K. Dumroese. The Container Tree Nursery Manual Vol 7: Seedling Processing, Storage, and Outplanting. Agric. Handbook 674. USDA, Forest Service, Washington, DC. pp: 18-81.
- Sánchez A., H., A. Aldrete, J. J. Vargas H., y V. M. Ordaz C. 2016. Influencia del tipo y color de envase en el desarrollo de plantas de pino en vivero. *Agrociencia* 50: 481-492.
- SAS Institute. 2002. The Statistical Analysis System (SAS) for Windows. Release version 9.0. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA:
- South, D. B., S. W. Harris, J. P. Barnett, M. J. Hains, and D. H. Gjerstad. 2005. Effect of container type and seedling size on survival and early height growth of *Pinus palustris* seedlings in Alabama, USA. *For. Ecol. Manage.* 204: 385-394.
- South, D. B., T. E. Starkey, and S.A. Enebak. 2016. Forestry nursery practice in Southern United States. *FORESTA* 1: 106-146.
- Sung, S. S., and K. R. Dumroese. 2013. Root system architecture: the invisible trait in container longleaf pine seedlings. *In*: Haase. L. D., J. R. Pinto, and K. M. Wilkinson, technical coordinators. USDA, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. RMRS-P-69: 26-31.
- Sung, S. S., and J. D. Haywood. 2016. Air lateral root pruning affects longleaf pine seedling root system morphology. *In*: Schweitzer, C. J., W. K. Clatterbuck, and C. M. Oswalt., eds. 2016. USDA, Forest Service, Southern Research Station. Gen. Tech. Rep. SRS-212: 317-322.
- Sung, S. S., R. K. Dumroese, R. J. Pinto, and S. A. Sayer. 2019. The persistence of container nursery treatments on the field performance and root system morphology of longleaf pine seedlings. *Forests* 10: 1-24.
- Sword Sayer, M. A., S. S. Sung, and J. D. Haywood. 2011. Longleaf pine root system development and seedling quality in response to copper root pruning and cavity size. *Southern J. Appl. For.* 35: 5-11.