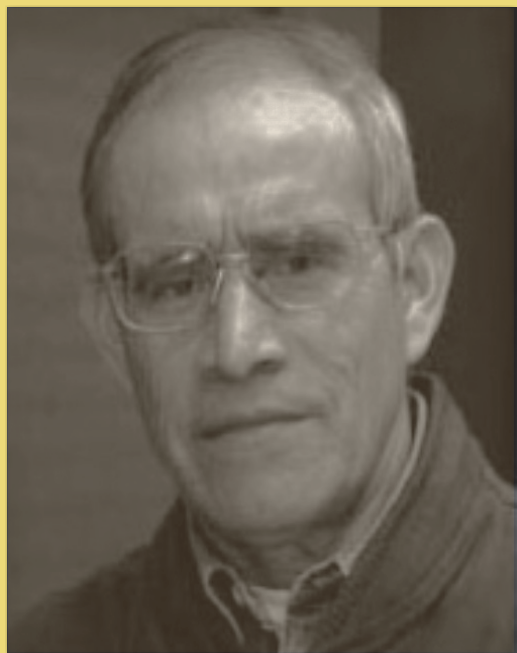


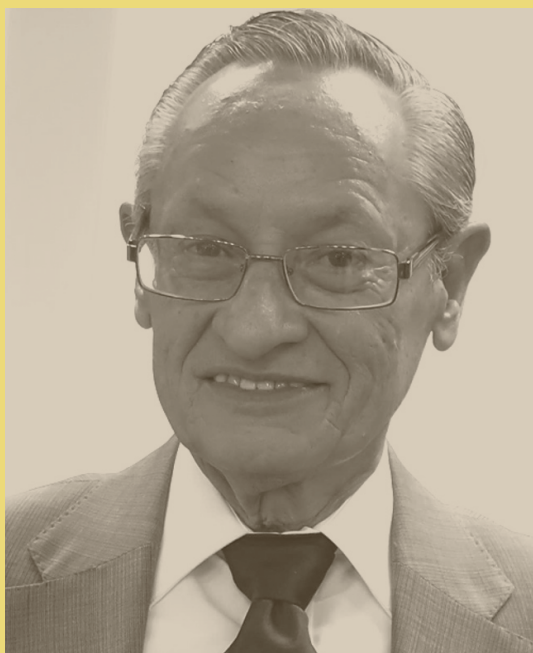
Agrociencia

Volumen 55, Número 3

1 de abril - 15 de mayo, 2021



Ph D. EDMUNDO GARCÍA MOYA
Investigador Nacional Emérito
Colegio de Postgraduados



Ph D. VÍCTOR ARTURO GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
Investigador Nacional Emérito
Colegio de Postgraduados



Ph D. DANIEL TÉLIZ ORTIZ
Investigador Nacional 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

Said Infante Gil

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 3, 1 de abril - 15 de mayo, 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. Said Infante Gil**. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo 04-2021-031913431800-203. ISSN: En trámite, 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, **30 de abril 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 (TEAL), CURRENT INDEX TO STATISTICS, AGRICULTURE AND ENVIRONMENT FOR DEVELOPING REGIONS (TROPAG), AGRICULTURAL BIOLOGY, CAB ABSTRACTS, ZOOLOGICAL RECORD, PERIODICA, RED DE REVISTAS CIENTÍFICAS DE AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE (Red ALyC) y ScieELOMéxico; puede consultarse a través de AGRIS (FAO), AGRICOLA (EE. UU.), BIOSIS (HOLANDA) y DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS (SUECIA).

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

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

Oficinas Centrales:

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Guerrero #9, Esquina Avenida Hidalgo.

56220. San Luis Huexotla. Texcoco, Estado de México

Apartado Postal 56

56230, Suc. Chapingo, Estado de México

Teléfono: 595 92 84427

agrociencia@colpos.mx

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

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

Portada: Ph D. Edmundo García Moya

Ph D. Víctor Arturo González Hernández

Ph D. Daniel Téliz Ortiz



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 55

1 de abril - 15 de mayo, 2021

Número 3

Agua-Suelo-Clima ⇌ Water-Soil-Climate

CARACTERÍSTICAS MICROMORFOLÓGICAS DE SUSTRATOS ORGÁNICOS Y SU RELACIÓN CON RETENCIÓN DE AGUA Y CRECIMIENTO RADICAL ⇌ MICROMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ORGANIC SUBSTRATES AND THEIR RELATIONSHIP WITH WATER RETENTION AND ROOT GROWTH

Salomé **Gayosso-Rodríguez**, María del Carmen **Gutiérrez Castorena**, Maximiano Antonio **Estrada Botello**, Rufo **Sánchez Hernández** 195

DÉFICIT HÍDRICO EN MAÍZ AL CONSIDERAR FENOLOGÍA, EFECTO EN RENDIMIENTO Y EFICIENCIA EN EL USO DEL AGUA ⇌ WATER DEFICIT IN MAIZE CONSIDERING PHENOLOGY, EFFECT ON YIELD AND WATER USE EFFICIENCY

Ernesto **Sifuentes-Ibarra**, Waldo **Ojeda-Bustamante**, Jaime **Macías-Cervantes**, Cándido **Mendoza-Pérez**, Pablo **Preciado-Rangel** 209

Biotecnología ⇌ Biotechnology

Bacillus licheniformis M2-7 IMPROVES GROWTH, DEVELOPMENT AND YIELD OF *Capsicum annuum* L. ⇌ *Bacillus licheniformis* M2-7 MEJORA CRECIMIENTO, DESARROLLO Y RENDIMIENTO DE *Capsicum annuum* L.

Alejandro **Bolaños-Dircio**, Jeiry **Toribio-Jiménez**, Miguel Á. **Rodríguez-Barrera**, Giovanni **Hernández-Flores**, Erubiel **Toledo-Hernández**, Francisco **Palemón-Alberto**, Yanet **Romero-Ramírez**..... 227

Ciencia de los Alimentos ⇌ Food Science

RESPUESTAS EMOCIONALES EN CONSUMIDORES DE QUESO DE ZACAZONAPAN Y PROBABILIDAD DE CONSUMO DURANTE MADURACIÓN ⇌ CONSUMER EMOTIONAL RESPONSES TO ZACAZONAPAN CHEESE AND PROBABILITY OF ACCEPTANCE DURING RIPENING

Verenice **Torres-Salas**, Arturo **Hernández-Montes** 243

Protección Vegetal ⇌ Plant Protection

EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON PATOGÉNESIS EN CHILE (*Capsicum annuum* L.) INOCULADO CON *Bacillus subtilis* Y *Meloidogyne enterolobii* ⇌ EXPRESSION OF GENES RELATED TO PATHOGENESIS IN CHILI PEPPER (*Capsicum annuum* L.) INOCULATED WITH *Bacillus subtilis* AND *Meloidogyne enterolobii*

Luis Yobani **Gayosso-Rosales**, Edgar **Villar-Luna**, María Dolores **Rodríguez-Torres**, María Valentina **Angoa-Pérez**, Hortencia Gabriela **Mena-Violante**, Carlos **Méndez-Inocencio** 261

Recursos Naturales Renovables ⇌ Natural Renewable Resources

Pinus greggii ENGELM.: RESPUESTA A LA INOCULACIÓN MICORRÍZICA CONTROLADA Y A LA FERTILIZACIÓN EN VIVERO ⇌ *Pinus greggii* ENGELM.: RESPONSE TO CONTROLLED MYCORRHIZAL INOCULATION AND FERTILIZATION IN NURSERY

Silvia **Salcido-Ruiz**, José Ángel **Prieto-Ruiz**, José Leonardo **García-Rodríguez**, Enrique **Santana-Aispuro**, Jorge Armando **Chávez-Simental** 273

CARACTERÍSTICAS MICROMORFOLÓGICAS DE SUSTRATOS ORGÁNICOS Y SU RELACIÓN CON RETENCIÓN DE AGUA Y CRECIMIENTO RADICAL

MICROMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ORGANIC SUBSTRATES AND THEIR RELATIONSHIP WITH WATER RETENTION AND ROOT GROWTH

Salomé Gayosso-Rodríguez¹, María del Carmen Gutiérrez Castorena², Maximiano Antonio Estrada Botello¹, Rufo Sánchez Hernández^{1*}

¹División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Km 25 Carretera Villahermosa-Teapa, Ra. La Huasteca 2ª Sección. Centro, Tabasco, México C.P. 86280 (rusaher@hotmail.com). ²Edafología. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, México.

RESUMEN

El estudio de la micromorfología permite comprender el funcionamiento hídrico y la respuesta fisiológica de los cultivos en un sustrato. En la investigación se evaluó el efecto de la micromorfología de mezclas de materiales orgánicos, sobre el contenido de agua y el crecimiento radical de crisantemo. La hipótesis fue que la descripción de la micromorfología de nuevas propuestas de sustratos permitiría inferir la contención, el movimiento del agua y en consecuencia el crecimiento radical. Materiales orgánicos se utilizaron como: aserrín (AP) y viruta de pino (VP), bagazo de henequén (BH), polvo de coco (PC) y un sustrato testigo (turba:Agrolita®). Siete mezclas se evaluaron plantando esquejes enraizados en contenedores con capacidad de 1250 mL. En las mezclas se determinó potencial hídrico (ψ), volumen radical (VR) y peso seco de raíces (PSR); en las hojas, el contenido relativo de agua (CRA) y el uso eficiente del agua (UEA). La micromorfología y la porosidad se caracterizaron a través de la descripción de secciones delgadas. Los resultados indicaron que la forma y distribución del tamaño de partículas, el grado de descomposición de la materia orgánica y el tipo y tamaño de poro, influyeron en la retención y el movimiento del agua en un sustrato. La mezcla de bagazo de henequén y aserrín en una relación 20:80, formó poros de empaquetamiento compuesto, de tamaños entre 50 y 500 μm y superó a la mezcla testigo en el uso eficiente del agua, sin diferencias significativas en potencial hídrico, contenido relativo de agua, volumen radical, ni peso seco de raíces. La combinación de polvo de coco y aserrín de pino formó poros de empaquetamiento compuesto y microporos <50 μm que dificultaron el movimiento del agua y afectaron el crecimiento de las

ABSTRACT

The study of micromorphology helps understanding the function of water and the physiological response of plant cultures in a substrate. This research evaluated the effect of micromorphology of mixtures of organic materials on water content and root growth of Chrysanthemum. The hypothesis was that a description of the micromorphology of proposed new substrates would help inferring water storage and movement, and consequently, root growth. Organic materials used were pine sawdust (AP), pine shavings (VP), henequen bagasse (BH), coconut coir dust (PC) and a control (peat:Agrolita™) substrate. Seven mixtures were evaluated, planting cuttings rooted in 1250 mL containers. In the mixtures, water potential (ψ), root volume (VR) and the dry weight of roots was determined (PSR); in the leaves, relative water content (CRA) and water use efficiency (UEA). The micromorphology and porosity were characterized with the description of thin sections. The results indicated that the shape and distribution of particle sizes, degree of decomposition of organic matter, type and size of pores had an influence on the water retention and movement in a substrate. The mixture of henequen bagasse and sawdust, in a ratio of 20:80 formed compound packing pores of 50 to 500 μm size, and surpassed the control mixture in water use efficiency, with no significant differences in water potential, relative water content or dry weight of roots. The combination of coconut coir dust and pine sawdust formed compound packing pores and micropores <50 μm that hindered water movement and affected root growth. In the 20PC:80VP mixture, 80% of the particles were >200 μm , with simple packing pores 80% of them with sizes between 200 and 500 μm that allow water percolation and a reduction in the water potential (ψ).

Key words: *Chrysanthemum morifolium*, organic residues, porosity, particle size, water potential.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4385-4837>

Recibido: mayo, 2020. Aprobado: marzo, 2021.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 55: 195-208. 2021.

raíces. En la mezcla 20PC:80VP el 80% de las partículas fueron $>200\ \mu\text{m}$, con poros de empaquetamiento simples con 80% de tamaños de 200 a $500\ \mu\text{m}$ que ocasionaron la percolación del agua y una disminución del (ψ) potencial hídrico.

Palabras claves: *Chrysanthemum morifolium*, residuos orgánicos, porosidad, tamaño de partículas, potencial hídrico.

INTRODUCCIÓN

Las características físicas del sustrato, influyen en el crecimiento y el desarrollo de la planta, lo que favorece la calidad (Falcón *et al.*, 2019) y el rendimiento de un cultivo (Bernal *et al.*, 2019). El sustrato tiene una parte sólida que confiere la estructura física y el espacio poroso, que contribuye a una aireación adecuada, percolación, retención y disponibilidad del agua necesaria para las plantas (Cruz-Crespo *et al.*, 2019). En general, si las proporciones de aire, agua y sólidos en el sustrato no están en las cantidades apropiadas al cultivo, las plantas pueden presentar problemas de asfixia, deshidratación, exceso o carencia de nutrimentos.

Por lo indicado anteriormente es necesario conocer las características físicas del sustrato; la forma, el tamaño, el acomodo y el empaquetamiento de las partículas en los sustratos, generan diferentes tipos de poros los cuales determinan la percolación y la retención del agua (López-Lambrano *et al.*, 2018). La capacidad de retención de agua es la característica física de mayor relevancia en el cultivo en contenedor, y de importancia vital por la cantidad de agua y nutrimentos que se aplicarán en el cultivo (Quintero *et al.*, 2011; Mascarini *et al.*, 2012).

La retención y la pérdida de agua, y como consecuencia el potencial hídrico (ψ) del sustrato, están determinados por la tortuosidad y la continuidad de los poros (Gutiérrez *et al.*, 2011; Vence *et al.*, 2013). También, tamaños de partículas de 0.25 a 1.00 mm incrementan el empaquetamiento y aumentan la capacidad de retención de agua; mientras que las partículas de tamaños mayores a 3.36 mm y superficies rugosas disminuyen esta propiedad (Anicua *et al.*, 2009; Quintero *et al.*, 2011). En relación con los poros, los de empaquetamiento complejo favorecen la retención humedad y su formación se favorece por la combinación de materiales de partículas de formas irregulares y de tamaños entre 0.25 y 1 mm (Anicua *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2011). A su vez el

INTRODUCTION

The physical characteristics of a substrate have an influence on growth and development of plants, favoring the quality (Falcón *et al.*, 2019) and yield of a crop (Bernal *et al.*, 2019). The substrate has a solid component conferring physical structure and a porous space, which contributes to the adequate aeration, and to the percolation, retention and availability of water required for the plants (Cruz-Crespo *et al.*, 2019). In general terms, if the proportions of air, water and solids in the substrate are not provided in the amounts required by the crop, plants may present problems of asphyxiation, dehydration or a lack or excess of nutrients.

Due to the aforementioned, it is necessary to know the physical characteristics of the substrate; shape, size, arrangement and the type of packing of particles in substrates produce different types of pores, which determine percolation and retention of water (López-Lambrano *et al.*, 2018). Water retention capacity is the most relevant physical characteristic in cultures grown in containers, and it is a key to the amount of water and nutrients being supplied to the culture (Quintero *et al.*, 2011; Mascarini *et al.*, 2012).

Water retention and loss, and consequently the water potential (ψ) of the substrate, are determined by tortuosity and continuity of the pores (Gutiérrez *et al.*, 2011; Vence *et al.*, 2013). In addition, particle sizes between 0.25 and 1.00 mm increase the packing and increase their capacity for water retention; whereas particle sizes bigger than 3.36 mm and with coarse surfaces reduce this property (Anicua *et al.*, 2009; Quintero *et al.*, 2011). In regard to pores, those with complex packing favor water retention. This type of pores is formed by the combination of materials with irregularly-shaped particles and sizes between 0.25 and 1 mm (Anicua *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2011). In turn, pore type and size along with water content affect the distribution, morphology and functional behavior of the root system (Basu *et al.*, 2016).

The development of plants in containers depends largely on the air-water balance and the physical characterization of substrates helps discovering their qualities and deficiencies, which cannot be modified after establishing the crop (Abad *et al.*, 2005). There are several physical analysis techniques on substrates to determine such characteristics. An analysis of

tamaño, tipo de poro y contenido de agua, afectan la distribución, la morfología y el comportamiento funcional del sistema radical (Basu *et al.*, 2016).

El desarrollo de plantas en contenedor depende en gran parte del equilibrio agua-aire, la caracterización física de los sustratos permite conocer sus cualidades y deficiencias, las cuales no pueden modificarse después del establecimiento del cultivo (Abad *et al.*, 2005). Técnicas diversas de análisis físicos en sustratos existen para determinar dichas características. El análisis de la micromorfología es una técnica para la descripción de los suelos que permite conocer el acomodo y la forma de partículas que lo componen, así como la porosidad (ϕ) resultante; se ha utilizado para caracterizar otros materiales como perlita y zeolita (Anicua *et al.*, 2009), y mezclas de fibra de coco y tezontle (Gutiérrez *et al.*, 2011). Esta técnica consiste en observar imágenes de secciones delgadas de menos de 30 mm de espesor, a través de un microscopio petrográfico, describir y cuantificar los poros y la distribución de las partículas que lo componen (Bullock *et al.*, 1985). Para comprender el movimiento o la retención del agua en un sustrato es necesario cuantificar el tipo, tamaño y continuidad de los poros y correlacionar esta información con las propiedades físicas (Anicua *et al.*, 2009; Stoops, 2018).

La mayoría de las investigaciones en sustratos utilizan variables respuesta de la planta para determinar la calidad de los materiales evaluados. No obstante, el cultivo de plantas en contenedor también requiere que los sustratos conserven la humedad disponible para la planta (Gutiérrez *et al.*, 2011). El interés por caracterizarlos surgió antes de proponerlos como una alternativa (Gayosso-Rodríguez *et al.*, 2016). Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue caracterizar la micromorfología de mezclas de residuos orgánicos, y su efecto en el contenido de agua y el crecimiento radical de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura. Bajo la hipótesis de que la descripción de la micromorfología de nuevas propuestas de sustratos permitiría inferir la contención y el movimiento del agua y en consecuencia el crecimiento radical del crisantemo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los sustratos

La evaluación en campo se realizó en el área de viveros del Instituto Tecnológico de Conkal, en el estado de Yucatán, México, en

the micromorphology is used to describe soils and learning about the arrangement and the shape of their particles, as well as the resulting porosity (ϕ); this analysis has been used to characterize other materials such as perlite and zeolite (Anicua *et al.*, 2009), as well as mixtures of coconut coir and tezontle (Gutiérrez *et al.*, 2011). This technique consists in observing images of thin sections, less than 30 mm thick, through a petrographic microscope, describing and quantifying the pores and the distribution of their particles (Bullock *et al.*, 1985). To understand water movement or retention in a substrate, type, size and continuity of its pores have to be quantified, and this information should be correlated with the physical properties (Anicua *et al.*, 2009; Stoops, 2018).

Most researches on substrates use plant response variables to determine the quality of the materials evaluated. Nevertheless, planting in containers also requires that the substrates retain water available for the plant (Gutiérrez *et al.*, 2011). The interest in characterizing them began before proposing them as an alternative (Gayosso-Rodríguez *et al.*, 2016). Therefore, the aim of this study was to characterize the morphology of mixtures of organic residues and their effect on water content and root growth of *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura. Under the hypothesis that describing the micromorphology of new proposed substrates would help to infer water movement and retention and consequently, root growth of *Chrysanthemum*.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the substrates

The field evaluation was carried out in the area of nurseries of the Instituto Tecnológico de Conkal, in the state of Yucatán, Mexico, between December 2016 and March 2017. Sample preparation and images descriptions of thin sections were done in the facilities of Edafología postgraduate program under Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, México.

For the selection of materials, we chose the ones which were available and easy to access in Yucatán, Mexico, such as pine sawdust (AP), pine shavings (VP) and henequen bagasse (BH). All materials were gathered in their raw state, without composting. Coconut coir dust (PC) was also used, along with a control substrate (peat:Agrolite™ 80:20 v/v). Based on the individual granulometry reported by Gayosso *et al.*, (2018a), a calculation was done using the percentage of particle size in each material to form size combinations where approximately

el período de diciembre 2016 a marzo 2017. La preparación de las muestras y la descripción de imágenes de las secciones delgadas se realizaron en las instalaciones del postgrado de Edafología en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo, en Texcoco, México.

En la selección de los materiales se eligieron aquellos disponibles y de fácil acceso en Yucatán, México: aserrín de pino (AP), viruta de pino (VP) y bagazo de henequén (BH). Todos los materiales se colectaron crudos sin proceso de compostaje. También se utilizó polvo de coco (PC) y un sustrato testigo (turba:agrolita 80:20 v/v). Con base en la granulometría individual reportada por Gayosso *et al.*, (2018a), se realizó un cálculo con el porcentaje del tamaño de partículas que contenía cada material para formar combinaciones con tamaños aproximados a 20% de partículas menores a 0.5 mm y el resto de las partículas con tamaños entre 0.5 y 4.76 mm. Las mezclas resultantes fueron seis combinaciones, y la mezcla utilizada por los productores de plantas de ornato en el área local, se usó como testigo (Cuadro 1). Las mezclas se formularon en una relación volumen por volumen (v/v).

Establecimiento y manejo del cultivo

Las mezclas se envasaron en contenedores con capacidad de 1250 mL (6" diámetro) y se establecieron cuatro esquejes de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura) de 45 d enraizados previamente en Agrolita® y material vegetativo proveniente del vivero "Lolpakal" de Mérida, Yucatán. El pinchado de los esquejes se realizó a los ocho días después del trasplante (DDT). Durante los primeros 15 d del cultivo se fertilizó con 1 g L⁻¹ de NPK (19-19-19) y luego se aumentó a 2 g L⁻¹. A partir de los 70 DDT se aplicaron 25 mg L⁻¹ de NPK (11-52-00) y 100 mg L⁻¹ de NPK (13-0-46). La solución se ajustó a un pH de 6.3. Las plantas se cultivaron en un invernadero tipo túnel con ventana cenital y plástico blanco con 25% de sombra. La luz natural dentro del invernadero fue de 12 h, a los 30 DDT se colocaron focos

20% of particles were smaller than 0.5 mm and the remaining particles of 0.5 to 4.76 mm size. The resulting mixtures were six combinations; the mixture used by local producers of ornamental plants in the area was used as a control (Table 1). The mixtures were formulated in a volume to volume ratio (v/v).

Crop establishment and management

The mixtures filled in 1250 mL (6" diameter) containers, and four 45 days-old *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura cuttings were established, previously rooted in Agrolita™ and vegetative material from the "Lolpakal" nursery in Mérida, Yucatan. The cuttings were pierced eight days after transplanting (DAT). During the first 15 d, the crop was fertilized with 1 g L⁻¹ of NPK (19-19-19), this dose was then increased to 2 g L⁻¹. Starting at 70 DAT, 25 mg L⁻¹ of NPK (11-52-00) began to be applied, along with 100 mg L⁻¹ of NPK (13-0-46). The solution was adjusted to a pH of 6.3. The plants were grown in a greenhouse made with a white tunnel Poly cover with roof window and 25% shade. Natural light inside the greenhouse lasted 12 h, and at 30 DAT, incandescent lights (100 W) were placed inside for 4 h in order to complete a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, until plants reached 40 cm height. After that point, a shade mesh 70% was placed to induce flowering. During the first 40 DAT, the plants were irrigated with 220 mL of water every third day, and afterwards they were irrigated twice a day.

Variables evaluated in the substrate

Micromorphological description

After 105 d of plant growth, three samples of substrate-roots were taken per plant with the use of metal cylinders, each one 8 cm height and 7 cm in diameter. Branches and leaves of

Cuadro 1. Proporción de materiales orgánicos utilizados en la preparación de mezclas para su evaluación como sustratos agrícolas.

Table 1. Proportion of materials used in the preparation of mixtures for their evaluation as agricultural substrates.

Mezclas	Proporción de materiales orgánicos (v/v)	Nomenclatura
M1	20 bagazo de henequén:80 aserrín de pino	20BH:80AP
M2	30 bagazo de henequén:70 viruta de pino	30BH:70VP
M3	20 polvo de coco:80 aserrín de pino	20PC:80AP
M4	20 polvo de coco:80 viruta de pino	20PC:80VP
M5	20 polvo de coco:40 aserrín de pino:40 viruta de pino	20PC:40AP:40VP
M6	20 bagazo de henequén:40 aserrín de pino:40 viruta de pino	20BH:40AP:40VP
M7	80 turba:20 agrolita	80T:20A

de luz incandescente (100 W) durante 4 h para completar un fotoperiodo de 16 h luz y ocho de oscuridad, hasta que las plantas alcanzaron 40 cm de altura. Después, se colocó una malla de 70% de sombra para inducir la floración. Durante los primeros 40 DDT las plantas se regaron con 220 mL de agua cada tercer día y posteriormente se suministraron dos riegos al día.

Variables evaluadas en el sustrato

Descripción micromorfológica

A los 105 d de crecimiento de las plantas se colectaron tres muestras por tratamiento de sustrato-raíces con el uso de cilindros metálicos de 8 cm de alto por 7 cm de diámetro. La parte área de la planta se eliminó y se introdujeron los cilindros en forma vertical al contenedor con cuidado para no alterar la muestra; se secaron al aire (intemperie) y luego, se impregnaron con resina poliéster insaturada y monómero de estireno en una relación 7:3 (Anicua *et al.*, 2009). Las secciones delgadas (5 × 7.5 cm) se elaboraron con el método de Murphy (1986) el cual consiste en cortar los cilindros impregnados con un disco de punta de diamante y pulir hasta 30 µm de espesor con abrasivos de carburo de silicio (carborondum) y óxido de aluminio (aloxita) de granulometría diferente.

En cada sección delgada se capturaron seis imágenes de manera aleatoria con una cámara Canon® EOS Rebel T3 montada en un microscopio petrográfico marca Olympus® BX51. Las imágenes se capturaron con el objetivo 2x y dos fuentes de luz: polarizada plana (LPP) y polarizada cruzada (LPC). Después, las imágenes se procesaron con el programa Image-Pro Plus v. 5.0 y se cuantificó el espacio poroso y el tamaño de las partículas; se describieron forma, distribución y poros entre partículas, de acuerdo con la terminología propuesta por Bullock *et al.* (1985).

Potencial hídrico (ψ)

Esta variable se determinó cada 15 d durante el período de cultivo. Las lecturas se tomaron en los sustratos con un medidor de potencia de punto de rocío Modelo WP4-T v.5, en una profundidad de 0.5 cm desde la superficie a las 07:00 h. Las lecturas se expresan en Megapascals (MPa).

Variables evaluadas en las plantas

Contenido relativo de agua (CRA)

Este contenido se calculó por diferencia de peso del agua contenida en hojas a los 105 DDT. Tres hojas por contenedor se tomaron, hojas maduras de la parte media de la planta y se pesaron en fresco (P_{Fr}). Después, se saturaron en agua destilada por

plants was removed and cylinders were introduced vertically into containers carefully in order to avoid altering the sample. They were dried out in the open air and impregnated with unsaturated polyester resin and styrene monomer in a 7:3 ratio (Anicua *et al.*, 2009). Thin sections (5 × 7.5 cm) were created using Murphy's method (1986), which consists in cutting the impregnated cylinders with a diamond tip disc cutting machine and polishing un to 30 µm in thickness with silicon carbide (carborondum) and aluminium oxide (aloxite) abrasives with different grain size.

In each thin section, six images were taken at random using a Canon® EOS Rebel T3 camera mounted on an Olympus® BX51 petrographic microscope. The images were captured using a 2x lens and two light sources: flat polarized (LPP) and crossed polarized (LPC). The images were then processed using the program Image-Pro Plus v. 5.0 and the porous space and particle size were quantified; shape, distribution and pores between particles were described following the terminology proposed by Bullock *et al.* (1985).

Water potential (ψ)

This variable was determined every 15 d during growing period. Readings were taken in the substrates with a Model WP4-T v.5 dew point potentiometer, at a depth of 0.5 cm from the surface at 07:00 h. Readings are expressed in Megapascal units (MPa).

Variables evaluated in the plants

Relative water content (CRA)

This was calculated with the difference of the weight of water contained in the leaves at 105 DAT. Three mature leaves per container were taken from the middle section of the plant and weighed while fresh (P_{Fr}). They were later saturated in distilled water for 24 h, weighed again (P_{sa}) and finally dried at 60 °C for 72 h (P_{se}). Calculations were carried out using the following formula:

$$CRA (\%) = \left(\frac{P_{Fr} - P_{Se}}{P_{sa} - P_{Se}} \right) \times 100$$

Water use efficiency (UEA)

The UEA was measured with a LICOR brand infrared gas analyzer (IRGA), model 6400xt on flowering plants 105 DAT.

Volume of roots (VR) and dry weight of roots (PSR)

These variables were determined in 105 d old plants in the greenhouse. For this purpose, a destructive sampling was

24 h se pesaron nuevamente (Psa) y al final, se secaron a 60 °C por 72 h (Pse). El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$CRA(\%) = \left(\frac{P_{Fr} - P_{Se}}{P_{Sa} - P_{Se}} \right) \times 100$$

Uso eficiente del agua (UEA)

El UEA se midió con un analizador infrarrojo de gases (IRGA) marca LICOR modelo 6400xt en plantas en floración a los 105 DDT.

Volumen de raíces (VR) y peso seco de raíces (PSR)

Estas variables se determinaron en plantas con 105 d de cultivo en invernadero. Para ello, se realizó un muestreo destructivo con las plantas de tres contenedores. Para determinar el VR se eliminó la parte aérea de la planta, se lavaron las raíces con agua corriente y el volumen se aproximó por el principio de desplazamiento de Arquímedes. El PSR se determinó después de secar las raíces lavadas en el paso previo, en una estufa de aire forzado marca FELISA por 72 h a 70 °C hasta alcanzar peso constante.

Análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño experimental de bloques completos al azar. Cada tratamiento con 10 repeticiones, un contenedor con cuatro esquejes como unidad experimental. Con los datos obtenidos se realizó un ANDEVA y una prueba de comparación de medias (Tukey; $p \leq 0.05$). Los datos en porcentajes se normalizaron con la raíz cuadrada del arcoseno. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Statistics Six Sigma, v.7 (StatSoft Inc., 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las microfotografías se observó a las partículas de AP y VP en colores de perla a gris y el BH y el PC en coloraciones pardo oscuras. Los materiales sin descomponer presentaron una birrefringencia alta, con colores de interferencia blancos de primer orden. Mientras que los amorfos se observaron en coloración pardo-oscura, característica de la materia orgánica con diferentes grados de descomposición (Bullock *et al.*, 1985; Markoska *et al.*, 2018) (Figura 1).

Los poros formados en las mezclas evaluadas, fueron poros de empaquetamiento compuesto a excepción de M4 con poros de empaquetamiento simple (Figura 2). Los poros de empaquetamiento compuesto,

carried out with the plants from three containers. As it was said, to determine the VR, branches and leaves of the plant were eliminated, the roots were washed with tap water and the volume was estimated using the Archimedes displacement principle. The PSR was determined after drying the roots that had been washed in the previous step, using a FELISA brand forced air oven for 72 h at 70 °C until a constant weight was reached.

Statistical analyses

The experiment was established as an experimental design of completely random blocks, and each treatment had 10 replications; a container with four cuttings as an experimental unit. An ANOVA was carried out with the data obtained and a test of multiple means comparison (Tukey; $p \leq 0.05$). The data in percentages were normalized with the square root of the arcsine. The statistical analysis was carried out with the statistical package Statistics Six Sigma, v.7 (StatSoft Inc., 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

The AP and VP particles were shown in the microphotographs in pearl to grey colours, and the BH and PC, in dark brown colours. The undecomposed materials displayed a high birefringence, with white interference colours of first order. Meanwhile, the amorphous particles were dark-brown colours, characteristic of organic matter with different degrees of decomposition (Bullock *et al.*, 1985; Markoska *et al.*, 2018) (Figure 1).

The pores formed in the evaluated mixtures were compound packing pores, with the exception of M4, with simple packing pores (Figure 2). Compound packing pores have a greater water retention (Gutiérrez *et al.*, 2011) and simple ones occur among single grains, without aggregates, where water moves with greater ease (Bullock *et al.*, 1985). The combination of particles with different shapes and sizes favoured the formation of heterogeneous pores, which contributed to the retention of water in the substrate (Gutiérrez *et al.*, 2011). Intra- and inter- particle pores are related to capillarity and have an influence on the retention forces of water (Vence *et al.*, 2013). Water containment and movement are determined by factors such as size, tortuosity and continuity of substrate pores (Quintero *et al.*, 2011; López-Lambraño *et al.*, 2018).

Regarding particle shape, they were irregular, sub-angled and coarse. In addition, the acute-planar

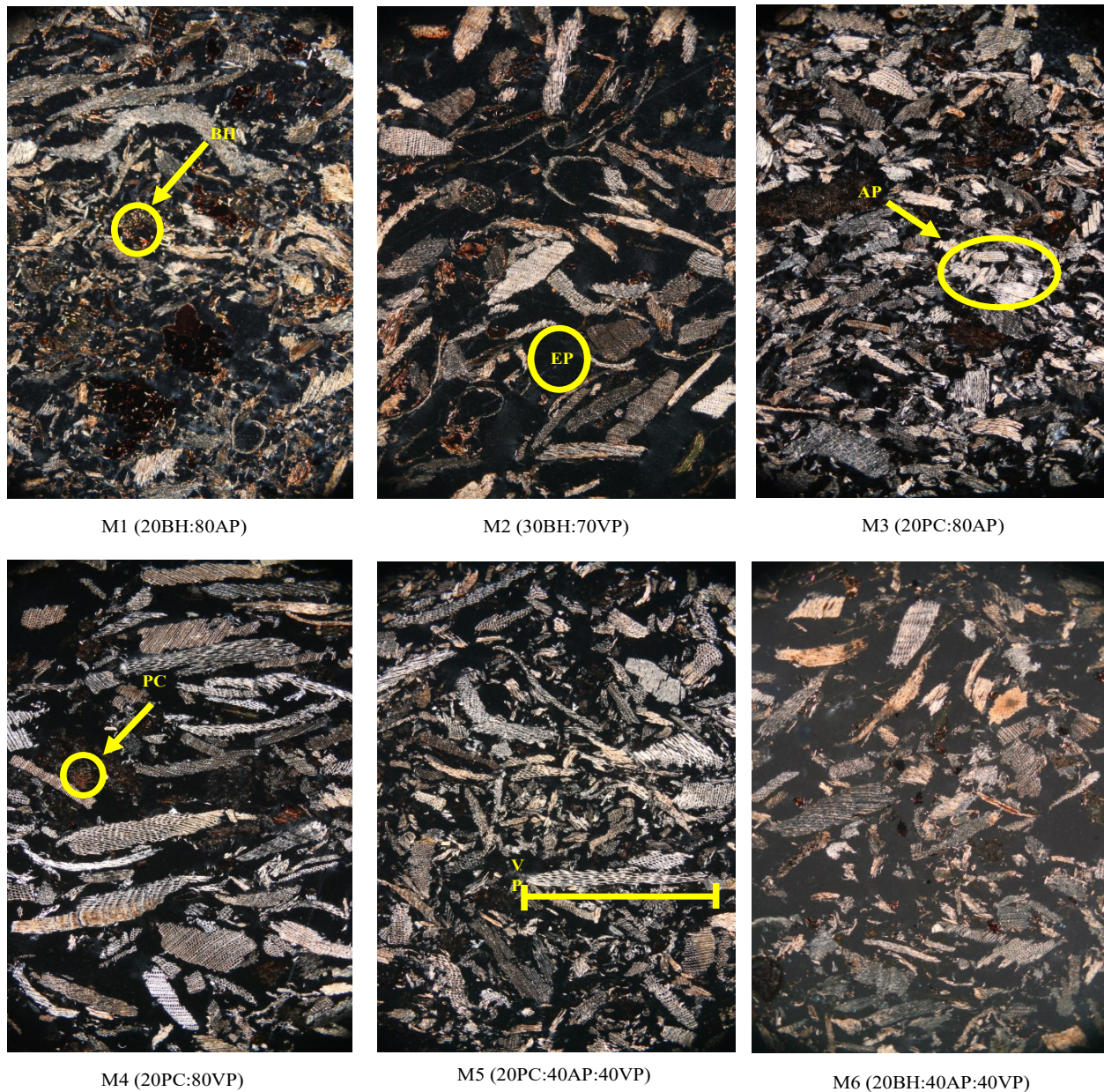


Figura 1. Microfotografías con luz polarizada cruzada de mezclas de bagazo de henequén (BH) o polvo de coco (PC), con aserrín de pino (AP) o viruta de pino (VP) en proporciones diferentes. El espacio poroso de color negro (EP) y los residuos de tejidos mostraron una brillantez alta.

Figure 1. Microphotographs with crossed polarized light of mixtures of henequen bagasse (BH) or coconut coir dust (PC), with pine sawdust (AP) or pine shavings (VP) in different proportions. The black porous space (EP) and tissue residues showed high brilliance.

tiene mayor capacidad de retención de agua (Gutiérrez *et al.*, 2011), y los de empaquetamiento simple ocurren entre granos simples sin agregados donde el agua se mueve con facilidad mayor (Bullock *et al.*, 1985). La combinación de partículas con formas y tamaños diferentes favorecieron la formación de

shape predominated, corresponding to pine shavings (Figure 3). The AP particle was laminar angular-rugged and the particles of the PC were wavy sub-round, whereas the BH particles were lenticular-vermiform and rugged. The complex shapes of the BH indicated a greater water retention capacity,

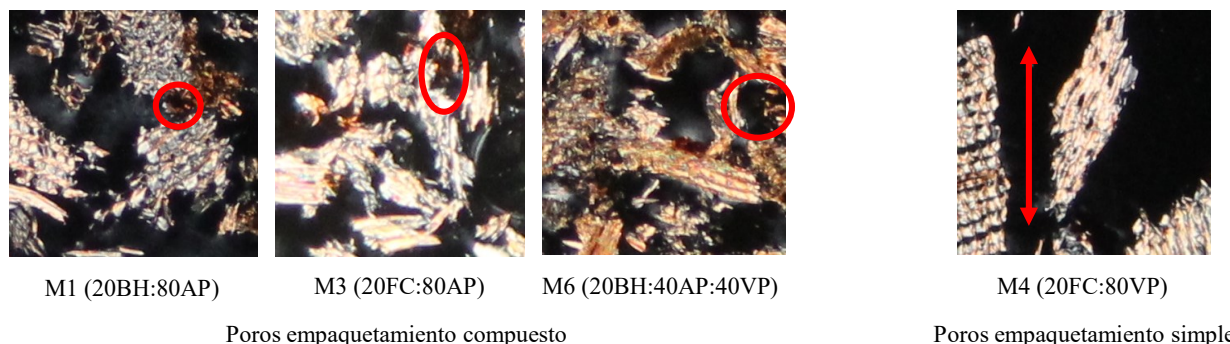


Figura 2. Poros de empaquetamiento compuesto y poros de empaquetamiento simple en mezclas de bagazo de henequén (BH) o polvo de coco (PC), con aserrín de pino (AP) o viruta de pino (VP) en proporciones diferentes.

Figure 2. Compound and simple packing pores in mixtures of henequen bagasse (BH) or coconut coir dust (PC), with pine sawdust (AP) or pine shavings (VP) in different proportions.

poros heterogéneos, que contribuyeron a la retención del agua en el sustrato (Gutiérrez *et al.*, 2011). Los poros intra e inter partículas se asocian con la capilaridad e influyen en las fuerzas de retención del agua (Vence *et al.*, 2013). La contención y el movimiento del agua están determinados por factores como el tamaño, la tortuosidad y la continuidad de los poros del sustrato (Quintero *et al.*, 2011; López-Lambrano *et al.*, 2018).

Respecto a la forma de las partículas, estas fueron irregulares, subangulares y rugosas, predominó la forma acicular-planar correspondiente a la viruta de pino (Figura 3). La partícula del AP fue laminar angular-rugosa y las partículas del PC de forma ondulada sub-redonda; mientras que la forma de las partículas del BH fueron lenticular vermiforme y rugosa. Las formas complejas del BH señalan mayor capacidad para retener agua, al combinarse con partículas de otras formas y tamaños favoreció la formación de poros heterogéneos. Además, el grado de descomposición del material facilitó la adhesión del agua a la partícula (Schindler *et al.*, 2016).

En la mezcla M4 se observó un arrastre de partículas de PC hacia el fondo del contenedor como resultado de la forma y el tamaño de las partículas predominantes en la mezcla ($>200\ \mu\text{m}$) (Cuadro 2); la formación de poros mayores a $200\ \mu\text{m}$ (80%) favorece la percolación del agua. Por otra parte, no se formaron microporos ($<50\ \mu\text{m}$) que favorecen la adhesión del agua a las partículas y el movimiento del agua en el sustrato por capilaridad (Vence *et al.*, 2013). Al respecto, Martínez y Roca (2011)

that combined with particles of other shapes and sizes, and favoured the formation of heterogeneous pores. Additionally, the degree of decomposition of materials promoted the adhesion of water to the particle (Schindler *et al.*, 2016).

Mixture M4 displayed a dragging of PC particles to the bottom of the container as a result of the shape and size of those predominant particles in the mixture ($>200\ \mu\text{m}$) (Table 2); the formation of pores larger than $200\ \mu\text{m}$ (80%) favours water percolation. On the other hand, there was no formation of micropores ($<50\ \mu\text{m}$) that favour the adhesion of water to the particles and the movement of water in the substrate due to capillarity (Vence *et al.*, 2013). In this regard, Martínez and Roca (2011) mentioned that pores larger than $400\ \mu\text{m}$ favour the drainage, infiltration and aeration, whereas pores between 30 and $300\ \mu\text{m}$ provide a balance to the air-water ratio (Abad *et al.*, 2005). This was the size interval in which pores of mixtures M1 and M6 ranged.

The sizes and shapes of the PC particle in mixtures M3 and M5 favoured the formation of 97 and 70% of pores smaller than $200\ \mu\text{m}$, respectively (Table 2). Both mixtures had the lowest total porosity and micropores formation that hindered water movement because, as particles are smaller, pores are smaller and substrate compaction is greater (Anicua *et al.*, 2009). The physical properties of porosity and water retention in a substrate vary with the proportion of the materials and their particle size (Gutiérrez *et al.*, 2011). The combination of coconut coir dust with particles of other sizes decreased total porosity

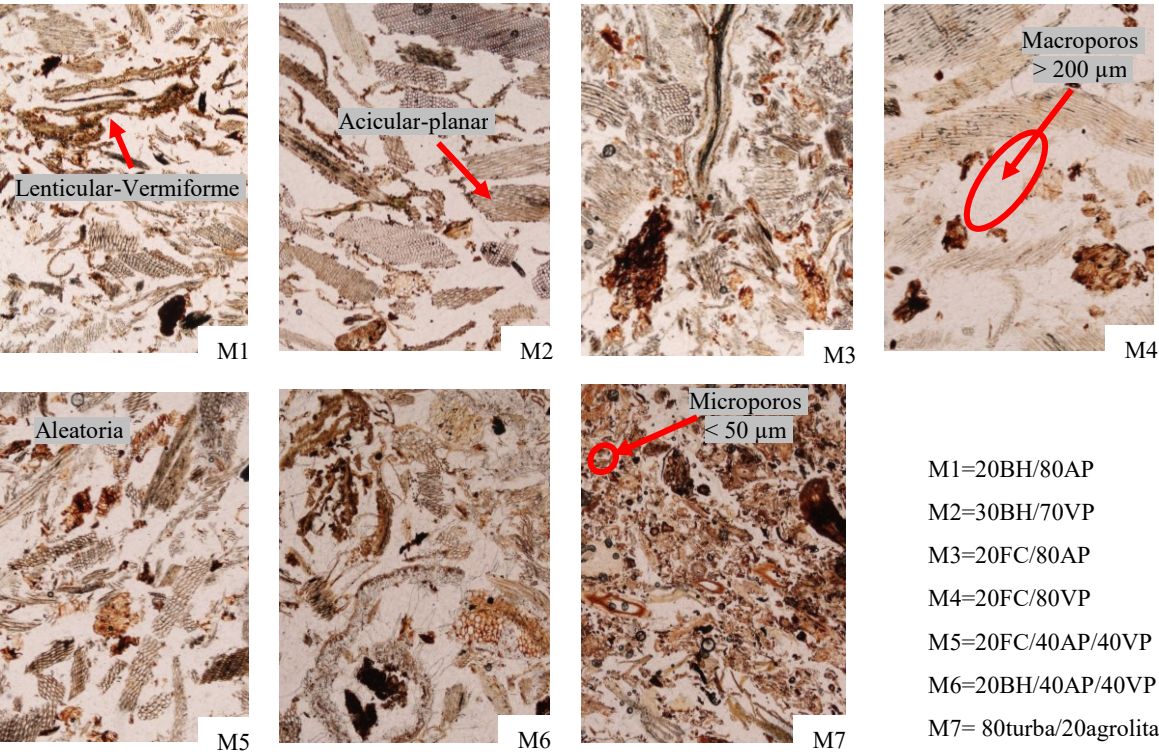


Figura 3. Formas de partículas y tamaños de poros de mezclas de bagazo de henequén (BH) o polvo de coco (PC), con aserrín de pino (AP) o viruta de pino (VP) en proporciones diferentes. Distribución aleatoria de partículas en todas las imágenes.
Figure 3. Shapes of particles and sizes of pores in mixtures of henequen bagasse (BH) or coconut coir dust (PC), with pine sawdust (AP) or pine shavings (VP) in different proportions. Random distribution of particles in all images.

Cuadro 2. Porcentajes de porosidad total (Φ), tamaños de poros y tamaños de partículas de mezclas de bagazo de henequén (BH) o polvo de coco (PC) con aserrín de pino (AP) o viruta de pino (VP) en proporciones diferentes.
Table 2. Percentages of total porosity (Φ), sizes of pores and sizes of particles of mixtures of henequen bagasse (BH) or coconut coir dust (PC) with pine sawdust (AP) or pine shavings (VP) in different proportions.

Variable	Unidad	Mezclas						
Φ	(%)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
		54	60	50	59	51	62	66
Porcentaje de distribución de poros								
< 50 μm	(%)	0	0	12	0	20	0	80
50-200 μm		70	10	85	20	50	15	10
200-500 μm		30	40	3	80	25	75	10
500-2000 μm		0	50	0	0	5	10	0
Porcentaje de tamaño de partículas (μm)								
< 50 μm	(%)	5	0	20	5	0	5	60
50-200 μm		10	20	30	10	60	20	40
200-500 μm		85	70	50	75	40	70	0
500-2000 μm		0	10	0	10	0	5	0

M1=20BH:80AP, M2=30BH:70VP, M3=20FC:80AP, M4=20PC:80VP, M5=20PC:40AP:40VP); M6=20BH:40AP:40VP y M7= 80turba:20agrolita.

mencionaron que poros mayores a $400\ \mu\text{m}$ favorecen el drenaje, la infiltración y la aireación; mientras que poros entre 30 y $300\ \mu\text{m}$ confieren un equilibrio a la relación aire-agua (Abad *et al.*, 2005), este fue el intervalo de tamaño en el cual oscilaron los poros de las mezclas M1 y M6.

Los tamaños y la forma de la partícula de PC en las mezclas M3 y M5, favorecieron respectivamente la formación de 97 y 70% de poros de tamaños menores a $200\ \mu\text{m}$ (Cuadro 2). Ambas mezclas con la porosidad total menor y formación de microporos que dificultaron el movimiento del agua; porque mientras menor es el tamaño de partícula, el tamaño de poro es menor y la compactación mayor (Anicua *et al.*, 2009). Las propiedades físicas de porosidad y retención de humedad en un sustrato varían en función de la proporción de los materiales y el tamaño de las partículas (Gutierrez *et al.*, 2011). La combinación de polvo de coco con otros tamaños de partícula, disminuyó la porosidad total (Gayosso *et al.*, 2018b), redujo el espacio ocupado por aire y favoreció la formación de microporos (García y Testezlaf, 2014). Aunque los microporos se relacionan con la retención de agua, es posible que el método de aplicación de riego usado en este estudio no permitió el movimiento del agua y causó escurrimientos hacia las paredes del contenedor, lo cual evitó el movimiento del agua entre partículas.

La porosidad de la mezcla testigo M7 fue superior al resto de las mezclas porque la partícula de agrolita tiene poros de tamaño grande. Al respecto, Anicua *et al.* (2009) registraron que tamaños de partículas de agrolita mayores a 3.36 mm permitieron hasta 40.9% de capacidad de aireación. La combinación de materiales orgánicos con materiales inertes de porosidad interna, aumenta la porosidad para aireación y disminuye la retención de agua (Wisdom *et al.*, 2017).

Las mezclas M1 y M2 fueron superiores ($p \leq 0.05$) en el uso eficiente del agua (UEA), mientras que la mezcla M5 mostró el volumen menor de raíces (Cuadro 3). A mayor retención de agua en el sustrato, mayores son el potencial hídrico y el crecimiento de raíces (Lipiec *et al.*, 2013). El estrés hídrico reflejado en el UEA pudo ocasionar crecimiento menor de las raíces porque de acuerdo con Lopes *et al.* (2013), el cierre de estomas reduce la turgencia de las hojas y limita la entrada del CO_2 para el proceso de fotosíntesis. Por lo tanto, se reduce la producción de

(Gayosso *et al.*, 2018b), reduced the space occupied by air, and favoured the formation of micropores (García and Testezlaf, 2014). Although the micropores relate to water retention, the irrigation method used in this study did not allow water movement and caused leakages towards the walls of containers, which hindered water movement among particles.

The porosity of control mixture M7 was greater than in the rest of the mixes, because the Agrolita particle has large pores. In this regard, Anicua *et al.* (2009) recorded that Agrolita particles larger than 3.36 mm allowed a capacity of aeration up to 40.9%. The combination of organic materials with inert porous materials increases porosity for aeration and reduces water retention (Wisdom *et al.*, 2017).

Mixtures M1 and M2 displayed a higher ($p \leq 0.05$) water use efficiency (UEA), whereas mixture M5 attained the lowest root volume (Table 3). The greater the water retention in substrate, the greater the water potential and root growth (Lipiec *et al.*, 2013). The water stress reflected in UEA may have caused a reduced growth in roots because, according to Lopes *et al.* (2013), the closing of stomata reduces leaves turgidity, thus limiting CO_2 intake for the photosynthesis. Therefore, production of important carbohydrates to form new plant structures is reduced.

In water potential (ψ), there was no significant difference among mixtures M1 (-0.67 MPa), M2 (-0.71 MPa), M3 (-1.14) and M6 (-0.77 MPa) (Figure 4). Water movement in a substrate-plant system depends partly on the water potential. Water moves from areas with a higher potential to areas with a lower potential (Vence *et al.*, 2013). In our study, this indicates that these mixtures retained water, which is a fundamental physical characteristic of the substrates used in horticulture (Abad *et al.*, 2005). On the other hand, M4 displayed the lowest ψ (-4.79 MPa), since the size of its particles and pores ($>200\ \mu\text{m}$) caused water percolation and the gravimetric potential caused deficit in water potential (Vence *et al.*, 2013).

Root growth was found towards the container walls in mixtures M3 and M5 (Figure 5); both mixtures had a total porosity of 50 and 51% and a pore size $< 50\ \mu\text{m}$. These characteristics made water movement difficult through these substrates. This occurs because water content and pore size of

Cuadro 3. Contenido relativo de agua (CRA), uso eficiente de agua (UEA), volumen (VR) y peso seco de raíces (PSR) de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura, cultivado en diferentes mezclas de bagazo de henequén (BH) o polvo de coco (PC), con aserrín de pino (AP) o viruta de pino (VP) o ambos materiales en proporciones distintas.

Table 3. Relative water content (CRA), water use efficiency (UEA), root volume (VR) and dry weight of roots (PSR) in *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura, grown in different mixtures of henequen bagasse (BH) or coconut coir dust (PC), with pine sawdust (AP) or pine shavings (VP) or both materials in different proportions.

Mezclas	CRA (%)	UEA ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)	VR (mL)	PSR (g)
M1 (20BH:80AP)	71 a	2.99 a	131 ab	15.6 ab
M2 (30BH:70VP)	69.1 a	2.88 ab	135 ab	16.8 a
M3 (20PC:80AP)	66.9 a	2.75 b	134 ab	15.4 ab
M4 (20PC:80VP)	61.3 a	2.55 c	110 bc	12.9 ab
M5 (20PC:40AP:40VP)	68.4 a	2.41 cd	99 c	12 b
M6 (20BH:40AP:40VP)	72 a	2.48 c	141 a	17.1 a
M7 (80T:20A)	65.6 a	2.18 e	106 bc	12 b

Literales diferentes en una columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ Different letters in a column indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

carbohidratos importantes para la formación de nuevas estructuras de la planta.

En el potencial hídrico (ψ), no hubo diferencias significativas entre las mezclas M1 (-0.67 MPa), M2 (-0.71 MPa), M3 (-1.14) y M6 (-0.77 MPa) (Figura 4). El movimiento del agua en un sistema sustrato-planta depende en parte del potencial hídrico y el agua se mueve de áreas con potencial mayor a las de potencial menor (Vence *et al.*, 2013). Esto indica en nuestro estudio que esas mezclas retuvieron el agua, característica física fundamental en los sustratos utilizados en horticultura (Abad *et al.*, 2005). Por el contrario, M4 mostró el ψ menor (-4.79 MPa) debido a que el tamaño de sus partículas y poros ($>200 \mu\text{m}$) causaron la percolación del agua y el potencial gravimétrico generó un déficit en el potencial hídrico (Vence *et al.*, 2013).

El crecimiento de las raíces se observó hacia las paredes del contenedor en las mezclas M3 y M5 (Figura 5); ambas mezclas tuvieron una porosidad total de 50 y 51% y tamaños de poros $<50 \mu\text{m}$. Estas características dificultaron el movimiento del agua en el sustrato porque el contenido de agua y el tamaño de los poros en un sustrato son las principales fuentes de variación en la distribución y el comportamiento de las raíces (Basu *et al.*, 2016).

a substrate are the main sources of variation in the distribution and behaviour of the roots (Basu *et al.*, 2016).

CONCLUSIONS

The combination of particle shapes and sizes, along with type and size of pores, determined water content and consequently, root growth. Particles in the mixture of henequen bagasse with pine sawdust, in a 20:80 ratio, produced compound packing pores and a greater water use efficiency, as well as a greater root volume and dry weight than the mixture 80peat:20Agrolita™.

The combination of coconut coir dust and pine sawdust favoured the formation of micropores, which negatively affected water movement and consequently, root growth. The particle size in the pine shavings and coconut coir dust mixture caused particle rearrangement, formed macropores, and caused a lower water potential in the mixture, along with a lower water use efficiency.

Morphological characterization of substrates helps understanding water containment and movement. Also, it guides the better planning of irrigation volume and the way it is applied in order to favour water availability for roots.

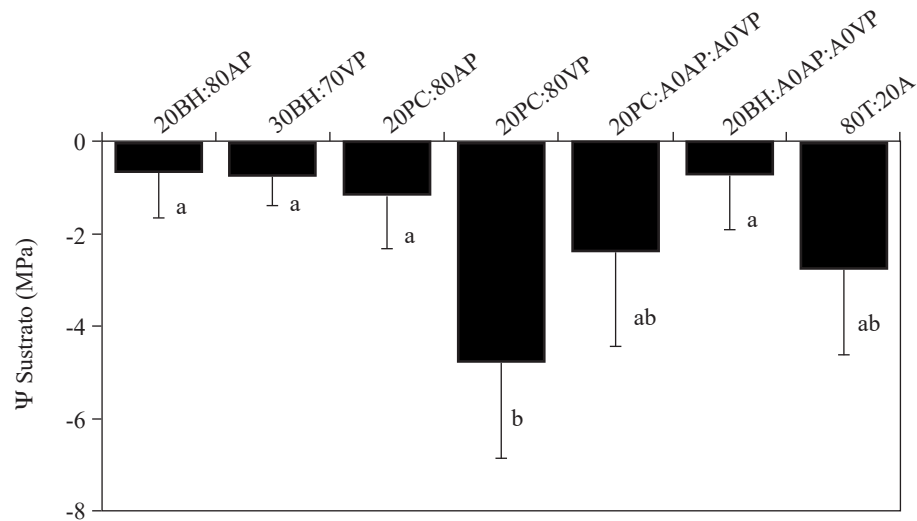


Figura 4. Potencial hídrico de mezclas de bagazo de henequén (BH) o polvo de coco (PC) con aserrín de pino (AP) o viruta de pino (VP) comparadas con la mezcla turba-agrolita (T:A). Literales diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey; $p \leq 0.05$).

Figure 4. Water potential of mixtures of henequen bagasse (BH) or coconut coir dust (PC) with pine sawdust (AP) or pine shavings (VP) compared with the mixture peat-Agrolita™ (T:A). Different letters indicate statistical differences (Tukey; $p \leq 0.05$).



Figura 5. Distribución de raíces de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura) cultivado en mezclas de bagazo de henequén (BH) o polvo de coco (PC) con aserrín de pino (AP) o viruta de pino (VP) y la mezcla turba-agrolita.

Figure 5. Distribution of roots in *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura grown in henequen bagasse (BH) or coconut coir dust (PC) with pine sawdust (AP) or pine shavings (VP), and the mixture of peat-Agrolita™.

CONCLUSIONES

La combinación de formas y tamaños de partículas, el tipo y tamaño de poro determinaron el contenido de agua y en consecuencia el crecimiento de las raíces. Las partículas de la mezcla bagazo de henequén con aserrín de pino, en una relación 20:80 generaron poros de empaquetamiento compuesto y un uso eficiente del agua mayor; así como volumen y peso seco de raíz mayores que la mezcla 80turba:20agrolita.

La combinación de polvo de coco y aserrín de pino favoreció la formación de microporos que afectaron el movimiento del agua en forma negativa, y en consecuencia el crecimiento de las raíces. Los tamaños de partícula de la mezcla de viruta de pino y polvo de coco ocasionaron el reacomodo de estas, formaron macroporos y originaron en la mezcla potencial hídrico y uso eficiente del agua menores.

La caracterización morfológica del sustrato permite entender la contención y el movimiento del agua, y orientar tanto la cantidad como el modo de aplicación del riego para favorecer la disponibilidad del agua para las raíces.

LITERATURA CITADA

- Abad B., M., N. Murray P., y C. Benedito C. 2005. Fertirrigación. Cultivos hortícolas, frutales y ornamentales. In: Cadahía, C. (ed.) Sustratos para el cultivo sin suelo y fertirrigación. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 299-354.
- Anicua S., R., M. C. Gutiérrez C., P. Sánchez G., C. Ortiz S., V. H. Volke H., y J. E. Rubiños P. 2009. Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y zeolita. Agric. Téc. Méx. 35: 147-156.
- Basu S., V. Ramegowda, A. Kumar, and A. Pereira. 2016. Plant adaptation to drought stress. F1000Research 5: F1000 Faculty Rev-1554. DOI: 10.12688/f1000research.7678.1
- Bernal C., Y., C. E. Hernández R., C. Ríos A., and L. Torres C. 2019. Combinations and proportions of substrates in the production of *Acerola* plantlets by cuttings. Centro Agric. 46: 30-37.
- Bullock P., N. Federoff, A. Jongerius, G. Stoops, and T. Tursina. 1985. Handbook for soil thin section description. Wayne Research Publications. England, UK. 152 p.
- Cruz-Crespo, E., Á. Can-Chulim, J. Pineda-Pineda, D. Moreno-Velázquez, G. Aguilar-Benítez, y J. D. García-Paredes. 2019. Relación entre las propiedades físicas de mezclas de lombri-compost con tezontle, piedra pómez y cascarilla de arroz. Agrociencia 53: 1-12.
- Falcón O., E., M. Cobas L., M. Bonilla V., O. Rodríguez L., y C. V. Romero C. 2019. Influencia del sustrato en la calidad de la planta *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq., cultivada en tubetes. Rev. Cubana Cienc. For. 7: 283-296.
- García B, C. V. e R. Testezlaf. 2014. Particle size distribution effects on physical characteristics of coconut and pine bark substrates. Rev. de Ciênc. Agrovet. 13: 327-336.
- Gayosso-Rodríguez, S., L. Borges-Gómez, E. Villanueva-Couoh, M. A. Estrada-Botello, y R. Garruña-Hernández. 2016. Sustratos para producción de flores. Agrociencia 50: 617-631.
- Gayosso R., S., L. Borges, E. Villanueva, M. A. Estrada y R. Garruña. 2018a. Caracterización física y química de materiales orgánicos para sustratos agrícolas. Agrociencia 52: 639-652.
- Gayosso R., S., E. Villanueva C., M. A. Estrada B., y R. Garruña H. 2018b. Caracterización fisicoquímica de mezclas de residuos orgánicos para su utilización como sustratos agrícolas. BioAgro 30: 177-188.
- Gutiérrez C., M. D. C, J. Hernández E., C. A. Ortiz S., R. Anicua S., y M. Hernández L. 2011. Relación porosidad-retención de humedad en mezclas de sustratos y su efecto sobre variables respuesta en plántulas de lechuga. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 17: 183-196.
- Lipiec J., C. Doussan, A. Nosalewicz, and K. Kondracka. 2013. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. Int. Agrophys. 27:463-477.
- Lopes M. S., S. Nogués, y G. Molero. 2013. Intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila principios y aplicaciones. In: Reynolds, M. P., A. J. D. Pask, D. M. Mullan y P. N. Chávez-Dulanto (eds) Fitomejoramiento Fisiológico I: Enfoques Interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo. Capítulo 8. CIMMYT. México. pp 81-96.
- López-Lambrano A., C. Fuentes, y A. López-Ramos. 2018. Sobre la relación entre las distribuciones de los tamaños de poros y partículas del suelo. Rev. Mex. Fís. 64: 197-205.
- Markoska V., V. Spalevic, K. Lisichkov, K. Atkovska, and R. Gulaboski. 2018. Determination of water retention characteristics of perlite and peat. Agric. & For. Poljoprivreda i Sumarstvo 64: 113-126.
- Martínez P, F, y D. Roca. 2011. Sustratos para el cultivo sin suelo. Materiales, propiedades y manejo. In: Flórez R., V. J. (ed.) Sustratos, manejo del clima, automatización y control en sistemas de cultivo sin suelo. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp. 37-77.
- Mascarini L., G. Lorenzo, H. Svartz, S. Pesenti, y S. Amado. 2012. Tamaño del contenedor y tipo de sustrato afectan la eficiencia en el uso del agua en *Gerbera jamesonii* para flor cortada. Rev. Brasil. Hort. Ornamental 18: 71-77.
- Murphy C., P. 1986. Thin section preparation of soil and sediments. AB Academic Publishers. Great Britain. 149 p.
- Quintero M., F, A. González, C., y M. Guzmán, J. 2011. Sustratos para cultivos hortícolas y flores de corte. In: Flórez R., V. J. (ed.) Sustratos, manejo del clima, automatización y control en sistemas de cultivo sin suelo. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp: 79-108.
- Schindler U., G. Lischeid, and L. Müller. 2017. Hydraulic performance of horticultural substrates-3. Impact of substrate composition and ingredients. Horticulturae 3: 1-9.
- StatSoft, Inc. 2004. Statistica ver. 7.0. <https://statistica.software.informer.com/7.0/> (Consulta: noviembre 2019).
- Stoops G. 2018. Micromorphology as a tool in soil and regolith studies. In: Stoops G., M. Vera, F. Mees. (eds) Interpretation

- of micromorphological features of soils and regoliths. 2a ed. Elsevier. United States. 969 p.
- Vence L., B., R. Valenzuela O., A. Svartz H., y E. Conti M. 2013. Elección del sustrato y manejo del riego utilizando como herramienta las curvas de retención de agua. *Cienc. Suelo* (Argentina) 31: 153-164.
- Wisdom B., M. Nyembezi, and K. Agathar. 2017. Effect of different vermiculite and pine bark media substrates mixtures on physical properties and spiral rooting of radish (*Raphanus sativus* L.) in float tray system. *Rhizosphere* 3: 67-74.

DÉFICIT HÍDRICO EN MAÍZ AL CONSIDERAR FENOLOGÍA, EFECTO EN RENDIMIENTO Y EFICIENCIA EN EL USO DEL AGUA

WATER DEFICIT IN MAIZE CONSIDERING PHENOLOGY, EFFECT ON YIELD AND WATER USE EFFICIENCY

Ernesto Sifuentes-Ibarra¹, Waldo Ojeda-Bustamante^{2*}, Jaime Macías-Cervantes¹,
Cándido Mendoza-Pérez³, Pablo Preciado-Rangel⁴

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF). Carretera internacional México-Nogales km 1609, 81110, Juan José Ríos, Sinaloa, México. ²Colegio Mexicano de Ingenieros en Irrigación. Vicente Garrido No. 106. Colonia Ampl. Maravillas, 62330, Cuernavaca, Morelos, México. (w.ojeda@riego.mx). ³Hidrociencias. Campus Montecillo. Colegio de Posgraduados. 56230, Montecillo, México. ⁴Instituto Tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro km 7.5, 27170, Ejido Ana, Torreón, Coahuila, México.

RESUMEN

La presencia de períodos de disponibilidad hídrica baja y las eficiencias de riego bajas obligan a los distritos de riego (DR) a implementar acciones como la reducción de la superficie cultivada y el número de riegos de los cultivos. Esto, causa en muchos casos, impactos negativos en rendimiento al no aplicarse en forma científica. El objetivo de esta investigación fue evaluar de manera experimental el efecto del estrés hídrico a partir de la fenología, en los componentes del rendimiento y en el uso eficiente del agua del cultivo de maíz (*Zea mays* L.). El experimento se realizó en el distrito de riego DR-075, durante el ciclo otoño-invierno (OI) 2012-2013 y se evaluaron cuatro tratamientos (T) de déficit hídrico y un testigo (TES) diseñados a partir de la función FAO que relaciona el déficit hídrico con el rendimiento. T1 recibió dos riegos de auxilio (RA) distribuidos en las etapas V12 y R2; T2 recibió tres RA distribuidos en V9, R1 y R3; T3 recibió cuatro en V7, V12, R1 y R3-R4. T4 cinco RA en V5, V12, R1, R3 y R4. El TES recibió cuatro RA distribuidos igual que T3, pero aplicados en forma convencional. Las variables evaluadas fueron: eficiencia de aplicación (EA), materia fresca (MF), materia seca (MS), rendimiento de grano (Ya), índice cosecha (IC) y productividad del agua (PA). El seguimiento de riegos y fenología se realizó con la plataforma informática IRRIMODEL complementada con observaciones de campo; el monitoreo de la humedad del suelo se realizó con un sensor portátil tipo TDR. Los resultados proporcionaron información científica para ma-

ABSTRACT

The occurrence of low water availability periods and low irrigation efficiencies force irrigation districts (DR) to take actions such as reducing the crop area and the number of applied irrigations. This, in many cases, causes negative yield impacts when not applied in a scientific way. The objective of this research was to experimentally evaluate the water stress effects on yield components and water use efficiency of maize (*Zea mays* L.) based on phenology. The experiment was conducted in the DR-075 irrigation district, during the autumn-winter (OI) 2012-2013 season, and four treatments (T) of water deficit and a control (TES) were evaluated, designed under the FAO function that relates water deficit to yield. T1 received two auxiliary irrigations (RA) distributed in growth stages V12 and R2; T2 received three RA distributed in V9, R1 and R3; T3 received four in V7, V12, R1 and R3-R4. T4 received five RA in V5, V12, R1, R3 and R4. TES received four RA distributed in the same way as T3 but applied in a conventional manner. The evaluated variables were application efficiency (EA), fresh matter (MF), dry matter (MS), grain yield (Ya), harvest index (IC) and water productivity (PA). Irrigation and phenology monitoring was carried out with the IRRIMODEL computer platform complemented with field observations; soil moisture monitoring was performed with a portable TDR type sensor. Results provided scientific information to manage corn crop irrigation considering phenology, under normal and restricted water availability conditions. In the first scenario, the fifth auxiliary irrigation should be avoided, and in the second, the three auxiliary schedule (T2) should be used to obtain application efficiencies equal to or greater than 64%.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9613-1608>

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

Publicado en *Agrociencia* 55: 209-226. 2021.

nejar el riego del cultivo de maíz considerando fenología, bajo condiciones normales y de disponibilidad hídrica restringida. En el primer escenario se debe evitar el quinto riego de auxilio y en el segundo, utilizar el calendario de tres auxilios (T2) para obtener eficiencias de aplicación iguales o mayores a 64%.

Palabras clave: *Zea mays* L., disponibilidad hídrica, riego por gravedad, planeación del riego, rendimiento.

INTRODUCCIÓN

La escasez de agua afecta al 52% de la población mundial en las regiones áridas y semiáridas. La agricultura de riego se practica con mayor frecuencia en un ambiente restringido e incierto de recursos hídricos, debido a la intensificación de la variabilidad climática y a una competencia hídrica mayor por usuarios no agrícolas (Gheysari *et al.*, 2017). El maíz es la tercera gramínea más importante en el mundo con 20% de la superficie cosechada cada año bajo riego y se localiza de manera principal en las zonas áridas y semiáridas donde existe variabilidad alta en los volúmenes de agua disponibles (FAO, 2011; Steduto *et al.*, 2014).

México es uno de los principales productores de maíz en el mundo, pero su consumo interno es superior a su producción; sus importaciones superan los 7 millones Mg anuales (SIAP, 2016). El estado de Sinaloa, en la región noroeste de México, es el principal productor de maíz bajo riego en el país al cosechar cada año más de 452 000 ha en sus ocho distritos de riego (DR), con una producción de 5.29 millones Mg (SIAP, 2020). Estudios de análisis de cambio climático para este estado indican una anomalía positiva de la temperatura de 1 a 2 °C respecto al periodo base 1961-1990 y una reducción de la precipitación del 20% (Castillo e Ibáñez, 2017; Lobato y Altamirano, 2017) que han impactado en la duración de los ciclos fenológicos y productividad de los cultivos. Además de afectaciones cada vez más frecuentes de eventos climáticos extremos como ciclones, heladas y sequías (Ojeda *et al.*, 2011).

Otro problema importante de las zonas de riego de México, es la gestión deficiente del riego por gravedad porque en la mayoría de los casos no se utilizan técnicas científicas para el diseño, programación, aplicación y evaluación que resultan en eficiencias de riego globales de 34.1% (Olmedo *et al.*, 2017). En los DR del norte de Sinaloa, a nivel parcelario,

Key words: *Zea mays* L., water availability, surface irrigation, irrigation planning, yield.

INTRODUCTION

Water scarcity affects 52% of the population in arid and semi-arid regions of the world. Irrigated agriculture is more frequently practiced under a constrained and uncertain water resource scenario due to intensification of climate variability and an increasing water competition by non-agricultural users (Gheysari *et al.*, 2017). Maize is the third most important staple in the world with 20% of the area harvested each year under irrigation and mainly located in arid and semi-arid zones, where there is high variability in available water volumes (FAO, 2011; Steduto *et al.*, 2014).

Mexico is one of the main maize producers in the world, but its domestic consumption exceeds its production; corn imports exceed 7 million Mg annually (SIAP, 2016). The state of Sinaloa, northwestern region of Mexico, is the leading irrigated maize producer in the country by harvesting more than 452 000 ha each year in eight irrigation districts (DR), with a total yield of 5.29 million Mg (SIAP, 2020). Climate change studies on this state indicate a positive temperature anomaly of 1 to 2 °C respect to 1961-1990 base period, and a 20% reduction in precipitation (Castillo and Ibáñez, 2017; Lobato and Altamirano, 2017). All this has impacted the duration of phenological seasons and crop productivity. In addition to increasingly frequent damages from extreme weather events such as cyclones, frosts and droughts (Ojeda *et al.*, 2011). Another important problem in irrigated areas of Mexico lies in the poor management of surface irrigation, because in most cases, scientific techniques are not used for its design, programming, application and evaluation. Then, resulting in 34.1% overall irrigation efficiencies (Olmedo *et al.*, 2017). According to data from DRs of northern Sinaloa, less than 45% of the applied water is used at farm level; water runs out of the root zone through surface drainage and deep percolation (Sifuentes *et al.*, 2015). Therefore, actions are required to improve water use in terms of productivity, savings and sustainability, under different scenarios of water availability (Fereres and Soriano, 2006). There are some irrigation strategies that allow reducing the frequency and

se aprovecha menos del 45% del agua aplicada, el resto se mueve fuera de la zona radical a través del drenaje superficial y percolación profunda (Sifuentes *et al.*, 2015). Por lo tanto, se requieren acciones para mejorar el aprovechamiento del agua en términos de productividad, ahorro y sustentabilidad, bajo diferentes escenarios de disponibilidad hídrica (Feres y Soriano, 2006). Hay estrategias de riego que permiten reducir la frecuencia y cantidad de riego en los cultivos con efectos mínimos en los rendimientos convencionales si se validan en escala local, como la aplicación del riego deficitario en función del desarrollo fenológico (Mendoza-Pérez *et al.*, 2016). Sin embargo, estas estrategias pueden generar una reducción en el crecimiento del cultivo y en el desarrollo del área foliar, y en consecuencia del rendimiento de maíz (Paredes *et al.*, 2014).

Stewart *et al.* (1977) propusieron relaciones empíricas para predecir el efecto de la evapotranspiración en el rendimiento de los cultivos, usaron un factor de respuesta *Ky* que representa la relación entre la producción y el uso del agua de un cultivo incluso para cada etapa fenológica. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) adoptó esas relaciones para estimar el efecto del estrés hídrico en el rendimiento potencial de los cultivos (Doorenbos y Kassam, 1979; Steduto *et al.*, 2014). Estas relaciones pueden contribuir al ahorro de volúmenes de agua significativos con reducción mínima en el rendimiento de grano y materia seca cuando se aplican en forma apropiada, ya que se reducen los requerimientos de riego en las etapas menos sensibles al estrés hídrico.

La experimentación y aplicación de la relación déficit hídrico-rendimiento permite estimar el efecto del estrés hídrico por etapa fenológica en el rendimiento de maíz y puede usarse para analizar escenarios de disponibilidad hídrica normal y restringida; con el ajuste de la cantidad y oportunidad de riegos en las zonas irrigadas de México, localizadas principalmente en las regiones áridas y semiáridas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del estrés hídrico aplicado por etapas fenológicas en los componentes del rendimiento del cultivo de maíz bajo riego por gravedad. La hipótesis es que estos ajustes pueden reducir de manera óptima la frecuencia y cantidad de riego por aplicar.

quantity of irrigation in crops with minimal effects on conventional yields. For example, the application of regulated deficit irrigation according to plant phenological development, if this is validated at a local scale (Mendoza-Pérez *et al.*, 2016). However, these strategies can generate reductions in crop growth and leaf area development, and consequently in corn yield (Paredes *et al.*, 2014).

Stewart *et al.* (1977) proposed empirical relations to predict the effect of evapotranspiration on crop yield, using a *Ky* response factor that represents the relationship between yield and water use of a crop even for each phenological stage. The Food and Agriculture Organization under the United Nations (FAO) adopted such relations to estimate the effect of water stress on crop yield potential (Doorenbos and Kassam, 1979; Steduto *et al.*, 2014). These relationships can contribute to significant water volume savings with minimal reduction in grain and dry matter yields when applied properly, as irrigation requirements are reduced at stages less sensitive to water stress.

The experimentation and application of the water deficit and yield relationship allows estimating the effect of water stress by phenological stage on corn yield, and can be used to analyze scenarios of normal and restricted water availability; adjusting the amount and timing of water supply in irrigated areas of Mexico, located mainly in arid and semiarid regions. The objective of this study was to evaluate the effect of water stress applied by phenological stages on yield components of maize under surface irrigation. Under the hypothesis that these adjustments would optimally reduce the frequency of application and the overall amount of irrigation.

MATERIALS AND METHODS

Description of the study area

The study was established during 2012-2013 autumn-winter (OI) agricultural season, at the Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF) under the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), located in the northern arid zone of Sinaloa, Mexico, with geographic coordinates of 25° 45' 53" N and -108° 48' 46" W at 12 m altitude. The soil is of clayish texture, with a bulk density (D_a , 1.15 g cm⁻³) and

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de la zona de estudio

El estudio se estableció durante el ciclo agrícola otoño-invierno (OI) 2012-2013, en el Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en la zona árida del norte del estado de Sinaloa, México, en las coordenadas 25° 45' 53" N y -108° 48' 46" O a 12 m de altitud. El suelo es de textura arcillosa, con densidad aparente (D_a) de 1.15 g cm⁻³ y valores estimados de las constantes hídricas capacidad de campo (CC), punto de marchitez permanente (PMP), saturación (SAT) y humedad aprovechable (HA) de 0.52, 0.36, 0.57 y 0.16 cm³cm⁻³, respectivamente. El suelo es moderadamente bajo en materia orgánica (MO), nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), con niveles satisfactorios de pH (7.05), conductividad eléctrica (CE) (0.96 dS m⁻¹), carbonatos totales (1.96%) y sodio intercambiable (175 mg L⁻¹).

La precipitación anual acumulada promedio de la zona de estudio es 350 mm, el 70% se concentra de julio a septiembre, y de febrero a mayo la precipitación es insignificante. Los valores anuales de la evapotranspiración de referencia acumulada (ET_o) varían de 1600 a 1700 mm, que excede a la precipitación acumulada anual, por lo cual, se requiere el riego para asegurar rendimientos comerciales, principalmente en el ciclo agrícola otoño-invierno (OI).

Tratamientos y diseño experimental

El diseño experimental fue en bloques al azar con cinco repeticiones, los tratamientos (T) fueron cuatro, más un testigo (TES). Los tratamientos se diseñaron como funciones de la relación rendimiento-déficit hídrico aplicado por etapas fenológicas de Doorenbos y Kassam (1979) y Steduto *et al.* (2014), como se muestra en la ecuación (1):

$$\left(\frac{Y_x - Y_{EST}}{Y_x} \right) = K_y \left(\frac{ET_x - ET_a}{ET_x} \right) \quad (1)$$

donde Y_x es el rendimiento máximo esperado en la zona de estudio; Y_{EST} es el rendimiento estimado; ET_x y ET_a son respectivamente la evapotranspiración máxima y actual, calculadas como la acumulación de evapotranspiración del cultivo diaria (ET) hasta madurez fisiológica; K_y es un factor de proporcionalidad entre la pérdida de rendimiento relativo y la reducción relativa en evapotranspiración, el cual varía por etapas fenológicas.

El valor de K_y utilizado para T1 fue 2.3 y 1.25 para los demás tratamientos se consideraron los valores de $Y_x = 12$ Mg ha⁻¹

the estimated values of the water constants field capacity (CC), permanent wilting point (PMP), saturation (SAT) and usable moisture (HA) are 0.52, 0.36, 0.57, 0.16 cm³cm⁻³, respectively. The soil is moderately low in organic matter (MO), nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K), with satisfactory levels of pH (7.05), electrical conductivity (CE) (0.96 dS m⁻¹), total carbonates (1.96%) and exchangeable sodium (175 mg L⁻¹).

The average annual accumulated precipitation in the study area is 350 mm, 70% concentrates from July to September, and from February to May precipitation is negligible. The annual values of the accumulated reference evapotranspiration (ET_o) vary from 1600 to 1700 mm, which exceeds the annual accumulated precipitation. Therefore, irrigation is required to ensure commercial yields, mainly in the autumn-winter (OI) agricultural season.

Treatments and experimental design

The experimental design was in randomized blocks with five replications, there were four treatments (T), plus a control (TES). The treatments were designed as functions of the yield-water deficit relationship applied by phenological stages of Doorenbos and Kassam (1979) and Steduto *et al.* (2014), as it is shown in equation (1):

$$\left(\frac{Y_x - Y_{EST}}{Y_x} \right) = K_y \left(\frac{ET_x - ET_a}{ET_x} \right) \quad (1)$$

where Y_x is the maximum expected yield in the study area; Y_{EST} is the estimated yield; ET_x and ET_a are respectively the maximum and actual evapotranspiration, calculated as the daily crop evapotranspiration accumulation (ET) until physiological maturity; K_y is a proportionality factor between the relative yield loss and the relative reduction in evapotranspiration, which varies by phenological phases.

The K_y value used for T1 was 2.3 and 1.25 for the other treatments the expected TES values of $Y_x = 12$ Mg ha⁻¹ and $ET_x = 52.3$ cm were considered. The irrigation schedule applied in TES (T5) was based on INIFAP (2017) technological recommendations, and on the management of leading farmers in the study area.

One of the most commonly used variables to study the water applied to a plot is the concept of gross depth (Lb), estimated as the quotient between the volume applied and the irrigated area. Another hydrometric variable estimated was the irrigation requirement of the crop, expressed through the net depth (Ln). There is a widely used methodology to estimate the net depth (Ojeda *et al.*, 2006). The quotient between both depths (Ln/Lb) integrates the concept of irrigation application efficiency (EA).

y $ET_x = 52.3$ cm esperados en TES. El calendario de riegos aplicado en TES (T5) se basó en el paquete recomendado por el INIFAP (2017) y en el manejo de los agricultores líderes de la zona de estudio.

Una de las variables más usadas para estudiar el agua aplicada a una parcela es el concepto de lámina bruta (Lb), estimada como el cociente entre el volumen aplicado y el área regada. Otra variable hidrométrica estimada, fue el requerimiento de riego del cultivo y se expresa a través de la lámina neta (Ln). Existe una metodología muy usada para estimar la lámina neta (Ojeda *et al.*, 2006). El cociente entre ambas láminas (Ln/Lb) integra el concepto de eficiencia de aplicación del riego (EA).

Para cada tratamiento T descrito (Cuadro 1) se indica la etapa fenológica con sus grados-día desarrollo acumulados (GDDA) y el grado de estrés hídrico planificado para cada riego, expresado como Ln; lámina bruta (Lb) programada, rendimiento estimado (Y_{EST}), así como lámina neta relativa (RLn) y rendimiento relativo estimado (YR_{EST}) respecto a TES. Los GDDA se calcularon con la metodología utilizada por Ojeda *et al.* (2006). Para cada tratamiento se consideró un riego de germinación de 23 cm (Lb) similar al aplicado en parcelas comerciales en escenarios de suelo seco cercano a PMP. Los datos climáticos se obtuvieron de una estación meteorológica automatizada (EMA) instalada a 200 m del lote experimental. Durante el experimento, el valor de precipitación se consideró despreciable; por lo tanto, ET_a equivale a Ln, en cada intervalo de riego.

At each described T (Table 1) the phenological stage is indicated, along with its cumulative Growing Degree-Days (GDDA) and the planned level of water stress per each irrigation, expressed as Ln; programmed gross depth (Lb), estimated yield (Y_{EST}), as well as estimated relative yield (YR_{EST}) and relative net depth (RLn) in relation to TES. GDDA were calculated with the methodology used by Ojeda *et al.* (2006). For each treatment, a 23 cm (Lb) irrigation depth for germination was provided, similar to that applied in commercial plots under a drought scenario close to PMP. Climatic data were obtained from an automated weather station (EMA) installed 200 m away the experimental plot. During the experiment, the precipitation value was considered negligible; therefore, ET_a equals Ln, at each irrigation interval.

The experimental plot was a rectangular plot of 1.2 ha (120 x 100 m), watered by surface irrigation, with furrows of 100 m in length established on the shortest side, with a longitudinal slope of 0.1% in the direction of flow and a transversal slope of 0.05%. Water was applied with calibrated PVC siphons of 1.5" in diameter, to maintain an approximate positive head of 7 cm and an average flow rate of 0.6 L s⁻¹ per furrow. Soil preparation for sowing was carried out by subsoiling, ploughing, two passes of harrow, levelling and furrow formation (80 cm separation). A base fertilization of 450 kg ha⁻¹ of the 30-10-12 N-P-K physical mixture was applied to the prepared soil. Dry sowing was made on December 12, 2012 with a Monosem® precision planter after

Cuadro 1. Descripción de tratamientos aplicados para la evaluación de estrés hídrico en maíz, basados en etapas fenológicas.

Table 1. Description of treatments used to evaluate water stress in maize, based on phenological stages.

Tratamiento	Descripción y fases fenológicas bajo estrés hídrico	Ln (cm)	RLn (%)	Lb (cm)	Y_{EST} (Mg ha ⁻¹)	YR_{EST} (%)
T1	2 riegos de auxilio (RA): V12 (722 GDDA) y R2 (954 GDDA). Estrés fuerte en la etapa vegetativa (EV) y en maduración	43.1	82	61.1	7.2	60
T2	3 RA: V9 (606 GDDA), R1 (859 GDDA) y R3 (1167 GDDA). Estrés moderado a la mitad de EV y fuerte en maduración	49.6	95	79.0	11.2	94
T3	4 RA: V7 (514 GDDA), V12 (722 GDDA), R1, R3-R4 (1167-1256 GDDA). Estrés ligero al inicio del ciclo y estrés moderado en maduración.	52.3	100	82.8	12.0	100
T4	5 RA: V5 (389 GDDA), V12, R1, R3, R4. Estrés ligero al inicio y al final del ciclo	51.7	99	87.7	11.8	99
T5 (TES)	Igual que T3 pero con láminas brutas similares al manejo convencional	52.3	100	92.9	12.0	100

V5, V7, V9 y V12: etapas fenológicas quinta, séptima, novena, y décima segunda hoja verdadera; R1, R2, R3 y R4: fases jiloteo o polinización, grano acuoso, grano lechoso y grano masoso. ♦ V5, V7, V9 and V12: fifth, seventh, ninth, and twelfth leaf blade (phenological plant stages); R1, R2, R3 and R4: silking, kernel blister, kernel milk, and kernel dough (phenological grain fill stages).

La parcela experimental fue de forma rectangular de 1.2 ha (120 x 100 m), regada por riego por gravedad, con surcos de 100 m de longitud establecidos en el lado más corto, con pendiente longitudinal de 0.1% en el sentido del flujo y transversal de 0.05%. El agua se aplicó con apoyo de sifones calibrados de PVC de 1.5" de diámetro, para mantener una carga positiva aproximada de 7 cm y un gasto promedio de 0.6 L s⁻¹ por surco. La preparación del suelo para la siembra, se realizó un subsoleo, un barbecho, dos pasos de rastra, empareje y formación de surcos (separados a 80 cm). En el terreno preparado se aplicó una fertilización de base con dosis de 450 kg ha⁻¹ de la mezcla física 30-10-12 de N-P-K. La siembra se realizó en seco el 12 de diciembre de 2012 con sembradora de precisión marca Monosem® después de aplicar la fertilización de base, con la variedad comercial DK-3000 de ciclo intermedio (aproximadamente 1456 GDDA a madurez fisiológica) con una densidad aproximada de 100 000 semillas ha⁻¹. Un riego de germinación se aplicó al lote experimental al siguiente día de la siembra para uniformizar la humedad y llevar el suelo a CC en la zona de raíces (100 cm). La germinación se presentó el 24 de diciembre, 12 días después de la siembra (dds), la máxima cobertura del dosel ocurrió entre el 26 y el 31 de marzo del 2013 (104 a 109 dds) y la senescencia se presentó del 03 al 10 de mayo (142 a 149 dds) y dependió del tratamiento. Una fertilización complementaria se aplicó con 100 kg ha⁻¹ de urea (46-00-00) en la etapa fenológica V5.

Variables medidas

A cada tratamiento se le dio seguimiento fenológico de acuerdo con la metodología de Abendroth *et al.* (2011), con el programa IRRIMODEL® (Sifuentes y Macías, 2015), complementado con observaciones de campo. En la etapa de madurez fisiológica, se midieron las variables materia fresca (MF), biomasa (B), índice de cosecha (IC) y rendimiento de grano (Ya), por medio de muestreos en cinco sitios representativos en un área de 0.8 m² en cada repetición de cada tratamiento (1 m x 0.8 m). En cada muestra se separaron tallo, hoja, grano, totomoxtle y olote para obtener el peso fresco (PF) y seco (PS) de cada órgano, con deshidratación forzada en un horno de secado a temperatura de 65 °C hasta peso constante. La B se calculó al sumar los PS de cada órgano (kg ha⁻¹) y el IC al dividir el peso seco del grano (PSG) entre B.

La evaluación del rendimiento del grano se realizó antes de la cosecha a los 191 dds (1898 GDDA), por medio de muestreos en sitios representativos en los dos surcos centrales de cada parcela experimental de cada tratamiento en un área de 8 m² por sitio (5 m x 0.8 m x 2 surcos). En esta evaluación también se midieron las variables complementarias: altura de planta (ALP) y plantas sin mazorca o "jorras" (PLJ).

applying the base fertilization, with the DK-3000 commercial maize variety of intermediate season (approximately 1456 GDDA at physiological maturity) at an approximate density of 100 000 seeds ha⁻¹. A germination irrigation was applied to the experimental plot a day after sowing to uniform the moisture and bring the soil to CC in the root zone (100 cm). Germination occurred on December 24, 12 days after sowing (das), maximum canopy cover occurred between March 26 and 31, 2013 (104 to 109 das); senescence occurred from May 03 to 10 (142 to 149 das) and was dependent on treatments. A supplemental fertilization was applied with 100 kg ha⁻¹ of urea (46-00-00) at V5 phenological stage.

Measured variables

Each treatment was monitored on plant phenology according to the methodology of Abendroth *et al.* (2011), with the IRRIMODEL® program (Sifuentes and Macías, 2015), complemented with field observations. At the physiological maturity stage, fresh matter (FM), biomass (B), harvest index (CI) and grain yield (Ya) were measured by sampling in five representative sites in an area of 0.8 m² in each replicate per treatment (1 m x 0.8 m). In each sample, we separated stem, leaf, kernels, dry ear husk (totomoxtle), and cob (olote) to obtain the fresh weight (PF) and dry weight (DW) of each plant organ, with forced dehydration in an oven at a temperature of 65 °C until constant weight. B was calculated by adding the PS of each organ (kg ha⁻¹) and the IC by dividing the dry weight of the grain (DWG) by B.

Grain yield evaluation was carried out before harvest at 191 das (1898 GDDA) by sampling in representative sites in the two central furrows at each experimental plot per treatment in an area of 8 m² per site (5 m x 0.8 m x 2 furrows). In this evaluation, the following complementary variables were also measured: plant height (ALP) and sterile plants with no ear (PLJ, locally known as "jorras").

The water variables measured were Ln, Lb, application efficiency (EA) and water productivity (PA). Both in the germination irrigation and in the auxiliary irrigations, volumetric soil moisture before irrigation (HV_{act}) was measured with a locally calibrated TDR (Time Domain Reflectometer) sensor to estimate Ln and bring the soil to CC based on equation (2).

$$Ln = (CC - HV_{act}) \times Pr \quad (2)$$

where CC and HV_{act} are expressed in cm³ cm⁻³, and Pr represents soil depth (cm).

The application efficiency (EA) was estimated with the expression: EA = (Ln / Lb) x 100 with Ln and Lb expressed in

Las variables hídricas medidas fueron Ln, Lb, eficiencias de aplicación (EA) y productividad del agua (PA). Tanto en el riego de germinación como en los riegos de auxilio se midió la humedad volumétrica del suelo antes del riego (HV_{act}) con sensor tipo TDR (o Time Domain Reflectometer) calibrado localmente, para estimar Ln y llevar el suelo a CC con la ecuación (2).

$$Ln = (CC - HV_{act}) \times Pr \quad (2)$$

donde CC y HV_{act} se expresan en $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$ y Pr representa la profundidad del suelo (cm).

La eficiencia de aplicación (EA) se estimó con la expresión: $EA = (Ln / Lb) \times 100$ con Ln y Lb expresadas en cm; Lb se calculó con: $Lb = (Q \times t) / A$, donde Q es el gasto de riego aplicado a la parcela ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), t es el tiempo de riego (s) y A es la superficie regada (m^2); y PA se calculó al dividir el rendimiento de grano (kg ha^{-1}) entre el volumen de agua aplicado (V) en los tratamientos ($\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$).

Un análisis de diferencias relativas (Δx) se realizó para las variables Ya, Lb, EA y PA de cada tratamiento respecto a TES; la ecuación (3) se utilizó para realizar este análisis.

$$\Delta x = \frac{(T_n - T_{TES})}{T_{TES}} \quad (3)$$

donde, T_n es el valor de la variable de interés del tratamiento n y T_{TES} es el valor obtenido de la misma variable en el testigo.

Al final se realizó un análisis de varianza del rendimiento de grano (Ya) para determinar el nivel de significancia entre tratamientos, y se usó el software estadístico MINITAB versión 2017 (Barsalou y Smith, 2018), para comparar las medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Déficit hídrico-rendimiento

Una comparación del nivel de déficit hídrico (DH) calculado como el valor de $1 - (ETa/ETx)$ se realizó (Cuadro 2) en ocho intervalos de etapas fenológicas en los cinco tratamientos; los valores altos indican niveles de estrés hídrico altos (Doorenbos y Kassam, 1979; Steduto *et al.*, 2014). En cada intervalo se muestran también los valores de ETa y ETx; y en la última columna se presenta el rendimiento obtenido (Ya) en cada tratamiento. T1 recibió un estrés fuerte en el intervalo V5-V12, estrés moderado en

cm; Lb was calculated with $Lb = (Q \times t) / A$, where Q is the irrigation applied to the plot ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), t is the irrigation time (s) and A is the irrigated area (m^2); and PA was calculated by dividing the grain yield (kg ha^{-1}) by the volume of water applied (V) in the treatments ($\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$).

An analysis of relative differences (Δx) was performed for the variables Ya, Lb, EA and PA of each treatment with respect to TES; to perform this analysis, equation (3) was used.

$$\Delta x = \frac{(T_n - T_{TES})}{T_{TES}} \quad (3)$$

where T_n is the value of the variable of interest in treatment n and T_{TES} is the value obtained for the same variable in the control (TES).

At the end, an analysis of variance of grain yield (Ya) was performed to determine the level of significance among treatments, and MINITAB v. 2017 (Barsalou and Smith, 2018) was used to compare means with Tukey's test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Water deficit - yield relation

A comparison on water deficit (DH), calculated as the value of $1 - (ETa/ETx)$, was performed (Table 2) in eight phenological phase intervals in the five treatments; high values indicated high water stress levels (Doorenbos and Kassam, 1979; Steduto *et al.*, 2014). In each interval, ETa and ETx values are also shown, and in the last column the yield obtained (Ya) in each treatment is also displayed. T1 received high stress in the V5-V12 interval, moderate stress in flowering (R1-R2) and severe stress in ripening from the R4 to R6 stage with values ranging from 0.47 to 0.80, and a yield of 6.62 Mg ha^{-1} .

T2 received moderate stress before flowering (V12-R1) and low stress in vegetative stage (V5-V12) and kernel formation (R2-R3), with an Ya of 11.42 Mg ha^{-1} . T4 received low stress between stages V5-V12; R2-R3 and higher values of ETa than ETx were observed in the ripening stage, Ya was 12.56 Mg ha^{-1} . Since irrigations in T3 were applied on the same date and with the same Ln as the control TES (T5), water deficit values remained close to zero. The similarity of yields between T2 and T5 (TES) is worth noticing, which demonstrates the validity of the concept we evaluated. The correlation analysis between Ya and

Cuadro 2. Variación de la evapotranspiración (ETa) (mm) y el déficit hídrico (DH) en ocho intervalos de etapas fenológicas de maíz y su efecto en rendimiento (Ya), en cinco tratamientos de estrés basados en fenología, en el norte de Sinaloa, México.

Table 2. Variation of evapotranspiration (ETa) (mm) and water deficit (DH) in eight intervals of maize phenological stages and their effects on yield (Ya) in five phenology-based water stress treatments in northern Sinaloa, Mexico.

Tratamiento		Intervalos de fases fenológicas								Ya (Mg ha ⁻¹)
		S-V5	V5-V12	V12-R1	R1-R2	R2-R3	R3-R4	R4-R5	R5-R6	
T1	ETa	47.4	89.5	74.9	56.8	108.9	32.5	14.8	6.0	6.62
	ETx	47.4	135.6	78.6	69.5	87.8	46.0	27.6	30.0	
	DH	0.00	0.34	0.05	0.18	-0.24	0.29	0.47	0.80	
T2	ETa	47.4	124.9	65.9	69.8	84.2	46.0	27.6	30.0	11.42
	ETx	47.4	135.6	78.6	69.5	87.8	46.0	27.6	30.0	
	DH	0.00	0.08	0.16	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	
T3	ETa	47.4	135.6	78.6	69.5	87.8	46.0	27.6	30.0	12.41
	ETx	47.4	135.6	78.6	69.5	87.8	46.0	27.6	30.0	
	DH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
T4	ETa	47.4	127.6	78.6	69.8	84.2	46.0	30.0	33.5	12.56
	ETx	47.4	135.6	78.6	69.5	87.8	46.0	27.6	30.0	
	DH	0.00	0.06	0.00	0.00	0.04	0.00	-0.08	-0.11	
T5 (TES)	ETa	47.4	135.6	78.6	69.5	87.8	46.0	27.6	30.0	11.87
	ETx	47.4	135.6	78.6	69.5	87.8	46.0	27.6	30.0	
	DH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

S: siembra; ETx: evapotranspiración máxima (mm). ♦ S: sowing; ETx: maximum evapotranspiration (mm).

floración (R1-R2) y estrés severo en maduración desde la etapa R4 hasta R6 con valores de 0.47 a 0.80, con un rendimiento de 6.62 Mg ha⁻¹.

T2 recibió un estrés moderado antes de floración (V12-R1) y ligero en etapa vegetativa (V5-V12) y formación de grano (R2-R3), con un Ya de 11.42 Mg ha⁻¹. T4 recibió un estrés ligero entre las etapas V5-V12; R2-R3 y se observaron valores más altos de ETa que ETx en la etapa de maduración, Ya fue de 12.56 Mg ha⁻¹. Debido a que los riegos en T3 se aplicaron en la misma fecha y con la misma Ln que TES (T5) el tratamiento tomado como referencia, los valores del déficit hídrico se mantuvieron cercanos a cero. Destaca la similitud de rendimientos entre T2 y T5 (TES), lo cual demuestra la validez de la evaluación del concepto. El análisis de correlación entre Ya y Y_{EST} generó un coeficiente de determinación (R²) de 0.9841 y un RMSE de 0.4495 Mg ha⁻¹ (Figura 1).

Variables hídricas

Los valores de Ln, Lb y EA se obtuvieron para cada tratamiento (Cuadro 3). T1 recibió Lb en el pri-

YEST generated a determination coefficient (R²) of 0.9841 with an RMSE value of 0.4495 Mg ha⁻¹ (Figure 1).

Water variables

The values of Ln, Lb and EA were obtained for each treatment (Table 3). T1 received Lb in the first (16.7 cm) and second (16.9 cm) auxiliary irrigations, with a cumulative value of 50.6 cm; the EA in this treatment was 61%. The cumulative value of Lb matched the results of Mendoza-Pérez *et al.* (2016) who applied a total depth of 50 cm during the entire agricultural season of the crop, using the same maize variety under surface irrigation. The depths applied in T2 were 9.0, 8.3, 13.5 cm in the 1st, 2nd and 3rd auxiliary irrigation, respectively, with accumulated depth of 63.3 cm and an EA of 64%. The depth applied in this treatment was similar to that of Rivetti (2006) with a consumption of 57 cm in the corn crop during the entire agricultural season.

T3 received Lb of 11.5, 13.0, 9.0, 9.0, 14.5 cm in the 1st, 2nd, 3rd, and 4th irrigations, respectively,

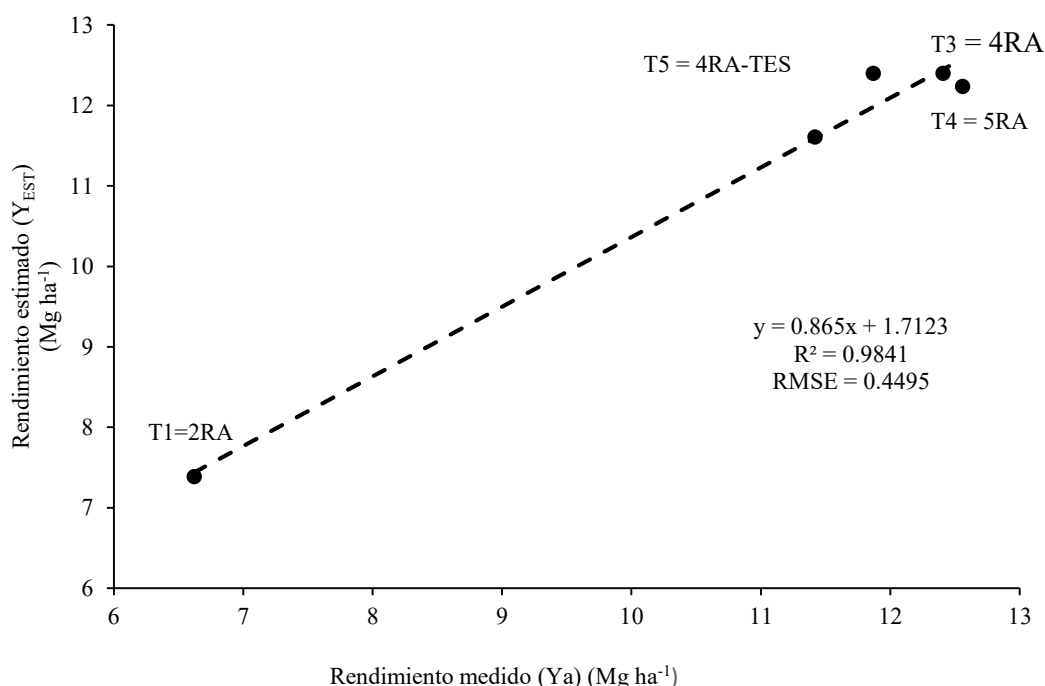


Figura 1. Comparación del rendimiento medido (Y_a) y rendimiento estimado (Y_{EST}) en cinco tratamientos de estrés hídrico en maíz, en el norte de Sinaloa, México.

Figure 1. Comparison of measured yield (Y_a) and estimated yield (Y_{EST}) in maize under five water stress treatments in northern Sinaloa, Mexico.

mer (16.7 cm) y segundo (16.9 cm) riegos de auxilio, con un valor acumulado de 50.6 cm; la EA en este tratamiento fue 61%. El valor acumulado de Lb coincidió con los resultados de Mendoza-Pérez *et al.* (2016) quienes aplicaron una lámina total de 50 cm durante todo el ciclo agrícola del cultivo de maíz de la misma variedad bajo riego por gravedad. Las láminas aplicadas en T2 fueron respectivamente 9.0, 8.3, 13.5 cm en el 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} riego de auxilio, con lámina acumulada de 63.3 cm y una EA del 64%. La lámina aplicada en este tratamiento coincidió con lo aplicado por Rivetti (2006), con un consumo de 57 cm en el cultivo de maíz durante todo el ciclo agrícola.

El T3 recibió respectivamente Lb de 11.5, 13.0, 9.0, 14.5 cm en el 1^{er}, 2^{do}, 3^{er} y 4^{to} riegos de auxilio, con una lámina acumulada de 65 cm y una EA de 66%. Ojeda *et al.* (2006) documentaron para la misma zona de estudio, 42.2 cm de lámina neta y 73.6 cm de Lb en cultivo de maíz bajo riego por gravedad, al aplicar cuatro riegos de auxilio y el riego de germinación, con una eficiencia de aplicación de 57%. En T4 las láminas aplicadas fueron respectivamente 10.0, 12.9, 9.0, 16.5 y 10.3 cm en el 1^{er}, 2^{do}, 3^{er}, 4^{to},

with an accumulated depth of 65 cm and an EA of 66%. Ojeda *et al.* (2006) reported 42.2 cm of net depth and 73.6 cm of Lb in maize under surface irrigation at the same study area, when applying four auxiliary irrigations and the germination irrigation, with an application efficiency of 57%. In T4, the applied depths were 10.0, 12.9, 9.0, 16.5 and 10.3 cm in the 1st, 2nd, 3rd, 4th, and 5th auxiliary irrigation, respectively, with an accumulated depth of 75.7 cm and an AE of 67%. The depth applied in this treatment matched the used by Mendoza-Pérez *et al.* (2016) with a consumption of 73.5 cm in the corn crop during the entire agricultural season.

In the T5 control (TES), water depths were 15.6, 14.5, 14.4 and 14.3 cm in the 1st, 2nd, 3rd and 4th auxiliary irrigation; a total of 73.5 cm was applied, which represents 7350 m³ ha⁻¹ of water volume with an application efficiency of 59%. Ojeda *et al.* (2006) recorded similar values of irrigation depth in maize, and higher losses due to runoff and percolation. In all cases, the accumulated irrigation depth included the germination irrigation, and values were lower than the scheduled values. This occurred because

Cuadro 3. Lámina neta (Ln), Lámina bruta (Lb) y Eficiencias de aplicación (EA) en cinco tratamientos de estrés hídrico basado en fenología para cultivo de maíz, en el norte de Sinaloa, México.
Table 3. Net depth (Ln), gross depth (Lb) and application efficiencies (EA) in five phenology-based water stress treatments in maize (northern Sinaloa, Mexico).

Tratamiento	Riego	Etapas	Días al riego	GDDA	Ln (cm)	Lb (cm)	EA (%)
T1	Germinación	Siembra	0	0	10.0	17.0	59
	1 ^{er} auxilio	V12	98	615	11.7	16.7	70
	2 ^{do} auxilio	R2	126	914	9.0	16.9	53
Total					30.7	50.6	60.7
T2	Germinación	Siembra	0	0	10.0	17.0	59
	1 ^{er} auxilio	V9	90	542	9.0	14.0	64
	2 ^{do} auxilio	R1	113	780	8.3	13.3	62
Total	3 ^{er} auxilio	R3	134	1005	13.5	19.0	71
					40.8	63.3	64.0
T3	Germinación	Siembra	0	0	10.0	17.0	59
	1 ^{er} auxilio	V-7	76	435	7.5	11.5	65
	2 ^{do} auxilio	V-12	99	626	8.6	13.0	66
	3 ^{er} auxilio	R1	113	780	6.3	9.0	70
Total	4 ^{to} auxilio	R3	134	1005	10.2	14.5	70
					42.6	65.0	66.0
T4	Germinación	Siembra	0	0	10.0	17.0	59
	1 ^{er} auxilio	V-5	62	364	6.5	10.0	65
	2 ^{do} auxilio	V-12	98	615	9.0	12.9	70
	3 ^{er} auxilio	R1	113	780	6.3	9.0	70
	4 ^{to} auxilio	R3	134	1005	11.7	16.5	71
Total	5 ^{to} auxilio	R4	148	1174	7.2	10.3	70
					50.7	75.7	67.5
T5 (TES)	Germinación	Siembra	0	0	5.5	14.7	37
	1 ^{er} auxilio	V-7	76	435	7.8	15.6	50
	2 ^{do} auxilio	V-12	99	626	9.0	14.5	62
	3 ^{er} auxilio	R1	113	780	9.8	14.4	68
Total	4 ^{to} auxilio	R3	134	1005	10.8	14.3	76
					42.9	73.5	58.6

y 5^{to} riego de auxilio, con una lámina acumulada de 75.7 cm y una EA de 67%. La lámina aplicada en este tratamiento coincidió con los resultados obtenidos por Mendoza-Pérez *et al.* (2016) con un consumo de 73.5 cm en el cultivo de maíz durante todo el ciclo agrícola.

En el control T5 (TES) las láminas fueron 15.6, 14.5, 14.4 y 14.3 cm en el 1^{er}, 2^{do}, 3^{er} y 4^{to} riego de auxilio; se aplicó un total de 73.5 cm que representa 7350 m³ ha⁻¹ de volumen de agua con una eficiencia de aplicación de 59%. Ojeda *et al.* (2006) registraron valores similares de láminas de riego en el cultivo de maíz, y pérdidas mayores por efecto de escurrimiento y percolación. En todos los casos la lámina acumulada incluyó al riego de germinación, y valores menores

the irrigation depth for germination irrigation in the design of treatments was calculated with the value considered for a soil close to PMP; but this condition did not happen in the field because the TDR monitoring indicated the presence of residual moisture.

Water productivity (PA) by treatment considered the total applied water (PALb) and the net depth required (PALn) (Figure 2). In the first indicator PALb, T3 had the highest value with 1.9 kg m⁻³, followed by T2, T4, T5 and T1 with 1.8, 1.7, 1.6 and 1.3 kg m⁻³, respectively. In the second indicator PALn, T2, T3 and T5 had respectively similar values (2.8, 2.9 and 2.8 kg m⁻³). PALb values observed by Giménez *et al.* (2016) were in the range of 1.39 to

a los programados. Esto ocurrió porque en el diseño de tratamientos, la lámina del riego de germinación se calculó con el valor considerado para un suelo cercano a PMP, lo cual no sucedió en la práctica pues el monitoreo con el TDR indicó presencia de humedad residual.

La productividad del agua (PA) por tratamiento consideró el agua total aplicada (PALb) y la (PALn) lámina neta requerida (Figura 2). En el primer indicador para PALb, T3 tuvo el valor más alto con 1.9 kg m⁻³, seguida del T2, T4, T5 y T1 con 1.8, 1.7, 1.6 y 1.3 kg m⁻³ respectivamente. En el segundo indicador para PALn, T2, T3 y T5 tuvieron respectivamente valores similares (2.8, 2.9 y 2.8 kg m⁻³). Los valores de PALb observados por Giménez *et al.* (2016) estuvieron en el intervalo de 1.39 a 2.17 kg m⁻³. En el caso de PALn, solo los valores de T1 y T4 estuvieron dentro del intervalo registrado por el mismo autor (1.75 a 2.55 kg m⁻³), en un estudio experimental realizado bajo riego deficitario con riego por gravedad.

Estos resultados indicaron una relación directa entre EA y rendimiento, y una relación inversa con el estrés hídrico, más acentuada en T1 y T5 (TES). Este comportamiento permite afirmar que al aumentar el número de riegos sin mejorar la EA no necesariamente

2.17 kg m⁻³. In the case of PALn, only the values of T1 and T4 were within the interval recorded by the same author (1.75 to 2.55 kg m⁻³), that was an experimental study conducted under regulated deficit by surface irrigation.

These results indicated a direct relationship between EA and yield, and an inverse relationship with water stress, more accentuated in T1 and T5 (TES). This behavior allows us to affirm that increasing the number of irrigations without improving EA does not necessarily improve yield, as it was the case in T4 (five auxiliary irrigations). T3 generated a yield similar to T4 and showed the possibility of saving 1070 m³ ha⁻¹ (14.5%) in relation to T4. Although PA of T2 was slightly lower than T3, water savings were 1240 m³ ha⁻¹ (16.8%) compared to T4, without considerable reduction on yield.

The following benefits are plausible with the potentially saved volumes: 1) to have additional volumes for non-agricultural uses, such as system runoff; or establishing 14 to 16% of additional maize crop area, if considering a typical local Lb of 74 cm to irrigate 1400 to 1600 ha, for every 10 000 established hectares. It was also estimated that it is possible to reach an economic yield of approximately

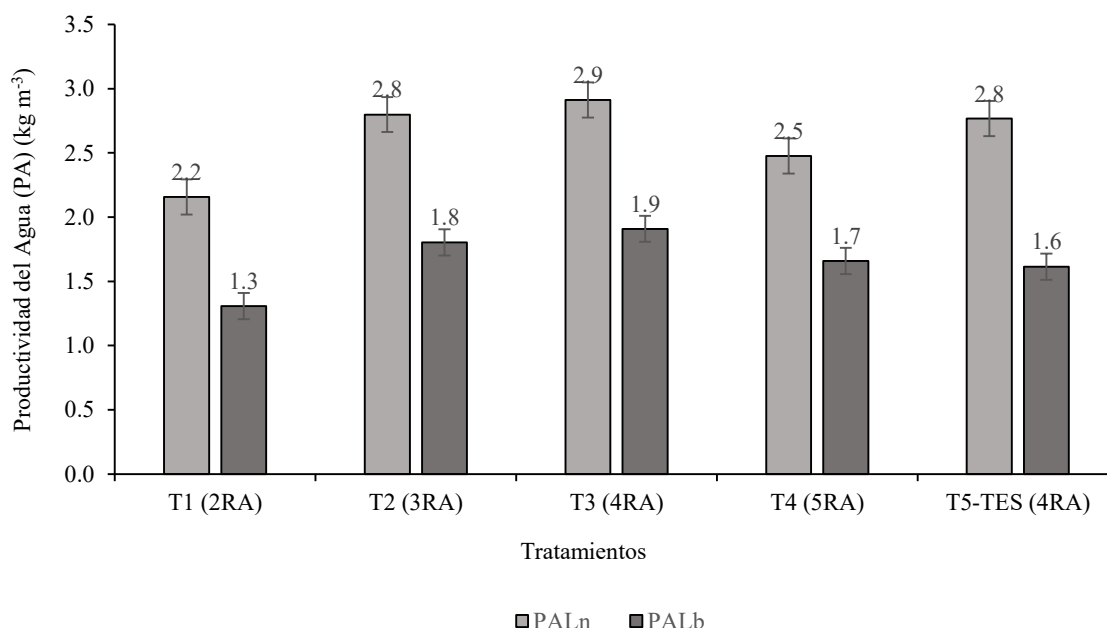


Figura 2. Productividad del agua derivada de Ln (PALn) y Lb (PALb) en cinco tratamientos de estrés hídrico basados en fenología para cultivo de maíz, en el norte de Sinaloa, México.

Figure 2. Water productivity derived from Ln (PALn) and Lb (PALb) in five phenology-based water stress treatments in maize cultivation (northern Sinaloa, Mexico).

se mejora el rendimiento, como se presentó en T4 (cinco auxilios). T3 generó un rendimiento similar a T4 y demostró la posibilidad de ahorrar 1070 m³ ha⁻¹ (14.5%) respecto al T4. Aunque la PA del T2 fue ligeramente menor a T3, el ahorro de agua fue 1240 m³ ha⁻¹ (16.8%) respecto al T4, sin reducción considerable en rendimiento.

Con los volúmenes potencialmente ahorrables, se pueden tener los siguientes beneficios: 1) contar con volúmenes adicionales para usos no agrícolas, como gasto ecológico, o establecer de 14 a 16% de superficie adicional de maíz, al considerar una Lb típica local de 74 cm para regar de 1400 a 1600 ha, por cada 10 000 establecidas. También se estimó que con la superficie adicional es posible tener un rendimiento económico del orden de 84.4 millones de MXN pesos (3.96 millones USD) según datos del ciclo agrícola 2018-2019, y 2) reducción de costos de producción por hectárea de 5 y 6% para los escenarios con número menor de riegos de auxilio, con 4 (70 USD) y con 3 (94 USD).

Relación humedad del suelo - rendimiento

El rendimiento de grano medido (Ya) y la variación de rendimiento (ΔY) se asociaron con el déficit de humedad del suelo causado en cada tratamiento (Cuadro 4). El rendimiento más bajo fue para T1 con 6.62 Mg ha⁻¹, lo cual significó una reducción del 44% respecto al TES donde el rendimiento fue 11.87 Mg ha⁻¹. En T2 el rendimiento fue 11.42 Mg ha⁻¹, una reducción de solo 3.79% comparado con TES. Los rendimientos del T3 y T4, que junto con TES son los escenarios más comunes de manejo del riego en la zona, fueron similares con 12.41 y 12.56 Mg ha⁻¹, los cuales representan aumentos respectivos de 4.55 y 5.81% comparados con TES. Entre estos tratamientos hubo diferencia estadística significativa en el rendimiento de grano (Ya).

Entre las estimaciones del contenido volumétrico de humedad del suelo (Figura 3) para los tratamientos excepto TES (porque el calendario de riegos de auxilio fue como en T3) y el contenido de humedad observado en cada uno de ellos se encontró un RMSE de 2.86%; valor que apoya la validez de la metodología. La figura también muestra la pertinencia de aprovechar el contenido de humedad del suelo en el riego inicial para disminuir Lb, y sugiere que debe considerarse la humedad al finalizar el ciclo para

84.4 million MXN pesos (3.96 million USD) with the additional area, according to data from the 2018-2019 agricultural season. Also, 2) to achieve reduction in the production costs per hectare in those scenarios with lower number of auxiliary irrigations: 5% with 4 (70 USD) and 6% with 3 (94 USD).

Soil moisture-yield relationship

Measured grain yield (Ya) and yield variation (ΔY) were associated with the soil moisture deficit caused in each treatment (Table 4). The lowest yield was for T1 with 6.62 Mg ha⁻¹, which meant a reduction of 44% in relation to TES where yield was 11.87 Mg ha⁻¹. In T2, yield was 11.42 Mg ha⁻¹, a reduction of only 3.79% compared to TES. The yields of T3 and T4, which along with TES are the most common irrigation management scenarios in the area, were similar with 12.41 and 12.56 Mg ha⁻¹, which represent respective increases of 4.55 and 5.81% compared to TES. There was significant statistical difference between these treatments in grain yield (Ya).

Between the estimations of volumetric soil moisture contents (Figure 3) for treatments (except TES, because the schedule of auxiliary irrigations was as in T3), and the actual moisture content observed in each of them, an RMSE of 2.86% was found; a value that supports confidence on the methodology. This figure also shows the relevance of taking advantage of the soil moisture content in the initial irrigation to decrease Lb and suggests that moisture at the end of the season should be considered for applying the last irrigation in advance and with a reduced Lb, in order to avoid ending the season (at maturity) with high moisture contents. This was the case of T4 and T3.

Regarding the other physiological variables measured along with Ya before harvest, the greatest negative effect caused by water stress was in T1. This negative effect resulted in 170 cm (ALP) plant height (60 to 70 cm less than those under other treatments) and a higher number of plants with no ear (PLJ).

Yield components

The treatment with the highest MF and MS in all organs was T3 (Figure 4), confirming that efficient irrigation programmed with a scientific irrigation schedule produced a favorable soil

Cuadro 4. Efecto del contenido de humedad del suelo en el rendimiento del cultivo de maíz bajo cinco tratamientos de estrés hídrico en el norte de Sinaloa, México.**Table 4. Effect of soil moisture content on maize yield under five water stress treatments in northern Sinaloa, Mexico.**

Tratamiento	Fase fenológica	HSAR (%)	HAC (%)	AHS (%)	Dr (días)	Ya (Mg ha ⁻¹)	ΔY (%)
T1	V12	37.0	11.0	73	98	6.62 c	-44.23
	R2	38.0	10.0	67	126		
	V9	37.5	10.5	70	90		
T2	R1	39.0	9.0	60	113	11.42 b	-3.79
	R3	40.0	8.0	53	134		
	V7	40.0	8.0	53	76		
T3	V12	41.0	7.0	47	98	12.41 a	+4.55
	R1	42.0	6.0	40	113		
	R3	42.0	6.0	40	134		
	V5	41.8	6.2	41	62		
T4	V12	41.9	6.1	41	98	12.56 a	+5.81
	R1	42.6	5.4	36	113		
	R3	42.8	5.2	35	134		
	R4	43.0	5.0	33	148		
T5 (TES)	V7	40	8	53	76	11.87 ab	0.00
	V12	41	7	47	98		
	R1	42	6	40	113		
	R3	42	6	40	134		

Medias con letra distintas (columna Ya) indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). HSAR: humedad volumétrica del suelo antes del riego; HAC: humedad aprovechable consumida; AHS abatimiento de humedad del suelo; Dr: días al riego; Ya: rendimiento medido; ΔY variación de rendimiento respecto al testigo. ♦ Means with different letters (Ya column) indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$). HSAR: volumetric soil moisture before irrigation; HAC: usable moisture consumed; AHS: soil moisture abatement; Dr: days to irrigation; Ya: measured yield; ΔY yield variation regarding the control.

adelantar la aplicación del último riego con una Lb reducida para evitar terminar el ciclo (madurez) con contenidos de humedad altos. Tal como se presentó en T4 y en grado menor en T3.

Respecto a las otras variables fisiológicas medidas junto con Ya antes de la cosecha, el efecto negativo mayor provocado por el estrés hídrico fue en T1. Este efecto negativo consistió en una altura de planta (ALP) de 170 cm (60 a 70 cm menor que los otros tratamientos) y un número mayor de plantas sin mazorca (PLJ).

Componentes de rendimiento

El tratamiento con la producción mayor de MF y MS de todos los órganos fue T3 (Figura 4), y se confirma que riegos eficientes programados con

moisture environment for crop development. This occurred because root asphyxia stress (lack of O₂ in the root growth zone) was reduced, and there was a direct effect on biomass production, unlike what was observed in T5 (TES). Jiménez *et al.* (2012) stated that flooding stress generated irreversible changes in plants, such as decreased membrane permeability, lipid peroxidation (oxidative reduction of lipids), degradation of chlorophyll proteins, decreased leaf expansion and stomatal closure, which causes a decrease in CO₂ in the intercellular spaces and a consequent decrease in the photosynthetic rate.

The IC is an indicator of the efficiency of the genotype to transform assimilates into kernel. Over the years, this index has increased as a result of genetic improvement and the use of improved agronomic practices (Woli *et al.*, 2016). The treatment with the

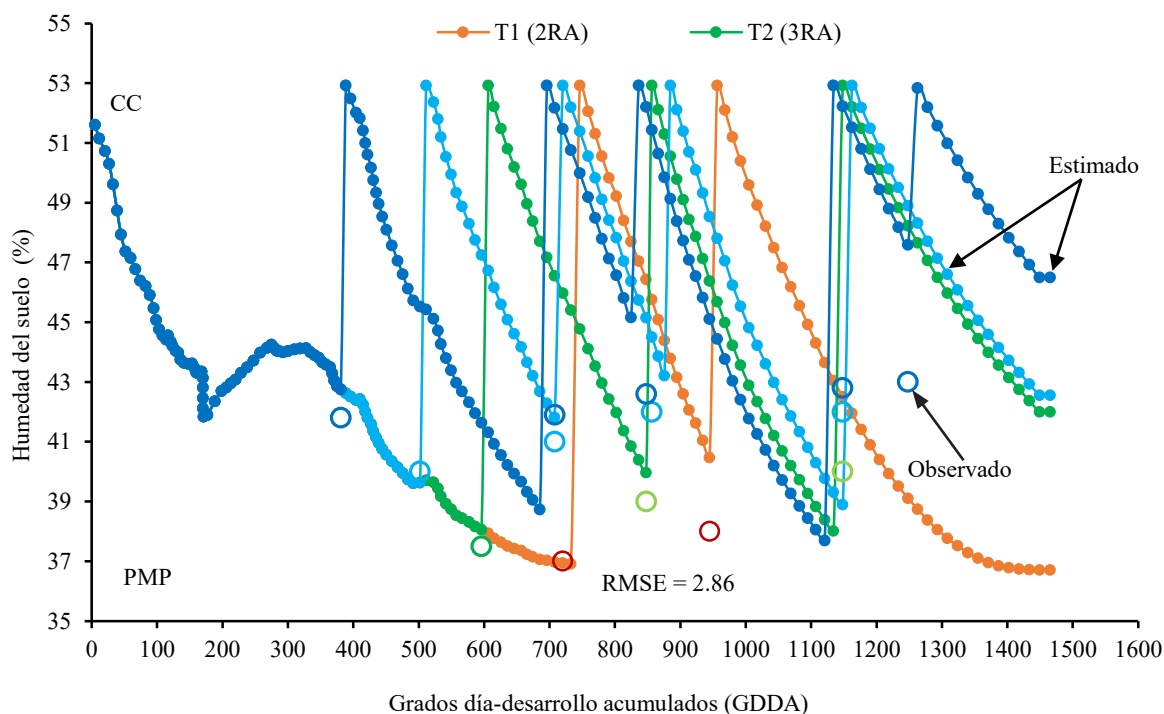


Figura 3. Variación de la humedad del suelo estimada y medida antes del riego, en maíz bajo cuatro tratamientos de estrés hídrico basados en fenología.

Figure 3. Variation of estimated and measured soil moisture before irrigation in maize under four phenology-based water stress treatments.

una calendarización científica del riego, produjeron un ambiente favorable de humedad en el suelo para el desarrollo del cultivo. Esto ocurrió porque el estrés por asfixia radical (falta de O_2 en la zona de crecimiento de las raíces) se redujo, y hubo un efecto directo en la producción de biomasa, a diferencia de lo observado en T5 (TES). Jiménez *et al.*, (2012) afirmaron que el estrés por inundación generaba en la planta cambios que pueden ser irreversibles como disminución de la permeabilidad de las membranas, peroxidación lipídica (reducción oxidativa de los lípidos), degradación de proteínas clorofílicas, disminución de la expansión foliar y cierre estomático, el cual causa disminución del CO_2 en los espacios intercelulares y la disminución consecuente en la tasa fotosintética.

El IC es un indicador de la eficiencia del genotipo para transformar los asimilados en grano. Con el paso de los años este índice se ha incrementado como resultado del mejoramiento genético y del uso de prácticas agronómicas mejoradas (Woli *et al.*, 2016). El tratamiento con el valor más bajo de IC fue T1

lowest IC value was T1 with 42% due to a lower MS in kernel production, while T4 was the highest with 50% (Figure 5). These values are similar to those reported by Abendroth *et al.* (2011), who determined that commercial maize hybrids in the U.S. corn belt have optimal average IC of 50%. These variables are very useful in the calibration and validation of crop growth simulation models, such as the AquaCrop model (Vanuytrecht *et al.*, 2014).

Relative differences (Δx)

Differences existed among treatments in the variables Ya, Lb, EA and PA (Table 5). Reducing Lb in regard to TES reduced yield; but, with a higher Lb than TES the increase in yield was not significant. This behavior was also observed in the variables EA and PA and it may be an indicator to generate water deficit management strategies for crops under agronomic management conditions and with the current genotypes of northern Sinaloa, without significant effects on yields. Segovia-Cardozo *et al.*

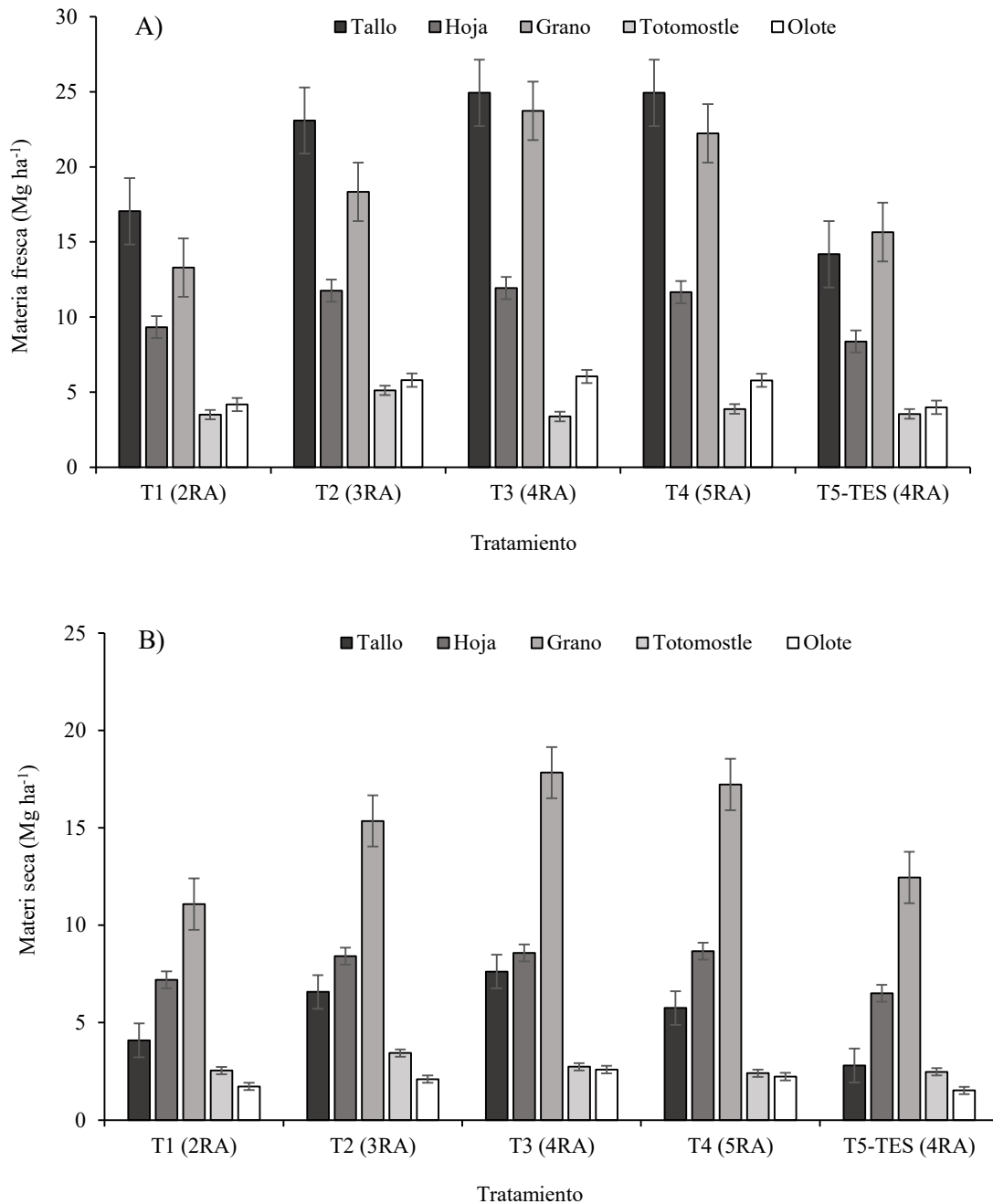


Figura 4. Producción de materia fresca (A) y materia seca (B) de cinco partes de la planta de maíz bajo cinco tratamientos de estrés hídrico basados en fenología.

Figure 4. Fresh matter (A) and dry matter (B) production of five plant parts in maize under five phenology-based water stress treatments.

con 42% debido a una producción menor de MS en grano, mientras que T4 fue el mayor con 50% (Figura 5). Estos valores son similares a los indicados por Abendroth *et al.* (2011), quienes determinaron que los híbridos de maíz comerciales en la faja maicera

(2019) evaluated four irrigation districts in Spain for four years, and the values of the ARIS indicator (Annual Relative Irrigation Supply) were greater than one, which means a supply greater than the gross requirement (Lb) that did not have an effect on yield.

de EUA presentan IC promedio óptimos de 50%. Estas variables son de gran utilidad en la calibración y validación de modelos de simulación de crecimiento de cultivos, como el modelo AquaCrop (Vanuytrecht *et al.*, 2014).

Diferencias relativas (Δx)

Diferencias existieron entre tratamientos en las variables Ya, Lb, EA y PA (Cuadro 5). Al reducir Lb respecto a TES disminuyó el rendimiento, pero con una Lb mayor a TES el aumento en rendimiento no fue significativo. Este comportamiento también se observó con las variables EA y PA, y puede ser un indicador para generar estrategias de manejo del déficit hídrico para cultivos en las condiciones de manejo agronómico y con los genotipos actuales del norte de Sinaloa, sin efectos significativos en los rendimientos. Segovia-Cardozo *et al.* (2019) evaluaron cuatro distritos de riego en España durante cuatro años, y los valores del indicador de aplicación anual relativa de riegos (Annual Relative Irrigation Supply, ARIS) fueron mayores que la unidad, lo cual representa un suministro mayor al requerimiento de la lámina bruta (Lb) y que no aportó efecto en el rendimiento.

Cuadro 5. Diferencias relativas (%) respecto al testigo de las variables rendimiento (Ya), lámina bruta (Lb), eficiencia de aplicación (EA) y productividad del agua (PA), en cuatro tratamientos de estrés hídrico basado en etapas fenológicas aplicados a maíz en el norte de Sinaloa, México.

Table 5. Relative differences (%) compared to the control in the variables yield (Ya), gross depth (Lb), application efficiency (EA) and water productivity (PA), in four water stress treatments based on phenological stages applied to maize in northern Sinaloa, Mexico.

Tratamiento	ΔYa	ΔLb	ΔEA	ΔPA
T1	-44.23	-31.16	3.39	-18.74
T2	-3.79	-13.88	8.47	9.63
T3	+4.55	-11.56	11.86	21.01
T4	+5.81	2.86	13.56	3.19

CONCLUSIONS

Our study provides technical and scientific information for irrigation management according to crop phenology in maize under water stress, which is very useful in the current scenarios in Sinaloa, Mexico. Application efficiency had a direct

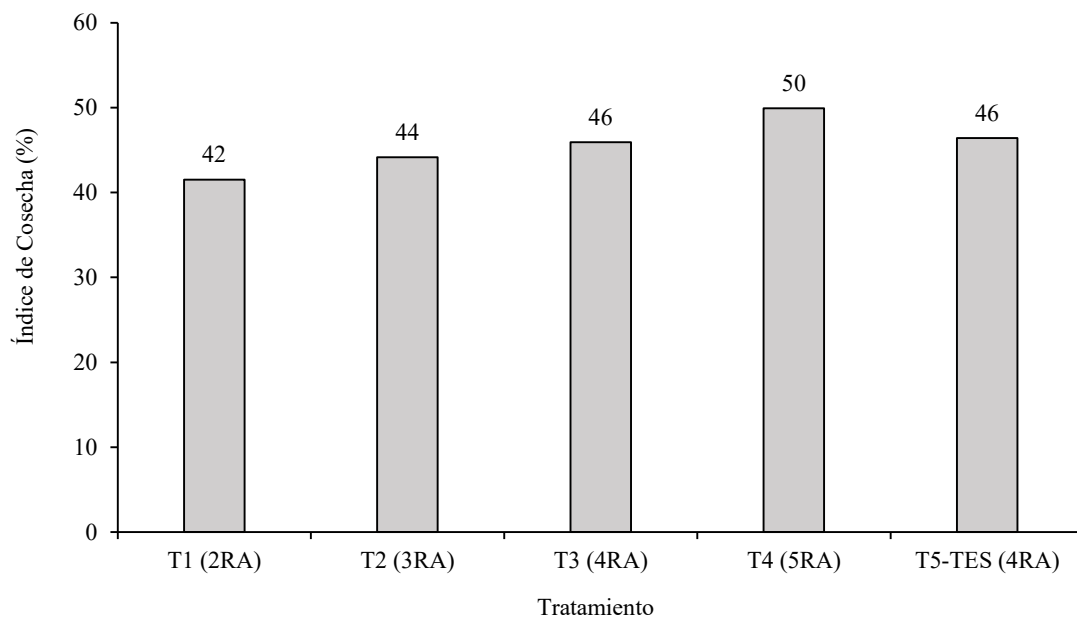


Figura 5. Índice de cosecha para cultivo de maíz con cinco tratamientos de estrés hídrico basado en etapas fenológicas, en el norte de Sinaloa, México.

Figure 5. Harvest index for maize cultivation under five water stress treatments based on phenological stages in northern Sinaloa, Mexico.

CONCLUSIONES

Este estudio aporta información técnica y científica para el manejo del riego en función de la fenología del cultivo en maíz bajo estrés hídrico, la cual resulta muy útil en los escenarios actuales en Sinaloa. La eficiencia de aplicación tuvo una relación directa con los componentes del rendimiento y una relación inversa con el estrés hídrico. La distribución de riegos basada en fenología con eficacia de aplicación igual o mayor a 64%, mejoró el rendimiento y la productividad del agua.

En condiciones locales y de disponibilidad hídrica normal se debe evitar la aplicación del quinto riego de auxilio en los suelos predominantes de la zona, porque no existe incremento significativo en rendimiento y el sobre-riego puede ser mayor a mil metros cúbicos por hectárea. Bajo condiciones de disponibilidad hídrica restringida, la mejor opción es el esquema de tres riegos de auxilio, con eficiencias de aplicación mayores a 60%, que significan más de 1.2 miles de metros cúbicos por hectárea en ahorros de agua sin reducción del rendimiento.

En todos los casos se debe aprovechar la humedad inicial del suelo a la siembra, para no terminar el ciclo del cultivo con contenidos de humedad del suelo altos. Dicha consideración reduce en forma importante las láminas brutas; en consecuencia, se mejoran la eficiencia y la productividad del agua.

LITERATURA CITADA

- Abendroth, L. J., R. W. Elmore, M. J. Boyer, and S. K. Marlay. 2011. Corn growth and development. PMR 1009. Iowa State University Extension. Ames, Iowa, EUA. 49 p.
- Barsalou, M.A., and J. Smith. 2018. Applied Statistics Manual: A Guide to Improving and Sustaining Quality with Minitab. American Society for Quality. Milwaukee, USA. 444 pp.
- Castillo C. M., y L.A. Ibáñez C. 2017. Análisis de sequías meteorológicas en la cuenca del río Fuerte, México. Tec. y Ciencias del Agua, IMTA. 8: 35-52. DOI: 10.24850/j-tyca-2017-01-03.
- Doorenbos, J., and A.H. Kassam. 1979. Yield Response to Water. FAO Irrigation and Drainage Paper No. 33. Rome, Italy. 193 p.
- Fereres, E., and M.A. Soriano. 2006. Deficit irrigation for reducing agricultural water use. J. Exp. Bot. Integrated Approaches to Sustain and Improve Plant Production Under Drought Stress, Special Issue. pp: 1-13. doi:10.1093/jxb/erl165.
- FAO (United Nations Food and Agriculture Organization). 2011. The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture, Managing Systems. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (Earthscan) Rome / London. 285 p.
- Gheysari, M., S. H. Sadeghi, H. W. Loescher, S. Amiri, M. J. Zareian, M. M. Majidi, P. Asgarinia, and J. O. Payero. 2017. Comparison of deficit irrigation management strategies on root, plant growth and biomass productivity of silage maize. Agric. Water Manage. 182: 126–138. DOI: 10.1016/j.agwat.2016.12.014
- Giménez, L., M.G. Petillo, P., Paredes, L.S., Pereira. 2016. Predicting Maize Transpiration, Water Use and Productivity for Developing Improved Supplemental Irrigation Schedules in Western Uruguay to Cope with Climate Variability. Water 8: 309. DOI: 10.3390/w8070309
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2017. Agenda Técnica Agrícola Sinaloa. INIFAP. Ciudad de México, México. 209 p. https://vun.inifap.gob.mx/VUN_MEDIA/BibliotecaWeb/_media/_agendas/4142_4839_Agenda_T%c3%a9cnica_Sinaloa_2017.pdf (Consulta: abril 2021).
- Jiménez, S. J. C., L.P. Moreno F., y S. Magnitskiy. 2012. Respuesta a las plantas a estrés por inundación. Una revisión. Rev. Colombiana Cienc. Hortíc. 6: 96-109. DOI: 10.17584/rcch.2012v6i1.1287
- Lobato S., R., y M.A. Altamirano del C. 2017. Detección de la tendencia local del cambio de la temperatura en México.

—End of the English version—



- Tec Cienc. Agua. IMTA. 8: 101-116. DOI: 10.24850/j-tyca-2017-06-07
- Mendoza-Pérez, C., I. E. Sifuentes, B. W. Ojeda, y C. J. Macías. 2016. Response of surface-irrigated corn to regulated deficit irrigation. *Ing. Agríc. Biosist.* 8: 29-40. DOI: 10.5154/r.in-agbi.2016.03.001.
- Ojeda B. W., Sifuentes I. E., y H. Unland W. 2006. Programación integral del riego en maíz en el norte de Sinaloa. *Agrociencia* 40: 13 - 25.
- Ojeda B. W., Sifuentes I. E., Íñiguez C. M., y M. Montero M. J. 2011. Impacto del cambio climático en el desarrollo y requerimiento hídrico de los cultivos. *Agrociencia*. 45:1-11.
- Olmedo V. V. M., J. L. Minjares L., E. Camacho P., M. L. Hernández H., y J. A. Rodríguez D. 2017. Uso del Análisis Envoltante de Datos (DEA) para evaluar la eficiencia de riego en los Módulos del Distrito de Riego No. 041, Río Yaqui (Sonora, México). *Análisis Envoltante de Datos (DEA) para evaluar eficiencia de riego. Rev. Fac. Cienc. Agrar. UNCUIYO* 49: 127-148.
- Paredes, P., J. P. de Melo-Abreu, I. Alves, and L. S. Pereira. 2014. Assessing the performance of the FAO AquaCrop model to estimate maize yields and water use under full and deficit irrigation with focus on model parameterization. *Agric. Water Manage.* 144: 81-97. DOI: 10.1016/j.agwat.2014.06.002.
- Rivetti A. R. 2006. Producción de maíz bajo diferentes regímenes de riego complementario en Río Cuarto, Córdoba, Argentina, I. Rendimiento en grano de maíz y sus componentes. *Rev. Fac. Cienc. Agrar. UNCUIYO*. 38: 25-36.
- Segovia-Cardozo, D. A., L. Rodríguez S., and S. Zubelzu. 2019. Water use efficiency of corn among the irrigation districts across the Duero river basin (Spain): Estimation of local crop coefficients by satellite images. *Agric. Water Manage.* 212: 241-251. DOI: 10.1016/j.agwat.2018.08.042.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Información estadística de la producción agropecuaria y pesquera mexicana. México. <http://www.siap.gob.mx/>. (Consulta: junio 2020).
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2020. Información estadística de la producción agrícola mexicana. México. <https://www.gob.mx/siap/>. (Consulta: junio 2020).
- Sifuentes I. E., y J. Macías C. 2015. "IRRIMODEL" Programación integral y gestión del riego a través de internet, manual del usuario, versión 2.0. INIFAP-CIRNO-CEVAE. Publicación especial No. 14. Juan José Ríos, Sinaloa, México. 36 p.
- Sifuentes I. E., J. Macías C., J. R. Ruelas I., P. Preciado R., W. Ojeda B., y M. A. Inzunza I. 2015. Mejoramiento del grado de uso del nitrógeno en maíz, mediante técnicas parcelarias de riego por superficie. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6:1903-1914.
- Steduto, P., T. C. Hsiao, E. Fereres, and D. Raes. 2014. Respuesta del Rendimiento de los Cultivos al Agua. Estudio FAO 66. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. 510 p.
- Stewart, J. I., R. E. Danielson, R. J. Hanks, E. B. Jackson, R. M. Hagan, W. O. Pruitt, W. T. Franklin, and J. P. Riley. 1977. Optimizing Crop Production through Control of Water and Salinity Levels in the Soil. Utah Water Lab. PRWG 151-1. Logan, Utah. 191 p.
- https://digitalcommons.usu.edu/water_rep/67 (Consulta: mayo 2021).
- Vanuytrecht, E., D. Raes, P. Steduto, T. C. Hsiao, E. Fereres, L. K. Heng L.K., M. Garcia V., and P. Mejias M. 2014. AquaCrop: FAO'S crop water productivity and yield response model. *Environm. Modelling & Software*. 62: 351-360. DOI: 10.1016/j.envsoft.2014.08.005.
- Woli, K. P., M. J. Boyer, R.W. Elmore, J. E. Sawyer, L. J. Abendroth, and D.W. Barker. 2016. Corn era hybrid response to nitrogen fertilization. *Agron. J.* 108: 495-508. DOI: 10.2134/agronj2015.0314.

***Bacillus licheniformis* M2-7 IMPROVES GROWTH, DEVELOPMENT AND YIELD OF *Capsicum annuum* L.**

***Bacillus licheniformis* M2-7 MEJORA CRECIMIENTO, DESARROLLO Y RENDIMIENTO DE *Capsicum annuum* L.**

Alejandro Bolaños-Dircio¹, Jeiry Toribio-Jiménez¹, Miguel Á. Rodríguez-Barrera¹, Giovanni Hernández-Flores², Erubiel Toledo-Hernández¹, Francisco Palemón-Alberto³, Yanet Romero-Ramírez^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Avenida Lázaro Cárdenas sin número, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, México, C. P. 39070. (yanetromero7@gmail.com). ²CONACYT-Escuela Superior de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Guerrero. Ex Hacienda San Juan Bautista S/N, Taxco el Viejo, Guerrero, México, C. P. 40323. ³Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Autónoma de Guerrero. Periférico Poniente s/n, Col. Villa de Guadalupe, Iguala de la Independencia, Guerrero, México, C.P. 40010.

ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria are known to directly or indirectly influence the development and yield of plants. Studies that show the biotechnological potential of these bacteria as biofertilizers are thus important. The objective of this study was to evaluate the growth capacities of strains M2-7 and LYA12 and define whether their interactions with *Capsicum annuum* L. increases production. The hypothesis was that the *Bacillus licheniformis* strains have capacities to promote growth and yield of *Capsicum annuum* L. First, these strains were evaluated *in vitro* in selective culture media to detect those direct or indirect mechanisms for plant growth promotion. Then, the effect of both strains on seed germination and the effect of strain M2-7 were studied on the *in vivo* development of *C. annuum* L. The experimental design was completely randomized with 3 treatments and 3 repetitions. Data was analyzed with ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Results showed that the bacterial strains were able to fix nitrogen, solubilize tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, produce gibberellins, lytic enzymes (amylases, proteases, lipases and esterases), biosurfactants, volatile compounds; and significantly inhibit growth ($p \leq 0.05$) of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum* sp. Likewise, the strains M2-7 and LYA12 increased ($p \leq 0.05$) by 89 and 78% the seed germination of *C.*

RESUMEN

De las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se sabe que influyen directa o indirectamente en el desarrollo y el rendimiento de las plantas. Por lo tanto, los estudios que demuestran el potencial biotecnológico de estas bacterias como biofertilizantes son importantes. El objetivo de este estudio fue evaluar las capacidades de crecimiento de las cepas M2-7 y LYA12 y definir si su interacción con *Capsicum annuum* L. aumenta la producción. La hipótesis fue que las cepas de *Bacillus licheniformis* cuentan con capacidades para promover el crecimiento y el rendimiento de *Capsicum annuum* L. En primer lugar, se evaluaron estas cepas *in vitro* en medios de cultivo selectivos para detectar mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal. Después, se estudió el efecto de ambas cepas en la germinación de semillas y el efecto de la cepa M2-7 en el desarrollo *in vivo* de *C. annuum* L. El diseño experimental fue completamente aleatorio con 3 tratamientos y 3 repeticiones. Los datos se analizaron con ANDEVA y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados mostraron que las cepas bacterianas tuvieron la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, producir giberelinas, enzimas líticas (amilasas, proteasas, lipasas y esterases), biosurfactantes, compuestos volátiles, e inhibir en forma significativa el crecimiento ($p \leq 0.05$) del hongo fitopatogénico *Colletotrichum* sp. Asimismo, las cepas M2-7 y LYA12 aumentaron ($p \leq 0.05$) la germinación de semillas de *C. annuum* L. en un 89 y 78%. M2-7 incrementó el peso fresco (235%), el diámetro del tallo (308%), el peso de la raíz, el número y el peso de los frutos (316%), en comparación con los tratamientos 1 (Nitrofoska) y 3 (testigo). Por lo tanto, la cepa *B. licheniformis* M2-7 es atractiva para desarrollar la formulación de biofertilizantes; en la búsqueda

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8383-4128>

Received: March, 2020. Approved: March, 2021.

Published in *Agrociencia* 55: 227-242. 2021.

annuum L. M2-7 enhanced fresh weight (235%), stem diameter (308%), root weight, number and weight of fruits (316%), as compared to treatment 1 (Nitrofoska) and 3 (Control). Therefore, *B. licheniformis* M2-7 strain is attractive to develop the formulation of biofertilizers; aiming to improve yield of some horticultural crops towards a sustainable and ecological agriculture.

Key words: rhizosphere, bacteria, *Bacillus licheniformis*, biofertilizers, *Capsicum annuum* L.

INTRODUCTION

Chemical fertilizers are essential compounds in agriculture, since they provide those nutrients that plants need for growth and yield. However, the excessive use of these fertilizers causes damage to the environment, and human chronic health damage that may manifest as cancer, degenerative lesions in the liver and kidneys, or even mutations (Torres *et al.*, 2014). Chemical fertilizers also lead to deterioration of soil quality, making management unsustainable; and, they are too expensive in terms of energy, as their production requires fossil fuels that emit greenhouse gases. Thus, the use of microorganisms selected as bio fertilizers, that contribute to plant nutrition reducing the use of chemicals, has gained great interest.

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are a group of bacteria that inhabit the rhizosphere and are able to stimulate plant growth and health (Zhou *et al.*, 2015). Effects of these bacteria promoting plant growth can occur directly through the production of phyto-stimulatory compounds (auxins, gibberellins and cytokinins), nitrogen fixation, phosphate solubilization, and iron reduction. Also, indirectly through the synthesis of compounds with antibiotic or antifungal activity that inhibit the growth of phytopathogens allowing better development of host plants (Tabassum *et al.*, 2017). Because of these versatile metabolic characteristics, PGPBs have a biotechnological potential for the formulation of inoculants; among which the bio fertilizers stand out (Myresiotis *et al.*, 2015).

A large variety of bacteria with the ability to induce plant growth are described and reported. Azoton AA Plus is a biofertilizer formulated with nitrogen fixing bacteria such as *Azospirillum brasilensis*, *Azotobacter* sp. and *Bacillus* sp. Forzasil BS was formulated on

de mejorar el rendimiento de cultivos hortícolas y de avanzar hacia una agricultura sostenible y ecológica.

Palabras clave: rizósfera, bacteria, *Bacillus licheniformis*, biofertilizantes, *Capsicum annuum* L.

INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes químicos son compuestos esenciales en la agricultura, ya que aportan aquellos nutrientes que las plantas necesitan para su crecimiento y rendimiento. Sin embargo, el uso excesivo de estos fertilizantes provoca daños al ambiente, y daños crónicos a la salud humana que pueden manifestarse como cáncer, lesiones degenerativas en hígado y riñones, o incluso mutaciones (Torres *et al.*, 2014). Los fertilizantes químicos también conducen al deterioro de la calidad del suelo, hacen su manejo insostenible, y son demasiado costosos en términos de energía, ya que su producción requiere de combustibles fósiles que emiten gases de efecto invernadero. Por ello, ha adquirido gran interés el uso de microorganismos seleccionados como biofertilizantes que contribuyen a la nutrición de las plantas al reducir el uso de productos químicos.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) son un grupo de bacterias que habitan en la rizósfera y tienen la capacidad de estimular el crecimiento y la salud de las plantas (Zhou *et al.*, 2015). Los efectos de estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden ocurrir directamente a través de la producción de compuestos fitoestimulantes (auxinas, giberelinas y citoquininas), la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la reducción de hierro. También indirectamente a través de la síntesis de compuestos con actividad antibiótica o antifúngica que inhiben el crecimiento de fitopatógenos y permiten un desarrollo mejor de las plantas anfitrión (Tabassum *et al.*, 2017). Debido a estas características metabólicas versátiles, las PGPB tienen un potencial biotecnológico para la formulación de inoculantes; entre los que destacan los biofertilizantes (Myresiotis *et al.*, 2015).

Una gran variedad de bacterias con capacidad para inducir el crecimiento vegetal ya se han descrito y presentado. Azoton AA Plus es un biofertilizante formulado con bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum brasilensis*, *Azotobacter* sp. y *Bacillus* sp. Forzasil BS se formuló con la base de *Bacillus subtilis*,

the basis of *Bacillus subtilis* and is used to control foliar and root diseases caused by bacteria and fungi in horticultural crops. Forzasil BC, formulated on *Bacillus cereus*, is used to induce germination in vegetable seeds as *Solanum lycopersicum* L.; and BACS, a bacterial complex developed on the bacteria consortium *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. amyloliquefaciens*, which is used mainly to suppress diseases and soil pests, and is able to improve horticultural crop yields (<http://cosustenta.com/catalogo.html>).

Chili (*Capsicum annuum* L.) is one of the most important agricultural crops in Mexico whose profitability and nutrient content are high, as well as its consumption and planted area are extensive. Besides, it is one of the products with greater economic value worldwide (García-Gaytán *et al.*, 2017). Mexico ranks as the main exporter of green chili on an international scale, and is the second largest producer in the world (Santoyo *et al.*, 2012).

As it was aforementioned, the genus *Bacillus* contains bacterial species that promote plant growth. In addition, their ability to produce spores allows them to survive for long periods until they find optimal conditions in the environment. They are then suitable candidates to produce bio inoculants that can decrease or eliminate the use of chemical fertilizers (Santoyo *et al.*, 2012). The *B. licheniformis* strain M2-7 was isolated from the state of Guerrero, due to its capacity as a hydrocarbon degrader. Also, it was found antagonist to some phytopathogens, thus becoming an industrially important bacterial species (Guevara-Luna *et al.*, 2018; Rojas-Aparicio *et al.*, 2018).

Selected strains were the M2-7 strain, and the LYA12 strain, derived from the M2-7 with a genetic modification in the *csrA* gene. In order to corroborate whether M2-7 and LYA12 can be used in industrial formulations to obtain optimal and effective biological products that allow improving the horticultural production of food, in this study we evaluated M2-7 and LYA12 strain direct and indirect mechanisms that stimulate plant growth under *in vitro* conditions, along with their effect in germination of *C. annuum* seeds, and the capacity of M2-7 strain to stimulate chili growth and yield under greenhouse conditions.

y se utiliza para el control de enfermedades foliares y radicales causadas por bacterias y hongos en cultivos hortícolas. Forzasil BC, formulado a partir de *Bacillus cereus*, se utiliza para inducir la germinación de semillas de hortalizas como *Solanum lycopersicum* L.; y BACS, un complejo bacteriano desarrollado con el consorcio de bacterias *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens*, que se utiliza principalmente para suprimir las enfermedades y plagas del suelo, y logra mejorar el rendimiento de los cultivos hortícolas (<http://cosustenta.com/catalogo.html>).

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos agrícolas más importantes en México porque su rentabilidad y contenido de nutrientes son altos; así como su consumo y superficie sembrada son extensos. Además, es uno de los productos con valor económico mayor a nivel mundial (García-Gaytán *et al.*, 2017). México se ubica como el exportador principal de chile verde a nivel internacional, y es el segundo productor mundial (Santoyo *et al.*, 2012).

Como se mencionó antes, el género *Bacillus* contiene especies bacterianas que favorecen el crecimiento vegetal. Adicionalmente, su capacidad de producir esporas les permite sobrevivir durante largos períodos hasta encontrar las condiciones óptimas en el ambiente. Entonces son candidatos adecuados para producir bioinoculantes que pueden disminuir o eliminar el uso de fertilizantes químicos (Santoyo *et al.*, 2012). La cepa M2-7 de *B. licheniformis* se aisló en el estado de Guerrero, debido a su capacidad como degradador de hidrocarburos. También porque se encontró como antagonista de fitopatógenos y se convirtió en una especie bacteriana de importancia industrial (Guevara-Luna *et al.*, 2018; Rojas-Aparicio *et al.*, 2018).

Las cepas seleccionadas fueron la cepa M2-7 y la cepa LYA12, derivada de la M2-7 con una modificación genética en el gen *csrA*. Con el fin de corroborar si M2-7 y LYA12 se pueden usar en formulaciones industriales para obtener productos biológicos óptimos y eficaces que permitan mejorar la producción hortícola de alimentos, en este estudio se evaluaron los mecanismos directos e indirectos de las cepas M2-7 y LYA12 que estimulan el crecimiento de las plantas en condiciones *in vitro*, junto con su efecto en la germinación de semillas de *C. annuum*, y la

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Strains M2-7 and LYA12 (derived from M2-7 with a genetic modification in the *csrA* gene), were obtained from Colección del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental (Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Univ. Autón. de Guerrero; Chilpancingo, Guerrero, México) and were used in this study. The strains were grown on Luria Bertani (LB) broth, with the following composition (g L⁻¹): 10.0 casein peptone, 5.0 yeast extract, 10.0 NaCl, with a final 7.3 pH, and incubated at 180 rpm for 24 h at 37 °C. Spectinomycin was used for the modified strain (100 mgL⁻¹). Once the incubation time had finished, they were centrifuged 10 min at 16 543 x g RCF (Relative Centrifugal Force), the supernatants were collected and homogenized with 3 mL of saline at a concentration of 0.9%. Each solution was compared with a McFarland standard (DO₆₀₀=0.5) and subsequently used in the detection of plant promotion mechanisms.

Biological nitrogen fixation

Strains M2-7 and LYA12 were grown and triplicated in modified Rennie medium (Rennie, 1980) with the following composition: solution A 0.25 NaMoO₄•2H₂O, 0.8 K₂HPO₄, 0.2 KH₂PO₄, 0.1 NaCl, 5.0 mannitol, 5.0 sucrose, 0.5 mL sodium lactate (60% v/v), 800 mL distilled water; solution B: 0.2 MgSO₄•7H₂O, 0.06 CaCl₂, 100 mL distilled water; solution C: 20.0 agarose and 100 mL distilled water. Plates were incubated 24 h at 30 °C. *Azotobacter vinelandii* was the positive control, and the negative control was the strain *Escherichia coli* omega 2.

Production of gibberellins

The bacterial strains were cultivated in tryptic soy glucose broth (composition, gL⁻¹: 17.0 peptone of casein, 3.0 peptone of soybean meal, 5.0 NaCl, 2.5 K₂HPO₄, 2.5 glucose and 20.0 dexterosus anhydrous) and incubated 96 h at 30 °C at 180 rpm. Afterwards, on an ELISA plate, 75 µL of the bacterial culture and 150 µL of Folling-Wu reagent were added; this test was carried out in triplicate. *Bacillus subtilis* was used as a positive control, and the *Escherichia coli* omega 2 strain was the negative control.

Phosphate solubilization

Qualitative determination of the solubilization of inorganic phosphate was carried out in triplicate by solid NBRIP culture medium with the following composition (g L⁻¹): 10.0 glucose,

capacidad de la cepa M2-7 para estimular el crecimiento y el rendimiento del chile en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas M2-7 y LYA12 (derivada de M2-7 con una modificación genética en el gen *csrA*) utilizadas en este estudio se obtuvieron de la Colección del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental (Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Univ. Autón. de Guerrero; Chilpancingo, Guerrero, México). Las cepas se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB), con la siguiente composición (g L⁻¹): 10.0 de peptona de caseína, 5.0 de extracto de levadura, 10.0 de NaCl, con un pH final de 7.3, y se incubaron a 180 rpm durante 24 h a 37 °C. La espectinomicina se utilizó para la cepa modificada (100 mgL⁻¹). Una vez finalizado el tiempo de incubación, se centrifugaron por 10 min a 16 543 x g RCF (Relative Centrifugal Force), se recogieron los sobrenadantes y se homogeneizaron con 3 mL de solución salina con una concentración del 0.9%. Cada solución se comparó con un estándar McFarland (DO₆₀₀=0.5) y después se utilizó en la detección de los mecanismos de promoción de las plantas.

Fijación biológica de nitrógeno

Las cepas M2-7 y LYA12 se cultivaron y triplicaron en medio Rennie modificado (Rennie, 1980) con la siguiente composición: solución A 0.25 NaMoO₄•2H₂O, 0.8 de K₂HPO₄, 0.2 de KH₂PO₄, 0.1 de NaCl, 5.0 de manitol, 5.0 de sacarosa, 0.5 mL de lactato de sodio (60% v/v), 800 mL de agua destilada; solución B: 0.2 de MgSO₄•7H₂O, 0.06 de CaCl₂, 100 mL de agua destilada; solución C: 20.0 de agarosa y 100 mL de agua destilada. Las placas se incubaron 24 h a 30 °C. *Azotobacter vinelandii* fue el testigo positivo, y el testigo negativo fue la cepa *Escherichia coli* omega 2.

Producción de giberelinas

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo de glucosa de soya trípica (composición, gL⁻¹: 17.0 de peptona de caseína, 3.0 de peptona de harina de soya, 5.0 de NaCl, 2.5 de K₂HPO₄, 2.5 de glucosa y 20.0 de dextrosa anhidra) y se incubaron 96 h a 30 °C a 180 rpm. Después, en una placa ELISA, se añadieron 75 µl del cultivo bacteriano y 150 µl del reactivo de Folling-Wu; esta prueba se realizó por triplicado. *Bacillus subtilis* se utilizó como testigo positivo, y la cepa *Escherichia coli* omega 2 como testigo negativo.

5.0 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5.0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 KCl, 0.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.025 bromophenol blue, 17.0 bacteriological agar with a final pH 7.0; strains were grown by stinging and incubated at 30 °C for 72 h. *Azotobacter vinelandii* was the positive control, and *Escherichia coli* omega 2 was the negative control. To determine the Phosphate Solubilizer Efficacy (PSE) of bacterial strains the formula proposed by Gonzalez-Mancilla *et al.* (2016) was used. To record the corresponding diameters a conventional Vernier was used.

Siderophore production

Strains were grown in triplicate in F broth (composition in g L^{-1} : 10.0 casein peptone, 10.0 meat peptone, 1.5 K_2HPO_4 , 1.5 MgSO_4 and 10.0 mL glycerin), pH adjusted at 7.2 and incubation at 30 °C for 72 h. Later, strains were revealed under UV light in a transilluminator to observe the characteristic fluorescence of the siderophore. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was used as the positive control, and *Staphylococcus aureus* as negative.

Production of lytic enzymes

Amylases

Strains were grown in triplicate on nutrient agar (composition, g L^{-1} : 5.0 pluriptone, 3.0 meat extract, 8.0 NaCl, 15.0 agar) supplemented with 1% starch; they were incubated at 30 °C for 72 h and then 2 mL of iodine-Lugol were added for 3 min (Malleswari and Bagyanarayana, 2013).

Lipases

In triplicate, strains were grown on nutrient agar supplemented with egg lecithin and incubated at 30 °C for 48 h (Malleswari and Bagyanarayana, 2013). *Bacillus subtilis* was used as a positive control and the negative control was the medium without inoculation.

Proteases

On nutrient agar supplemented with 1% milk casein, strains were grown and incubated at 30 °C for 48 h (Malleswari and Bagyanarayana, 2013). *B. subtilis* was the positive control and *E. coli* omega 2 was the negative.

Esterases

Strains were grown in nutritive agar supplemented with CaCl_2 10.0 g L^{-1} ; they were incubated at 30 °C for 72 h and

Solubilización de fosfatos

La determinación cualitativa de la solubilización del fosfato inorgánico se realizó por triplicado en un medio de cultivo NBRIP sólido con la siguiente composición (g L^{-1}): 10.0 de glucosa, 5.0 de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5.0 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 de KCl, 0.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.025 de azul de bromofenol, 17.0 de agar bacteriológico, con un pH final de 7.0; la siembra de las cepas en las placas se hizo por pinchado y se incubaron a 30 °C durante 72 h. *Azotobacter vinelandii* fue el testigo positivo, y *Escherichia coli* omega 2 fue el testigo negativo. Para determinar la eficacia solubilizadora de fosfatos (PSE) de las cepas bacterianas se utilizó la fórmula propuesta por González-Mancilla *et al.* (2016). Para registrar los diámetros correspondientes se utilizó un Vernier convencional.

Producción de sideróforos

Las cepas se cultivaron por triplicado en caldo F (composición, g L^{-1} : 10.0 de peptona de caseína, 10.0 de peptona de carne, 1.5 de K_2HPO_4 , 1.5 de MgSO_4 y 10.0 mL de glicerina), el pH se ajustó a 7.2 e incubación a 30 °C durante 72 h. Luego, las cepas se revelaron bajo luz UV en un transiluminador para observar la fluorescencia característica del sideróforo. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se utilizó como testigo positivo, y *Staphylococcus aureus* como negativo.

Producción de enzimas líticas

Amilasas

Las cepas se cultivaron por triplicado en agar nutritivo (composición, g L^{-1} : 5.0 de pluriptone, 3.0 de extracto de carne, 8.0 de NaCl, 15.0 de agar) suplementado con 1% de almidón; se incubaron a 30 °C durante 72 h y luego se añadieron 2 mL de yodo-Lugol durante 3 min (Malleswari y Bagyanarayana, 2013).

Lipasas

Por triplicado, las cepas se cultivaron en agar nutritivo suplementado con lecitina de huevo y se incubaron a 30 °C durante 48 h (Malleswari y Bagyanarayana, 2013). *Bacillus subtilis* se utilizó como testigo positivo, y el testigo negativo fue el medio sin inocular.

Proteasas

En agar nutritivo suplementado con 1% de caseína de leche, las cepas se cultivaron y se incubaron a 30 °C durante 48 h (Malleswari y Bagyanarayana, 2013). *B. subtilis* fue el testigo positivo, y *E. coli* omega 2 fue el negativo.

subsequently at 4 °C for 48 h (Malleswari and Bagyanarayana, 2013). The positive control was *P. aeruginosa* PAO1, and the negative control was *E. coli* omega 2.

Production of biosurfactants

These strains were cultivated in triplicate in tubes with PPGAS broth (composition, g L⁻¹: 1.0 NH₄Cl₂, 1.5 KCl, 19.0 Tris-HCl, 0.8 MgSO₄, 5.0 glucose and 10.0 peptone of casein), pH was adjusted at 7.0 and incubated at 30 °C for 5 d at 180 rpm. The strain *P. aeruginosa* PAO1 was used as positive control, and the negative control was the broth without bacterial inoculum.

Antagonistic effect

It consisted in placing an explant from the active growth of the phytopathogenic fungus (*Colletotrichum* sp.) in the center of a PDA plate with the following composition (g L⁻¹): 200.0 infusion of potato, 20.0 dextrose, 15.0 bacteriological agar and pH was adjusted to 5.6. Before the placement on PDA agar, 2 mL of *B. licheniformis* cells (M2-7 or LYA12) were added. Afterwards, the plates were incubated at 30 °C for 10 d. Inhibition rate was calculated with the following formula:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(C - T) \times 100] \div C$$

where “C” is the diameter of the fungal mycelium in the negative control (without bacteria), and “T” is the diameter of the mycelium in the plates treated with the bacterial strains M2-7 and LYA12 (Ahmad *et al.*, 2017).

Production of volatile organic compounds (VOCs)

A chamber composed as the union of two polyethylene Petri dishes (5.0 cm diameter) was used. The open dishes were placed one on top of the other in such a way that they shared an empty space. In one of the dishes *Colletotrichum* sp. was grown, while in the other dish one of the bacterial strains M2-7 or LYA12 was grown. The dishes remained attached with Parafilm® wax paper for 10 d of incubation at 30 °C. The reading of the diameters to determine the one corresponding to inhibition rate was made with a conventional Vernier, using the formula proposed by Ahmad *et al.* (2017).

Seed germination test

Strains were cultured in 50 mL of nutritive broth in constant agitation at 180 rpm for 24 h at 35 °C. The cultures were centrifuged at 11 028 x g RCF for 10 min to obtain the

Esterasas

Las cepas se cultivaron en agar nutritivo suplementado con CaCl₂ 10.0 g L⁻¹; se incubaron a 30 °C durante 72 h y posteriormente a 4 °C durante 48 h (Malleswari y Bagyanarayana, 2013). El testigo positivo fue *P. aeruginosa* PAO1, y el testigo negativo fue *E. coli* omega 2.

Producción de biosurfactantes

Las cepas se cultivaron por triplicado en tubos con caldo PP-GAS (composición, g L⁻¹: 1.0 de NH₄Cl₂, 1.5 de KCl, 19.0 de Tris-HCl, 0.8 de MgSO₄, 5.0 de glucosa y 10.0 de peptona de caseína), se ajustó el pH a 7.0 y se incubó a 30 °C durante 5 d a 180 rpm. La cepa *P. aeruginosa* PAO1 se utilizó como testigo positivo, y el testigo negativo fue el caldo sin inóculo bacteriano.

Efecto antagonístico

La evaluación consistió en colocar un explante del crecimiento activo del hongo fitopatógeno (*Colletotrichum* sp.) en el centro de una placa de PDA con la siguiente composición (g L⁻¹): 200.0 de infusión de papa, 20.0 de dextrosa, 15.0 de agar bacteriológico y se ajustó el pH a 5.6. Antes de la colocación en el agar PDA, se añadieron 2 mL de células de *B. licheniformis* (M2-7 o LYA12). Después, las placas se incubaron a 30 °C durante 10 d. La tasa de inhibición se calculó con la fórmula siguiente:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(C - T) \times 100] \div C$$

donde “C” es el diámetro del micelio fúngico en el testigo negativo (sin bacterias), y “T” es el diámetro del micelio en las placas tratadas con las cepas bacterianas M2-7 y LYA12 (Ahmad *et al.*, 2017).

Producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

La cámara compuesta que se utilizó, se formó con la unión de dos placas de Petri de polietileno (5.0 cm de diámetro). Las placas abiertas se colocaron una encima de la otra de modo que compartieran un espacio vacío. En una de las placas se cultivó *Colletotrichum* sp., mientras que en la otra se cultivó una de las cepas bacterianas M2-7 o LYA12. Las placas permanecieron adheridas con papel encerado Parafilm® durante 10 d de incubación a 30 °C. La lectura de los diámetros para determinar el correspondiente a la tasa de inhibición se realizó con un Vernier convencional y se usó la fórmula propuesta por Ahmad *et al.* (2017).

cells, washed twice with sterile 0.9% saline and diluted in 2 mL of saline for counting in the Neubauer chamber. The cellular concentration was adjusted to 108 cells mL⁻¹; 50 seeds of *C. annuum* L. were used per strain to be evaluated, these were inoculated by immersion in 10 mL of the bacterial suspension and placed in agitation at 180 rpm for 2 h. As control, seeds immersed in 0.9% saline solution were used. Later they were sown in a nursery tray of 200 cavities, incubated at room temperature, and germination rate was recorded 15 d after.

Seedling inoculation and variables evaluated

One month after sowing, transplant was carried out in polyethylene bags containing 2.0 kg of sterile common soil. Pots were placed at room temperature and bacterial fertilization and inoculation was performed as follows: at the time of transplantation, plants were fertilized with 5 mL of Nitrofoska (treatment 1), 5 mL of bacterial suspension of strain M2-7 (treatment 2) and 5 mL of sterile water (treatment 3). After 30, 60 and 90 d, fertilizations and inoculations were performed with a dose of 10 mL for each treatment near the base of the plant stem with sterile syringes. Finally, the variables data registered were: height, fresh weight of the plant, stem diameter, fresh root weight, number and weight of fruits, and weight of fruits per plant.

Experimental design

The experimental design was completely randomized with 3 treatments and 3 repetitions: treatment 1 (Nitrofoska), treatment 2 (*B. licheniformis* M2-7), and treatment 3 (plants without bacterial inoculum). The experimental unit was the polyethylene bag with a chili plant. Data of height, diameter, fresh weight, fresh root weight, number and weight of fruits were analyzed with ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). The graphics were created with Excel™.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacillus licheniformis M2-7 and LYA12 fixe nitrogen, solubilize phosphates and produce gibberellins

Within the direct mechanisms evaluated on the strains tested, phosphate solubilization and production of gibberellins were observed (Table 1).

The ability of the strains M2-7 and LYA12 of *B. licheniformis* to grow in the absence of atmospheric nitrogen (N₂) was evidenced in the modified Rennie medium. The strains evaluated in this study were able

Prueba de germinación de semilla

Las cepas se cultivaron en 50 mL de caldo nutritivo en agitación constante a 180 rpm durante 24 h a 35 °C. Los cultivos se centrifugaron a 11 028 x g RCF durante 10 min para obtener las células, se lavaron dos veces con solución salina estéril al 0.9%, y se diluyeron en 2 mL de solución salina para su recuento en la cámara de Neubauer. La concentración celular se ajustó a 108 células mL⁻¹; 50 semillas de *C. annuum* L. se utilizaron por cepa para esta evaluación; se inocularon por inmersión en 10 mL de la suspensión bacteriana y se colocaron en agitación a 180 rpm durante 2 h. Como testigo se utilizaron semillas sumergidas en solución salina al 0.9%. Después, se sembraron en un semillero de 200 cavidades, se incubaron a temperatura ambiente y el porcentaje de germinación se registró a los 15 d.

Inoculación de plántulas y variables evaluadas

Después de un mes de la siembra, el trasplante se realizó en bolsas de polietileno que contenían 2.0 kg de tierra común estéril. Las macetas se colocaron a temperatura ambiente y la fertilización e inoculación bacteriana se realizó de la siguiente manera: en el momento del trasplante, las plantas se fertilizaron con 5 mL de Nitrofoska (tratamiento 1), 5 mL de suspensión bacteriana de la cepa M2-7 (tratamiento 2) y 5 mL de agua estéril (tratamiento 3). Después de 30, 60 y 90 d, se realizaron fertilizaciones e inoculaciones con dosis de 10 mL para cada tratamiento cerca de la base del tallo de la planta con jeringa estéril. Por último, los datos de las variables registradas fueron: altura, peso fresco de la planta, diámetro del tallo, peso fresco de la raíz, número y peso de los frutos, y peso de los frutos por planta.

Diseño Experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 3 tratamientos y 3 repeticiones: tratamiento 1 (Nitrofoska), tratamiento 2 (*B. licheniformis* M2-7) y tratamiento 3 (plantas sin inóculo bacteriano). La unidad experimental fue la bolsa de polietileno con una planta de chile. Los datos de altura, diámetro, peso fresco, peso fresco de la raíz, número y peso del fruto se analizaron con ANDEVA y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los gráficos se crearon con Excel™.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

M2-7 y LYA12 fijan nitrógeno, solubilizan fosfatos y producen giberelinas

Dentro de los mecanismos directos evaluados en las cepas estuvieron la solubilización del fosfato y la producción de giberelinas (Cuadro 1).

Table 1. Direct and indirect mechanisms of bacterial strain related to plant promotion capacity.**Cuadro 1. Mecanismos directos e indirectos de las cepas bacterianas relacionados con la capacidad de promoción en plantas.**

Essays	Control (+)	M2-7	LYA12	Control (-)
BNF	+	+	+	-
Phosphate solubilization	+	+	+	-
Gibberellins production	+	+	+	-
Siderophores production	+	+	+	-
Amylases	+	+	+	-
Lipases	+	+	+	-
Esterases	+	+	+	-
Proteases	+	+	+	-
BS production	+	+	+	-
VOC	+	+	+	-

+=Activity; -= Without activity; BNF= Biological nitrogen fixation; BS= Biosurfactants; VOC= Volatile organic compounds. ♦ +=Actividad; -= Sin actividad; BNF= Fijación biológica del nitrógeno; BS= Biosurfactantes; VOC= Compuestos orgánicos volátiles.

to fix nitrogen and transform it to ammonium (NH_4^+) in such a way that allowed the growth of the strains at 24 h of incubation. Nitrogen-fixing bacteria have a wide taxonomic diversity, with different life forms and association with plants (Tabassum *et al.*, 2017). Chávez-Ambriz *et al.*, (2016) reported the capability of *Bacillus* sp. MA04, *B. megaterium* MA06 and *B. subtilis* MA12 to fix nitrogen in FBN medium at 5 d of incubation. Other bacterial species that express this ability are: *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. macerans* and *B. polymyxa* (Guzmán *et al.*, 2012).

Natural solubilization of phosphates is a phenotypic character that many soil microorganisms exhibit. In this study, M2-7 and LYA12 strains showed this ability of solubilizing inorganic phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Table 1). Phosphate solubilization is expressed quantitatively by Phosphate Solubilization Efficacy (PSE). The analysis of variance for the inorganic phosphate source $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ showed statistical differences ($p \leq 0.05$) in the PSE between the positive control (*A. vinelandii*), and strains LYA12 and negative control *E. coli* (Figure 1). Likewise, the strain *B. licheniformis* M2-7 showed higher PSE ($p \leq 0.05$) respect to the modified strain (LYA12).

Phosphate solubilizing bacteria were isolated from different types of soil, including bacteria of the genus *Azotobacter*, making them potential species as bio fertilizers (Zhao *et al.*, 2014). Also, solubilizing

La capacidad de las cepas M2-7 y LYA12 de *B. licheniformis* para crecer en ausencia de nitrógeno atmosférico (N_2) fue evidente en el medio Rennie modificado. Las cepas evaluadas en este estudio fueron capaces de fijar el nitrógeno y transformarlo en amonio (NH_4^+), de tal manera que permitieron el crecimiento de las cepas a las 24 h de incubación. Las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen una diversidad taxonómica amplia con diferentes formas de vida y asociación con las plantas (Tabassum *et al.*, 2017). Chávez-Ambriz *et al.*, (2016) reportaron la capacidad de *Bacillus* sp. MA04, *B. megaterium* MA06 y *B. subtilis* MA12 para fijar nitrógeno en medio FBN a los 5 d de incubación. Otras especies bacterianas que expresan esta capacidad son: *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. macerans* y *B. polymyxa* (Guzmán *et al.*, 2012).

La solubilización natural de fosfatos es un carácter fenotípico que presentan muchos microorganismos del suelo. En este estudio, las cepas M2-7 y LYA12 mostraron esta capacidad de solubilizar fosfato inorgánico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Cuadro 1). La solubilización de fosfato se expresa cuantitativamente por la eficacia de solubilización de fosfato (PSE). El análisis de varianza para la fuente de fosfato inorgánico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mostró diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) en la PSE entre el testigo positivo (*A. vinelandii*), y las cepas LYA12 y el testigo negativo *E. coli* (Figura 1). Asimismo, la

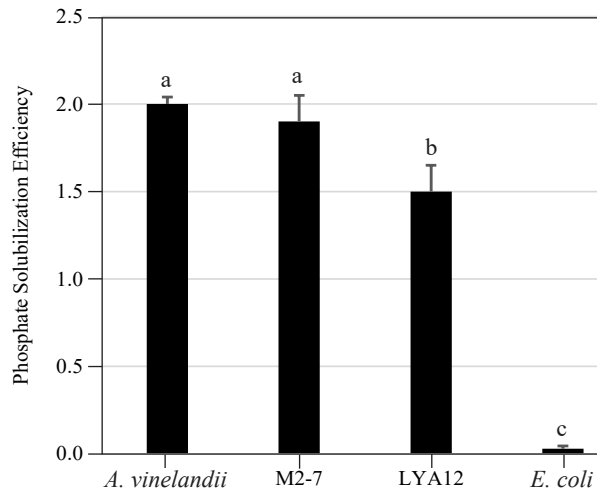


Figure 1. Phosphate Solubilization Efficiency. Values are means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters on bars indicate significant differences.

Figura 1. Eficiencia de la solubilización de fosfato. Los valores son medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

capacity of phosphates by different bacterial species of the *Bacillus* genus was reported; among them: *Bacillus circulans*; *B. megaterium* MA06 and MA17 (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016). The average of the PSE recorded by the strains M2-7 and LYA12 ranged between 2.0 and 1.5 mm. Thus, they can be classified as potential phosphate solubilizers since they have results similar to other bacteria such as *Pseudomonas* sp. and *Pantoea* sp. (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016).

The strains *B. licheniformis* M2-7 and *B. licheniformis* LYA12 were producers of gibberellins (Table 1). Camelo *et al.*, (2011) identified the gibberellins produced by *B. licheniformis* type AG1, isoAG3 and AG20, and they were cataloged as potentially active. These phytohormones mainly influence germination by interrupting the dormancy period of the seeds (Camelo *et al.*, 2011). Although these phytohormones are of great importance, the production of gibberellins by PGPB is scarce and only *B. licheniformis* and *B. pumilus* are reported as effective producers of these phytohormones (Camelo *et al.*, 2011).

cepa *B. licheniformis* M2-7 mostró una PSE mayor ($p \leq 0.05$) respecto a la cepa modificada (LYA12).

Bacterias solubilizadoras de fosfatos se aislaron en diferentes tipos de suelo, incluyendo bacterias del género *Azotobacter*, lo que las convierte en especies potenciales como biofertilizantes (Zhao *et al.*, 2014). También se reportó la capacidad de solubilización de fosfatos por especies bacterianas diferentes del género *Bacillus*, entre ellas: *Bacillus circulans*; *B. megaterium* MA06 y MA17 (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016). El promedio del PSE registrado por las cepas M2-7 y LYA12 osciló entre 2.0 y 1.5 mm. Por lo tanto, se pueden clasificar como potenciales solubilizadores de fosfato ya que tienen resultados similares a otras bacterias como *Pseudomonas* sp. y *Pantoea* sp. (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016).

Las cepas *B. licheniformis* M2-7 y *B. licheniformis* LYA12 fueron productoras de giberelinas (Cuadro 1). Camelo *et al.*, (2011) identificaron las giberelinas producidas por *B. licheniformis* tipo AG1, isoAG3 y AG20, y las catalogaron como potencialmente activas. Estas fitohormonas influyen principalmente en la germinación porque interrumpen el periodo de latencia de las semillas (Camelo *et al.*, 2011). Aunque estas fitohormonas son de gran importancia, la producción de giberelinas por parte de las PGPB es escasa y sólo *B. licheniformis* y *B. pumilus* se reportan como productores efectivos de estas fitohormonas (Camelo *et al.*, 2011).

Sideróforos, amilasas, lipasas, proteasas, esterases y biosurfactantes producidos por *Bacillus licheniformis* M2-7 y LYA12

Las cepas del género *Bacillus* fueron capaces de producir metabolitos secundarios relacionados con mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal. La producción de sideróforos se observó en el caldo F; las cepas M2-7 y LYA12 fueron capaces de producir fluorescencia, hecho que denota la cualidad de secretar moléculas de bajo peso molecular (Cuadro 1). La producción de sideróforos por bacterias promotoras del crecimiento vegetal ejerce un efecto de biocontrol al reducir la biodisponibilidad del hierro para los microorganismos fitopatógenos de la rizósfera, y con ello disminuir su colonización. Este efecto se observó con *Bacillus altitudinis* que antagonizó de manera eficiente a *Thanatephorus cucumeris* (Sunar *et al.*, 2013). *Bacillus megaterium* Jz11, *B.*

Siderophores, amylases, lipases, proteases, esterases and biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* M2-7 and LYA12

Strains of the genus *Bacillus* were able to produce secondary metabolites related to indirect mechanisms of plant growth promotion. Siderophores production was observed in the F broth; M2-7 and LYA12 strains were able to produce fluorescence, which denotes the quality of secreting low molecular weight molecules (Table 1). The production of siderophores by plant growth promoting bacteria exerts a biocontrol effect, by reducing the bioavailability of iron for the phytopathogenic microorganisms of the rhizosphere, thus decreasing their colonization. This effect was reported with *Bacillus altitudinis* which efficiently antagonized to *Thanatephorus cucumeris* (Sunar *et al.*, 2013). *Bacillus megaterium* Jz11, *B. megaterium* EJH-7 (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016), *B. altitudinis*, and *B. subtilis* (Ahmad *et al.*, 2017) are among the *Bacillus* species reported with this mechanism.

In this study *B. licheniformis* M2-7 and LYA12 were able to produce lytic enzymes such as: amylases, lipases, proteases and esterases in each selective culture medium (Table 1). Similar to *B. altitudinis* and *B. amyloliquefaciens*, other PGPB that produce enzymes (Sunar *et al.*, 2013). Also the quality of biosurfactant was observed at the supernatants of the bacterial strains M2-7 and LYA12 (Table 1). We observed that supernatants were able to reduce the surface tension, because they formed foam in the PPGAS medium.

Biosurfactants are active surface molecules, formed between the interfaces: air/water or oil/water. *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* M2-7, *B. halotolerans* BJAL and *Bacillus* sp. ANF21 are reported to produce surfactin, whose main function at physiological level is its antibiotic activity that allows them to solubilize the main components of microbial cell membranes; this gives them a greater chance of survival in ecological niches with a high competitiveness for nutrients (Ongena *et al.*, 2007).

***Bacillus licheniformis* M2-7 and LYA12 inhibited the growth of *Colletotrichum* sp.**

Dual confrontations were carried out between strains of *B. licheniformis* (M2-7 and LYA12) against *Colletotrichum* sp. Antagonism was visible due to

megaterium EJH-7 (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016), *B. altitudinis*, y *B. subtilis* (Ahmad *et al.*, 2017) son algunas de las especies de *Bacillus* reportadas con este mecanismo.

En este estudio, *B. licheniformis* M2-7 y LYA12 fueron capaces de producir enzimas líticas como amilasas, lipasas, proteasas y esterases en cada medio de cultivo selectivo (Cuadro 1). En forma similar a *B. altitudinis* y *B. amyloliquefaciens*, otras PGPB que producen enzimas (Sunar *et al.*, 2013). También se observó la cualidad biosurfactante en los sobrenadantes de las cepas bacterianas M2-7 y LYA12 (Tabla 1). Los sobrenadantes fueron capaces de reducir la tensión superficial, ya que formaron espuma en el medio PPGAS.

Los biosurfactantes son moléculas superficiales activas, formadas entre las interfaces: aire/agua o aceite/agua. De *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* M2-7, *B. halotolerans* BJAL y *Bacillus* sp. ANF21 se ha informado que producen surfactina, cuya función principal a nivel fisiológico es su actividad antibiótica que les permite solubilizar los componentes principales de las membranas celulares microbianas; esto les da una posibilidad de supervivencia mayor en nichos ecológicos con una competitividad alta por nutrientes (Ongena *et al.*, 2007).

***Bacillus licheniformis* M2-7 y LYA12 inhibieron el crecimiento de *Colletotrichum* sp.**

Enfrentamientos duales se realizaron entre cepas de *B. licheniformis* (M2-7 y LYA12) contra *Colletotrichum* sp. El antagonismo fue visible debido a la capacidad de las cepas de impedir el crecimiento radial normal del hongo fitopatógeno. Los tratamientos con las cepas bacterianas redujeron el crecimiento micelial del hongo; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas ($p \leq 0.05$), es decir, ambas cepas tienen la misma capacidad antagonica contra *Colletotrichum* sp. para evitar el crecimiento del hongo (Figura 2).

La gran capacidad antagonica de las especies del género *Bacillus* sobre los microorganismos fitopatógenos ya se ha demostrado; y se les atribuye un gran potencial como biocontrol de patógenos (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011). En cuanto a los efectos antagonicos, sobre el modo de acción de las especies de *Bacillus*, algunos autores han informado que la producción de enzimas líticas, antibióticos o metabolitos

the ability of the strains to prevent normal radial growth of the phytopathogenic fungus. Treatments with bacterial strains reduced the mycelial growth of the fungus; however, no significant differences were found between the strains ($p \leq 0.05$). That is, both strains have the same antagonistic capacity against *Colletotrichum* sp. to prevent fungus growth (Figure 2).

A great antagonistic capacity of species of the genus *Bacillus* on phytopathogenic microorganisms was proved before; and a great potential is attributed to them as biocontrol for pathogens (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011). Regarding antagonistic effects, on the mode of action of *Bacillus* species, some authors have reported that production of lytic enzymes, antibiotics or metabolites can generate changes in cytoplasmic membranes. In addition, production of fungicide compounds is widely described for *Bacillus* strains. Iturin and surfactin, antibiotics of lipopeptide nature, are the most studied as biocontrol (Touré *et al.*, 2004).

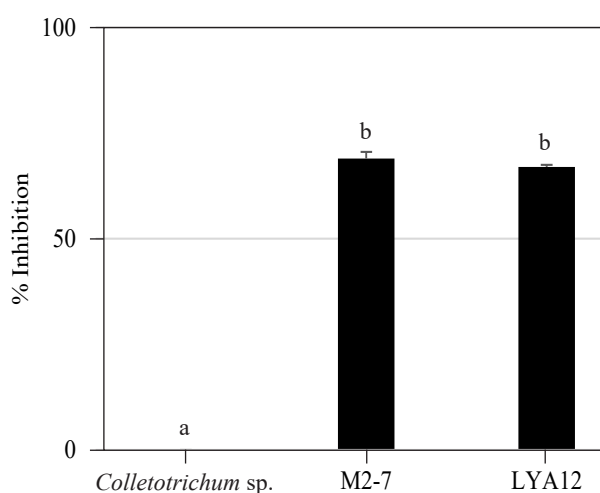


Figure 2. Percentage of inhibition by strains *Bacillus licheniformis* (M2-7 and LYA12) against *Colletotrichum* sp. Values are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters on bars indicate significant differences.

Figura 2. Porcentaje de inhibición de las cepas *Bacillus licheniformis* (M2-7 y LYA12) contra *Colletotrichum* sp. Los valores se expresan como medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

puede generar cambios en las membranas citoplasmáticas. Además, la producción de compuestos fungicidas está descrita con amplitud para las cepas de *Bacillus*. La iturina y la surfactina, antibióticos de naturaleza lipopéptida, son los más estudiados como biocontrol (Touré *et al.*, 2004).

El efecto antagónico de las cepas M2-7 y LYA12 de *B. licheniformis* se observó por los compuestos volátiles producidos sobre el crecimiento de *Colletotrichum* sp. (Cuadro 1). Las observaciones tras 10 d de incubación permitieron visualizar que el testigo (*Colletotrichum* sp. creciendo sin exposición a los compuestos volátiles de las bacterias) presentó pigmentación en el micelio. Esta pigmentación estuvo completamente ausente en las unidades experimentales ensayadas con bacterias. De acuerdo con el porcentaje de inhibición obtenido, las cepas bacterianas evaluadas inhibieron el crecimiento del hongo fitopatógeno en un 11.33% (M2-7) y un 6.66% (LYA12). Sin embargo, el crecimiento del hongo no mostró diferencias significativas entre las cepas (Figura 3).

Con frecuencia las PGPB sintetizan y liberan compuestos volátiles con función de biocontrol sobre los fitopatógenos. En nuestro estudio, las cepas bacterianas de *B. licheniformis* (M2-2 y LYA12) mostraron actividad antagónica no sólo por compuestos difundidos en el medio sino también por VOC. Aunque se ha aislado una gran diversidad de VOCs que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, aún se desconoce el papel biológico de la mayoría. Esta línea de investigación representa un campo de trabajo con gran aplicabilidad en áreas como la agricultura sostenible.

Bacillus licheniformis* M2-7 y LYA12 aumentaron la germinación de semillas de *Capsicum annuum

La germinación de las semillas de *C. annuum* en el testigo fue del 72%, mientras que las semillas inoculadas con las cepas M2-7 y LYA12 alcanzaron porcentajes de germinación del 89 y 78%, 15 d después de la siembra (Figura 4). La cepa *B. licheniformis* M2-7 mostró un porcentaje de germinación mejor ($p \leq 0.05$) que la cepa modificada (LYA12) y el testigo (semillas sin bacterias).

Bacillus es uno de los géneros bacterianos más estudiados debido a la capacidad de promover el crecimiento de plantas de cultivos de importancia económica (Myresiotis *et al.*, 2015). En nuestro estudio,

The antagonistic effect of M2-7 and LYA12 strains of *B. licheniformis* by the volatile compounds produced was observed on the growth of *Colletotrichum* sp. (Table 1). Observations after 10 d of incubation, allowed visualizing that the control (*Colletotrichum* sp. growing without exposure to the volatile compounds of the bacteria), presented pigmentation in the mycelium. This pigmentation was completely absent in those experimental units tested with bacteria. According to the percentage of inhibition obtained, evaluated bacterial strains inhibited growth of the phytopathogenic fungus by 11.33% (M2-7) and 6.66% (LYA12). However, fungus growth did not show significant differences between strains (Figure 3).

It is frequent that PGPB synthesize and release volatile compounds with a biocontrol function on phytopathogens. In our study, bacterial strains of *B. licheniformis* (M2-7 and LYA12) showed antagonistic activity not only by compounds diffusible in the medium but also by VOC. Although a great diversity of VOC have been isolated that inhibit the growth of phytopathogens, the biological role of most of them is still unknown. This line of research represents a field of work with vast applicability in areas such as sustainable agriculture.

Bacillus licheniformis* M2-7 and LYA12 increased the germination of *Capsicum annuum

Germination obtained on *C. annuum* seeds in control was 72%, while seeds inoculated with strains M2-7 and LYA12 reached germination percentages of 89 and 78%, 15 d after sowing (Figure 4). Strain *B. licheniformis* M2-7 showed a better germination percentage ($p \leq 0.05$) than the modified strain (LYA12) and the control (seeds without bacteria).

Bacillus is one of the most studied bacterial genera due to the ability to promote the growth of economically important crop plants (Myresiotis *et al.*, 2015). In our study, the bacterial strain that showed the best beneficial effect on seed germination was M2-7, followed by LYA12 (Figure 4). In this regard, Aguirre-Medina and Espinosa-Moreno (2016) evaluated the effect of four bacterial strains of the genus *Bacillus*: *Bacillus* sp. MA04, *B. megaterium* MA06, *B. subtilis* MA12 and *B. megaterium* MA17 in the germination of chili seeds and determined that strain MA06 significantly improved germination (96.83%), 15 days after sowing.

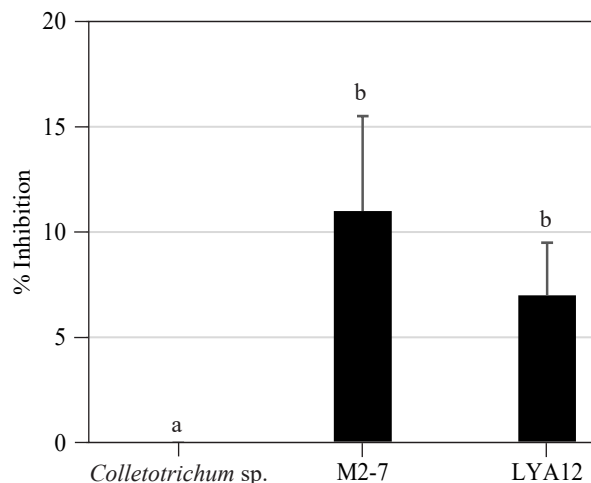


Figure 3. Percentage of inhibition by volatile compounds of the strains *Bacillus licheniformis* (M2-7 and LYA12) against *Colletotrichum* sp. Values are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters on bars indicate significant differences.

Figura 3. Porcentaje de inhibición por compuestos volátiles de las cepas *Bacillus licheniformis* (M2-7 y LYA12) contra *Colletotrichum* sp. Los valores se expresan como medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

la cepa bacteriana que mostró efecto benéfico mejor sobre la germinación de las semillas fue M2-7, seguida de LYA12 (Figura 4). Al respecto, Aguirre-Medina y Espinosa-Moreno (2016) evaluaron el efecto de cuatro cepas bacterianas del género *Bacillus*: *Bacillus* sp. MA04, *B. megaterium* MA06, *B. subtilis* MA12 y *B. megaterium* MA17 en la germinación de semillas de chile y determinaron que la cepa MA06 mejoró de modo significativo (96.83%) la germinación 15 días después de la siembra.

Bacillus licheniformis* M2-7 aumentó la producción de *C. annuum

Con respecto a la altura de la planta, el análisis de los datos mostró que la cepa M2-7 aumentó la altura en un 124.96% en comparación con el testigo. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el fertilizante químico (Cuadro 2). Las plantas inoculadas con la bacteria M2-7 alcanzaron una altura media de 78.1 cm en

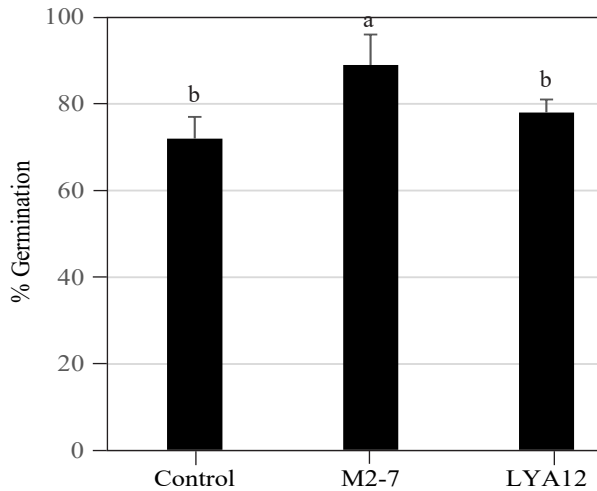


Figure 4. Germination percentage. Values are means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters on bars indicate significant differences.

Figura 4. Porcentaje de germinación. Los valores son las medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

Bacillus licheniformis M2-7 increased the production of *C. annuum*

Respect to plant height, data analysis showed that M2-7 strain increased height 124.96% compared to control. Although, there was no statistically significant difference when compared to chemical fertilizer (Table 2). Plants inoculated with the M2-7 bacteria reached an average height of 78.1 cm compared to plants with chemical fertilizer (67.4 cm) and the control (34.7 cm). In addition, the effect of inoculation with M2-7 strain was expressed on fresh

comparación con las plantas con fertilizante químico (67.4 cm) y el testigo (34.7 cm). Además, el efecto de la inoculación con la cepa M2-7 se manifestó en peso fresco, diámetro del tallo, peso de la raíz, número y peso de los frutos. En todas las variables, el tratamiento con *B. licheniformis* M2-7 mostró diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0.05$) en comparación con los otros tratamientos evaluados.

En el análisis de la variable peso fresco de la planta, la prueba de Tukey mostró que la cepa M2-7 causó el incremento mayor en biomasa de planta (56.4 g), seguida por el fertilizante químico (32.7 g), y el testigo (16.6 g). Este incremento equivale a un 235% en el tratamiento con la cepa M2-7, y un 96% de incremento en el peso de las plantas con el tratamiento de fertilizante químico, comparado con el testigo. Nuestros resultados coinciden con los documentados por Luna *et al.* (2013), quienes evaluaron el efecto de la inoculación de cuatro cepas de *Bacillus* (MA04, MA06, MA12 y MA17) en el crecimiento de plántulas de pimiento durante 2 meses. Estos autores encontraron que la cepa MA12 de *B. subtilis* indujo hasta un 37% más de biomasa en las plantas de pimiento. González-Manzilla *et al.* (2016) encontraron que la inoculación de las cepas *Rhizobium nepotum* CPAC35 y *Serratia plymuthica* CPPC55 mejoró significativamente la biomasa total de las plantas al incrementarla en un 72% a los 82 d de la siembra.

El diámetro promedio del tallo de las plantas tratadas con la cepa M2-7 (1.02 mm) mostró una diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$) respecto al tratamiento con fertilizante (0.55 mm) y al testigo (0.25 mm). Esto representa un 308% más con la cepa M2-7, y un 120% más con el fertilizante en comparación con el testigo. En otro estudio, Yau *et al.*, (2013) encontraron aumentos de diámetro debido

Table 2. Effect of strain M2-7 on the growth and yield of *C. annuum* L.

Cuadro 2. Efecto de la cepa M2-7 en el crecimiento y rendimiento de *C. annuum*.

Treatment	Height (cm)	PFW (g)	ST (mm)	RW (g)	NF	FW (g)
Fertilizer	67.4 $\pm$ 3.02a	32.78 $\pm$ 6.31b	0.55 $\pm$ 0.08b	6.2 $\pm$ 1.05b	3.5 $\pm$ 0.50b	18.61 $\pm$ 2.67b
M2-7	78.13 $\pm$ 4.05a	56.00 $\pm$ 4.22a	1.02 $\pm$ 0.40a	13.61 $\pm$ 1.98a	7.5 $\pm$ 1.22a	46.17 $\pm$ 11.46a
Control	34.73 $\pm$ 14.35b	16.67 $\pm$ 16.67c	0.25 $\pm$ 0.14c	3.33 $\pm$ 1.33c	1.8 $\pm$ 1.26c	9.33 $\pm$ 8.18c

PFW = fresh weight of the plant; ST = stem diameter; RW = root weight; NF = number of fruits; FW: fruit weight. Values are means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters in columns indicate significant differences. ♦ PFW = peso fresco de la planta; ST = diámetro del tallo; RW = peso de raíz; NF = número de frutos; FW: peso del fruto. Los valores son medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas.

weight, stem diameter, root weight, number and weight of fruits. In all of variables, *B. licheniformis* M2-7 treatment showed statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$) compared to the other evaluated treatments.

In the analysis of the variable fresh weight of the plant, the Tukey test showed that strain M2-7 caused the greatest increase in plant biomass (56.4 g), followed by chemical fertilizer (32.7 g), and control (16.6 g). This increase is equivalent to 235% in the treatment with the M2-7 strain, and 96% increment in weight of plants with the chemical fertilizer treatment, compared to control. Our results agree with those reported by Luna *et al.* (2013), who evaluated the effect of the inoculation of four *Bacillus* strains (MA04, MA06, MA12 and MA17) on the growth of bell pepper seedlings for 2 months. They found that *B. subtilis* MA12 strain induced up to 37% more biomass in bell pepper plants. Gonzalez-Manzilla *et al.* (2016) found that the inoculation of the *Rhizobium nepotum* CPAC35 and *Serratia plymuthica* CPPC55 strains significantly improved total plant biomass by increasing it 72% at 82 d after sowing.

The average stem diameter of plants treated with M2-7 strain (1.02 mm) showed significant difference (Tukey, $p \leq 0.05$) respect to fertilizer treatment (0.55 mm) and control (0.25 mm). That represents 308% plus with strain M2-7, and 120% plus with fertilizer compared to the control. In another study, Yau *et al.*, (2013) found diameter increases due to the inoculation of *Serratia marcescens* and *Bacillus cereus* in chili plants. In our study, *B. licheniformis* M2-7 induced greater root growth in *C. annuum* plants.

The greater root development may be related to the production of indole acetic acid that modifies morphology and increases root biomass. The indole acetic acid (IAA) produced by the inoculated strains is the main metabolite that induces plant growth, by increasing cell division and tissue differentiation. Both effects expressed in a higher biomass content (Camelo *et al.*, 2011). This was corroborated by Ribaudó *et al.*, (2006), who found higher content of IAA in the tissues of plants inoculated with *Azospirillum* sp. compared to non-inoculated plants.

The average fruit yield obtained for the plants treated with *B. licheniformis* M2-7 was 7.5 and it

a la inoculación de *Serratia marcescens* y *Bacillus cereus* en plantas de chile. En nuestro estudio, *B. licheniformis* M2-7 indujo un mayor crecimiento de las raíces en las plantas de *C. annuum*.

El desarrollo mayor de las raíces puede estar relacionado con la producción de ácido indol acético que modifica la morfología y aumenta la biomasa de las raíces. El ácido indol acético (IAA) producido por las cepas inoculadas es el principal metabolito que induce el crecimiento vegetal, al aumentar la división celular y la diferenciación de los tejidos. Ambos efectos se expresan en un contenido de biomasa mayor (Camelo *et al.*, 2011). Esto fue corroborado por Ribaudó *et al.*, (2006), quienes encontraron un contenido mayor de IAA en los tejidos de las plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. en comparación con las plantas no inoculadas.

El rendimiento promedio de frutos obtenido para las plantas tratadas con *B. licheniformis* M2-7 fue de 7.5 y fue diferente ($p \leq 0.05$) al tratamiento 1 (Nitrofoska, 94%) y al tratamiento 3 (plantas sin inóculo). Este resultado coincide con lo observado por Aguirre-Medina y Espinosa-Moreno (2016) quienes encontraron que la inoculación de *Rhizophagus* y *Azospirillum* produjo alrededor de seis o siete frutos por planta de chile. Hernández-Castillo *et al.* (2014) estudiaron el efecto de tres especies de *Bacillus* en *C. annuum* 40 d después del trasplante. Encontraron que las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* (B1), *B. licheniformis* (B3) y *B. subtilis* (B13) aumentaron significativamente el crecimiento y el rendimiento del chile verde (jalapeño) en comparación con el tratamiento químico (tiabendazol 10 ml L⁻¹ de agua) y el testigo con incrementos promedio de 28 y 34.5%.

Nuestros resultados demostraron que la cepa *B. licheniformis* M2-7 tuvo un efecto promotor del crecimiento en el chile debido a todos los mecanismos directos mostrados. Estos son: la fijación biológica de nitrógeno, la producción de auxinas giberelinas, la solubilización del fosfato, y la actividad de la ACC deaminasa producida e involucrada en la biofertilización. El aislamiento y la caracterización de cepas bacterianas nuevas, promotoras del crecimiento vegetal, adaptadas a las condiciones ambientales de la región en estudio, y a especies de interés agrícola, representa una alternativa tecnológica como biofertilizantes en la producción de cultivos.

was different ($p \leq 0.05$) to treatment 1 (Nitrofoska, 94%) and treatment 3 (plants without inoculum). This result agrees with that reported by Aguirre-Medina and Espinosa-Moreno (2016) who found that the inoculation of *Rhizophagus* and *Azospirillum* produced around six or seven fruits per chili plant. Hernández-Castillo *et al.* (2014) studied the effect of three species of *Bacillus* on *C. annuum*, 40 d after transplant. They found that *Bacillus amyloliquefaciens* (B1), *B. licheniformis* (B3) and *B. subtilis* (B13) strains significantly increased growth and yield of green pepper (jalapeno), compared to the chemical treatment (thiabendazole 10 mL L⁻¹ of water) and the control with an average increases of 28 and 34.5%.

Our results demonstrated that *B. licheniformis* M2-7 strain had a growth promoting effect in chili due to all of the direct mechanisms expressed. Those are, biological nitrogen fixation, auxin gibberellins production, phosphate solubilization, and ACC activity deaminase produced and involved in biofertilization. The isolation and characterization of new bacterial strains promoting plant growth, adapted to the environmental conditions of the region under study, and to species of agricultural interest, represents a technological alternative as biofertilizers in crop production.

CONCLUSIONS

Strain M2-7 can be used in specific formulations to increase the germination percentage, production and yield of *Capsicum annuum*.

In every growth and yield variable tested, M2-7 and LYA12 strains showed increases. Also, they promoted physio-chemical, and biological benefits when compared to chemical fertilizer; thus proving their potential, as fungus biocontrol and as biofertilizer for chili plants.

LITERATURE CITED

- Aguirre-Medina, J. F., y J. A. Espinosa-Moreno. 2016. Crecimiento y rendimiento de *Capsicum annuum* L. inoculado con endomicorriza y rizobacterias. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7: 1539-1550.
- Ahmad, Z., J. Wu, L. Chen, and W. Dong. 2017. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. *Scient. Rep.* 7: 1777-1790.
- Camelo, M., S. P. Vera, y R. R. Bonilla. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Cienc. Tecnol. Agropec.* 12: 159-166.

CONCLUSIONES

La cepa M2-7 puede utilizarse en formulaciones específicas para aumentar el porcentaje de germinación, la producción y el rendimiento de *Capsicum annuum*.

En todas las variables de crecimiento y rendimiento probadas, las cepas M2-7 y LYA12 mostraron incrementos. Además, promovieron beneficios físico-químicos y biológicos en comparación con el fertilizante químico; y demostraron así su potencial como biocontrol de hongos y como biofertilizante para las plantas de chile.

—End of the English version—

---*---

- Chávez-Ambríz, L. A., A. Hernández-Morales, J. A. Cabrera-Luna, L. Luna-Martínez, y J. R. Pacheco-Aguilar. 2016. Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria spp.* (Cactaceae). *Rev. Argentina Microbiol.* 48: 333-341.
- García-Gaytán, V., F. Gómez-Merino, L. I. Trejo-Téllez, G. Baca-Castillo, and S. García-Morales. 2017. The Chilhuacle Chili (*Capsicum annuum* L.) in Mexico: Description of the variety, its cultivation, and uses. *Int J. Agron.* 2017: 1-13.
- Gonzalez-Mancilla, A., J. J. Almaraz-Suárez, R. Ferrera-Cerrato, M. P. Rodríguez-Guzmán, O. R. Taboada-Gaytán, A. Trinidad-Santos, A. Alarcón, y R. I. Arteaga-Garibay. 2016. Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.). *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33: 463-474.
- Guevara-Luna, J., P. Alvarez-Fitz, E. Ríos-Leal, M. Acevedo-Quiroz, S. Encarnación-Guevara, M. E. Moreno-Godínez, M. Castellanos-Escamilla, J. Toribio-Jiménez, and Y. Romero-Ramírez. 2018. Biotransformation of benzo[a]pyrene by the thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* M2-7. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 88.
- Guzmán, A., M. Obando, D. Rivera, y R. R. B. Buitrago. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14: 182-190.
- Hernández-Castillo, F. D., R. H. Lira-Saldivar, G. Gallegos-Morales, M. Hernández-Suárez, y S. Solís-Gaona. 2014. Biocontrol de la marchitez del chile con tres especies de *Bacillus* y su efecto en el crecimiento y rendimiento. *Phyton.* 83: 49-55.
- Luna, M. L., Martínez, P. R. A., Hernández, I. M., Arvizu, M. S. M., Pacheco, y A. J. R. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 63-69.

- Malleswari, D., and G. Bagyanarayana. 2013. Plant growth-promoting activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from medicinal and aromatic plants. *J. Pharm. Biol. Sci.* 6: 30–37.
- Myresiotis, C. K., Z. Vryzas, and E. Papadopoulou-Mourkidou. 2015. Effect of specific plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Pest. Manage. Sci.* 71: 1258–1266.
- Ongena, M., E. Jourdan, A. Adam, M. Paquot, A. Brans, B. Joris, J. L. Arpigny, and P. Thonart. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084–1090.
- Ragazzo-Sánchez, J. A., A. Robles-Cabrera, L. Lomelí-González, G. Luna-Solano, y M. Calderón-Santoyo. 2011. Selección de cepas de *Bacillus spp.* productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 17: 5–11.
- Ribaudo, C. M., E. M. Krumpholz, F. D. Cassán, R. Bottini, M. L. Cantore, and J. A. Curá. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J. Plant. Growth. Regul.* 24: 175–185.
- Rojas-Aparicio, A., J. A. Hernández-Eligio, J. Toribio-Jiménez, M. A. Rodríguez-Barrera, M. Castellanos-Escamilla, and Y. Romero-Ramírez. 2018. Genetic expression of *pobA* and *fabHB* in *Bacillus licheniformis* M2-7 in the presence of benzo[a]pyrene. *Genet. Mol. Res.* 17: 1–11.
- Santoyo, G., M. del C. Orozco-Mosqueda, and M. Govindappa. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci. Technol.* 22: 855–872.
- Tabassum, B., A. A. Khan, M. Tariq, M. Ramzan, M. S. Iqbal Khan, N. Shahid, and K. Aaliya. 2017. Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Appl. Soil. Ecol.* 121: 102–117.
- Torres, L. G., M. A. Ávila, y I. Ortiz. 2014. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Ambient. Algal.* 4: 26–46.
- Touré, Y., M. Ongena, P. Jacques, A. Guiró, and P. Thonart. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1151–1160.
- Yau, J. A., F. Diáñez, F. Marín, F. Carretero, and M. Santos. 2013. Screening and evaluation of potential biocontrol fungi and bacteria foliar endophytes against *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* on pepper. *J. Food. Agric. Environ.* 11: 490–495.
- Zhao, K., P. Penttinen, X. Zhang, X. Ao, M. Liu, X. Yu, and Q. Chen. 2014. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting Burkholderia cepacia with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiol. Res.* 169: 76–82.
- Zhou, D., X. F. Huang, J. M. Chaparro, D. V. Badri, D. K. Manter, J. M. Vivanco, and J. Gou. 2015. Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant. Soil.* 401: 259–272.

RESPUESTAS EMOCIONALES EN CONSUMIDORES DE QUESO DE ZACAZONAPAN Y PROBABILIDAD DE CONSUMO DURANTE MADURACIÓN

CONSUMER EMOTIONAL RESPONSES TO ZACAZONAPAN CHEESE AND PROBABILITY OF ACCEPTANCE DURING RIPENING

Verenice **Torres-Salas**, Arturo **Hernández-Montes***

Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Texcoco, México.
(sensorial@prodigy.net.mx)

RESUMEN

Las emociones y su medición en consumidores permiten diferenciar productos y predecir la elección del consumidor. El objetivo de este estudio fue determinar las emociones generadas por consumidores de queso de Zacazonapan, para distinguir quesos con diferentes características físicas, químicas y sensoriales, pero con la misma aceptabilidad y estimar el tiempo máximo de maduración del queso por la probabilidad de consumo cuando esta sea igual al 50%. La hipótesis por probar fue que las muestras de queso de Zacazonapan con diferencias físicas, químicas y sensoriales, a pesar de tener la misma aceptabilidad se pueden diferenciar a través de las emociones de los consumidores y la probabilidad de consumo disminuye con la maduración. Para el análisis de las variables físicas y químicas se aplicó un diseño completamente al azar, para la aceptabilidad e intensidad de emociones un diseño de bloques completos al azar, y un análisis de supervivencia para la aceptación del queso con diferente maduración. A quesos de cinco queserías (A, B, C, D y E) se les determinó pH, composición química parcial, magnitud de diferencia (d') entre dos pares de quesos, perfil descriptivo, aceptabilidad, e intensidad de emociones. Solo al queso C se le determinó vida útil sensorial; existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en las variables físicas y químicas, excepto en pH. Los quesos con aceptabilidad mayor fueron A, B, C y E. El queso A se relacionó con el atributo astringencia, B y C con cualidad arenosa, sequedad, dureza y friabilidad mientras que D y E con granulosidad, sal y cualidad masticable. Los quesos A y C con la misma aceptabilidad se diferenciaron a través de las emociones: activo, amable, amigable, seguro y tranquilo. Quesos con un tiempo de maduración mayor a 78 d presentaron una probabilidad de aceptación menor al 50%.

ABSTRACT

Emotions and their measurement in consumers allow the differentiation of products and the prediction of the consumer's choice. The objective of this study was to determine the emotions generated by cheese consumers of Zacazonapan, to distinguish cheeses with different physical, chemical and sensory characteristics, but with the same acceptability, and to estimate the maximum ripening time of the cheese by the consumption probability when the latter is equal to 50%. The hypothesis to test was that the samples of Zacazonapan cheese with physical, chemical and sensory differences, despite observed with the same acceptability can be differentiated through the emotions of the consumers, and the consumption probability decreases with the ripening. For the analysis of the physical and chemical variables, a completely randomized design was applied, for the acceptability and intensity of emotions, a design of complete randomized blocks, and an analysis of survival for the acceptance of the cheese with different ripeness. Cheeses from five dairies (A, B, C, D and E) were used to determine their pH, partial chemical composition, magnitude of difference (d') between two pairs of cheeses, descriptive profile, acceptability, and intensity of emotions. Only cheese C was analyzed to determine its sensory shelf life. There was significant difference ($p \leq 0.05$) in the physical and chemical variables, except pH. Those cheeses with highest acceptability were A, B, C and E. Cheese A was related to the attribute of astringency, B and C with gritty quality, dryness, hardness and friability, while D and E with granularity, salt and chewy quality. Cheeses A and C with the same acceptability were differentiated through the emotions: active, kind, friendly, safe and calm. Cheeses with a ripening time longer than 78 d showed an acceptance probability less than 50%.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1502-3101>

Recibido: febrero, 2020. Aprobado: febrero, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 243-259. 2021.

Key words: acceptability, sensory shelf life, artisanal cheese from Zacazonapan, analysis of emotions, Flash profile, Weibull distribution.

Palabras clave: aceptabilidad, vida útil sensorial, queso artesanal de Zacazonapan, análisis de emociones, perfil Flash, distribución Weibull.

INTRODUCCIÓN

Las emociones en las personas son reacciones fisiológicas y mentales breves e intensas centradas en un referente (King y Meiselman, 2010). La medición de las emociones en consumidores ha adquirido relevancia para la industria alimentaria, debido a que permiten diferenciar productos, predecir la elección del consumidor y usarse en mercadotecnia (Kenney y Adhikari, 2016). Los métodos utilizados para medir las emociones incluyen los fisiológicos (Verastegui-Tena *et al.*, 2019), los auto-reportes verbales (King y Meiselman, 2010) y los auto-reportes visuales (Liao *et al.*, 2015).

El EsSense Profile® es un auto-reporte verbal conformado por una lista de 39 emociones, cuyas intensidades se miden en una escala Likert de cinco puntos; además mide la aceptabilidad global para contrastar con las respuestas emocionales (King y Meiselman, 2010). Las emociones evocadas por los consumidores se han reportado en jugo de mango, bebida de naranja, galletas de chocolate y galletas de avena con diferente grado de dulzor (Kim *et al.*, 2017), y en vino (Mora *et al.*, 2018). Schouteten *et al.* (2015) investigaron la influencia de la información contenida en las etiquetas de queso Gouda sobre las emociones provocadas en consumidores, y encontraron que la mayoría de los consumidores asocian la emoción “alegre” con el queso cuya etiqueta no incluía los términos “reducido en sal o light”.

Además de la composición de un alimento y la medición de emociones que provoca, es importante evaluar la vida útil sensorial, la cual se determina por la interacción entre el alimento y el consumidor (Hough, 2010). La vida útil sensorial se basa en la probabilidad de aceptación o rechazo del producto por parte de los consumidores después de un cierto tiempo y se evalúa con un análisis de supervivencia (Hough, 2010) con distribuciones probabilísticas de tipo linear logarítmica, normal logarítmica y de Weibull (Garitta *et al.*, 2018). Ejemplos de este análisis se realizaron para queso Halloumi (Kamleh *et al.*, 2012) y queso mantecoso (Sánchez-González y Pérez, 2016).

En México se han identificado alrededor de 31 variedades de quesos artesanales, los cuales destacan

INTRODUCTION

Emotions in people are brief and intense physiological and mental reactions focused on a reference (King and Meiselman, 2010). The measurement of emotions in consumers has acquired relevance for the food industry, because it makes it possible to differentiate products, predict the choice of the consumer and be used in marketing (Kenney and Adhikari, 2016). The methods utilized to measure emotions include physiological report (Verastegui-Tena *et al.*, 2019), verbal self-report (King and Meiselman, 2010) and visual self-report (Liao *et al.*, 2015).

The EsSense Profile® is a verbal self-report conformed by a list of 39 emotions, whose intensities are measured on a Likert scale of five points. It also measures global acceptability to contrast with the emotional responses (King and Meiselman, 2010). The emotions evoked by the consumers have been reported in mango juice, orange drink, chocolate cookies and oatmeal cookies with different degrees of sweetness (Kim *et al.*, 2017), and in wine (Mora *et al.*, 2018). Schouteten *et al.* (2015) investigated the influence of Gouda cheese on the emotions provoked in consumers, and found that most of the consumers associated the emotion “glad” with the cheese whose label did not include the terms “reduced salt or light”.

In addition to the composition of a food and the measurement of emotions it provokes, it is important to evaluate the sensory shelf life, which is determined by the interaction between the food and the consumer (Hough, 2010). The sensory shelf life is based on the acceptance or rejection probabilities of the product on the part of the consumers after a certain time, and it is evaluated with an survival analysis (Hough, 2010) with logarithmic and log-normal probabilistic distributions and Weibull distribution (Garitta *et al.*, 2018). Examples of this analysis are made for Halloumi cheese (Kamleh *et al.*, 2012) and buttery cheese (Sánchez-González and Pérez, 2016).

In Mexico, approximately 31 varieties of artisanal cheese have been identified, which are outstanding for their typicity and contribute to the local agri-food self-sufficiency, maintaining the integrity of the milk-cheese agro-industrial chain, valorizing the local territorial resources and representing a cultural and gastronomic patrimony (Villegas *et al.*, 2014). This is the case of the cheese from Zacazonapan (hereafter Zacazonapan cheese), which is estimated to exist for

por su tipicidad, contribuyen a la autosuficiencia agroalimentaria local, mantienen la integridad de las cadenas agroindustriales leche-queso, valorizan los recursos territoriales locales y representan un patrimonio cultural y gastronómico (Villegas *et al.*, 2014). Este es el caso del queso de Zacazonapan, el cual se estima que tiene más de 100 años de existencia que se elabora en el suroeste del estado de México con leche cruda de vacas en libre pastoreo. La presentación del queso es un prisma rectangular, con una cara convexa cubierta con pasta de chile guajillo (Hernández-Morales, *et al.*, 2010; Villegas *et al.*, 2014) y hay referencia de que se puede consumir fresco inmediatamente después de su elaboración, o añejo hasta con un año de maduración (Hernández-Morales, *et al.*, 2011).

De acuerdo a la NMX-F-713-COFOCALEC-2005 (SE, 2005), el queso de Zacazonapan se considera añejo, por madurarse a temperatura ambiente por lo menos 30 d y que su fermentación y maduración se da a través de la microbiota nativa de la leche. El objetivo de este estudio fue determinar las emociones generadas por consumidores de queso de Zacazonapan, para distinguir quesos con diferentes características físicas, químicas y sensoriales, pero con la misma aceptabilidad y estimar el tiempo máximo de maduración del queso por la probabilidad de consumo, cuando esta sea igual al 50%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Tres piezas de queso de 1 kg se adquirieron de cinco queserías de Zacazonapan, México, codificadas como A, B, C, D y E. En cada quesería, las piezas (unidades experimentales) se obtuvieron de un lote de leche cuajada en la misma tina y se dejaron orear durante 20 d a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), antes de su análisis. Las unidades experimentales utilizadas en las tres repeticiones se elaboraron en días consecutivos. Después, las piezas se trasladaron en contenedores a una temperatura de 18 °C, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), donde se conservaron a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), en estructuras de madera para orear cubiertas con malla plástica, para evitar contacto con insectos.

Estas piezas de queso se utilizaron tanto para los análisis físicos y químicos, como para la evaluación de aceptabilidad global y emociones. Para la evaluación de la vida útil sensorial se trabajó solo con quesos de la quesería C debido a la estandarización de su proceso de elaboración, en el cual se controlan los tiempos de

more than 100 years and is made in the Southwest of the state of Mexico with raw milk from free grazing cows. The physical presentation of the cheese is a rectangular prism, with a convex side covered with a *guajillo* chili-pepper paste (Hernández-Morales *et al.*, 2010; Villegas *et al.*, 2014). There is reference that it can be consumed fresh immediately after it is made, or aged for up to one year (Hernández-Morales *et al.*, 2011).

According to the NMX-F-713-COFOCALEC-2005 (SE, 2005), the Zacazonapan cheese is considered aged, after ripen at room temperature for at least 30 d, while fermentation and ripening occur through the native microbiota of the raw milk. The objective of this study was to determine the emotions generated by the consumers of Zacazonapan cheese, to distinguish cheese presentations with different physical, chemical and sensory characteristics, but with the same acceptability, and to estimate the maximum ripening time of the cheese on consumption probability, when the latter is equal to 50%.

MATERIALS AND METHODS

Samples collection

Three pieces of cheese of 1 kg were obtained from each of five dairies at Zacazonapan, Mexico, coded and discussed hereafter as A, B, C, D and E. In each dairy, the pieces (experimental units) were obtained from a lot of milk curdled in the same tank and left to dry during 20 d at room temperature (25 ± 1 °C) before the analysis. The experimental units used in the three replications were elaborated on consecutive days. The pieces were brought in containers at 18 °C to the Departamento de Ingeniería Agroindustrial under Universidad Autónoma Chapingo (UACH). There, pieces were kept at room temperature (25 ± 1 °C), in artisanal airflow dryers, wood structures covered with plastic mesh to prevent contact with insects.

These pieces of cheese were used as part of an evaluation of global acceptability and emotions, and for the physical and chemical analyses at 20 d of ripening. For the evaluation of the sensory shelf life, only the cheeses from C-dairy were used due to the standardization of their elaboration process: resting time, curdling temperature, amount of rennet and salt, curdling and cut off time are controlled. From this C-dairy, experimental units were obtained that were kept at 15 °C and relative humidity of 85%, to get samples at 0, 30, 95, 180 and 730 d of ripening. Each piece was frozen when ripening time was completed.

reposo, temperatura de cuajado, medición de cantidad de cuajo y sal, control de tiempo de corte y trabajo de la cuajada. De esta quesería C, se obtuvieron unidades experimentales que se conservaron a 15 °C y humedad relativa de 85%, para obtener muestras a los 0, 30, 95, 180 y 730 d de maduración. Cada pieza se congeló al cumplir el tiempo de maduración, y luego se descongeló por 48 h a 15 °C antes de la evaluación. Una pieza de queso se utilizó para cada tiempo de maduración. En el análisis de las variables físicas y químicas se utilizaron tres piezas de queso de la quesería C, con una maduración de 0, 30, 95 y 180 d.

Determinación de pH y composición química parcial

El pH de las muestras se determinó con un potenciómetro Conductronic PH120 (Conductronic, Puebla, México) de acuerdo con el método descrito por Villegas (2012) y la actividad de agua (a_w) con un equipo Aqualab Serie 3 (Decagon Devices Inc., Washington, EE. UU.) por el método de Öztürk *et al.* (2018). La concentración de proteína, grasa, humedad, sal, minerales y sólidos totales se determinaron en un analizador de infrarrojo cercano FoodScan™ Lab (FOSS Analytical AB, Hillerød, Dinamarca). Las determinaciones se llevaron a cabo en tres unidades experimentales (piezas de 1 kg por triplicado) para cada uno de las cinco queserías, a los 20 d de maduración, y para los quesos de la quesería C en los cuatro tiempos de maduración (0, 30, 95 y 180 d).

Magnitud de diferencia (d')

Pruebas triangulares se realizaron con 21 panelistas consumidores de queso en intervalo de edad entre 19 a 22 años, quienes efectuaron cinco mediciones repetidas (Bi, 2006). Los pares de muestras evaluadas fueron los quesos A - B y C - D. El primer par de quesos se supuso sensorialmente igual y el segundo par diferente. En las pruebas triangulares, los seis juegos de permutaciones de las triadas de las muestras (AAB, ABA, BAA, BBA, BAB y ABB) se presentaron de forma aleatoria y balanceada a los panelistas. Cada juego de cinco mediciones repetidas se evaluó en sesiones de 30 min, y cada uno de los dos juegos de pares de quesos se evaluó en días diferentes. Cada muestra de queso (prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm) se presentó en vasos de plástico del número cero, codificados con números aleatorios de tres dígitos y se proporcionaron vasos con agua a los panelistas para enjuagar su boca entre muestras (Bi, 2006).

Perfil Flash

El método utilizado fue el descrito por Domingues *et al.* (2019) con modificaciones, las cuales consistieron en que los

Then thawed for 48 h at 15 °C according to respective ripening evaluation periods. One piece of cheese was used for each ripening time. In physical and chemical analyses with the cheese from C-dairy, three pieces of cheese were used at 0, 30, 95 and 180 d of ripening.

Determination of pH and partial chemical composition

The pH of the samples was determined with a potentiometer Conductronic PH120 (Conductronic, Puebla, Mexico) according to the method described by Villegas (2012) and the water activity (a_w) with an Aqualab Series 3 (Decagon Devices Inc., Washington, U.S.), by the method of Öztürk *et al.* (2018). Concentrations of protein, fat, moisture, salt, minerals and total solids were determined in a near infrared analyzer FoodScan™ Lab (FOSS Analytical AB, Hillerød, Denmark). Determinations were carried out in three experimental units (pieces of 1 kg in triplicate) for each one of the five dairies, at 20 d of ripening, and for the cheeses of C-dairy at four ripening times (0, 30, 95 and 180 d).

Magnitude of difference (d')

Triangular tests were made with 21 cheese consumer panelists in an age interval between 19 and 22 years, who made five repeated measurements (Bi, 2006). The pairs of samples evaluated were the cheeses A - B and C - D. The first pair of cheeses was assumed to be sensorily equal and the second pair different. In the triangular tests, the six sets of permutations of the triads of the samples (AAB, ABA, BAA, BBA, BAB and ABB) were presented randomly and balanced to the panelists. Each set of five repeated measurements was evaluated in sessions of 30 min, and each one of the two sets of pairs of cheeses was evaluated on different days. Each cheese sample (rectangular prisms of 1 x 1 x 1.5 cm) was presented in number zero plastic cups, codified with random numbers of three digits, and glasses of water were provided to the panelists to rinse their mouth between samples (Bi, 2006).

Flash Profile

The method used was that described by Domingues *et al.* (2019) with modifications, which consisted of the panelists socializing and agreeing on the list of descriptions applied in the final evaluation of the samples. Twelve cheese consumer panelists were recruited in an age interval of 20 to 38 years. Five samples were presented simultaneously to each panelist from dairies A, B, C, D and E in number zero plastic cups, and they were asked to create a list of attributes that permitted them to

panelistas socializaron y consensuaron la lista de descriptores que se aplicó en la evaluación final de las muestras. Doce panelistas consumidores de quesos se reclutaron en intervalo de edad de 20 a 38 años. A cada panelista se le presentaron cinco muestras de queserías A, B, C, D y E en vasos de plástico del número cero de manera simultánea, y se les pidió crear una lista de atributos que permitieran diferenciarlas. Después, la lista se socializó y se seleccionaron 16 atributos (aroma a vaca o ácido propiónico, aroma a leche ácida o fermentación láctica, olor a pies, granulosidad, dureza, friabilidad, cualidades arenosa y masticable, sabor ácido, sabor amargo, sabor lácteo, sequedad, sal, astringencia, residuos en boca y garganta, y resabio picante). En una segunda sesión, a cada panelista se le presentaron al mismo tiempo las cinco muestras (dos prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm de cada queso) en vasos de plástico del número cero, y se le pidió jerarquizar las muestras para cada uno de los atributos seleccionados, por medio de una escala ordinal del 1 al 5, se asignó el valor cinco a la muestra con la intensidad mayor del atributo y uno a la de intensidad menor. La jerarquización se realizó por triplicado.

Evaluación de la aceptabilidad global

Esta prueba se realizó con el método descrito por Hernández-Morales *et al.* (2010), en la localidad de Zacazonapan, México. Cien consumidores locales del queso se reclutaron (50 mujeres y 50 hombres), quienes declararon una frecuencia de consumo de al menos una vez a la semana. A cada consumidor se le presentaron las cinco muestras de queso (en prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm) en orden balanceado, en un contenedor de unicel (21.2 x 9.1 cm). Las muestras se codificaron con números aleatorios de tres dígitos y se evaluaron por cada consumidor con el uso de un formato con escalas hedónicas de 9 puntos (1 = Me disgusta extremadamente, 9 = Me gusta extremadamente), y por duplicado, en días diferentes. Los panelistas tuvieron disponibles agua y galletas Habaneras Clásicas (Gamesa®) para eliminar el sabor residual de la muestra anterior.

Frecuencia e intensidad de emociones en consumidores de queso de Zacazonapan

Después de realizar la prueba de aceptabilidad, se evaluaron las emociones generadas en los consumidores con el método descrito por King y Meiselman (2010). A cada consumidor se le presentaron las cinco muestras de queso (prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm) de forma balanceada en un contenedor de unicel (21.2 x 9.1 cm), codificadas con números aleatorios de tres dígitos y evaluadas en el orden presentado. Los consumidores locales eligieron, de las 39 emociones de la metodología EsSense Profile® todas aquellas que describieron cómo se sintieron después de

be differentiated. Next, the list was socialized and 16 attributes were selected (cow or propionic acid odor, acidified milk or lactic fermentation odor, smell of feet, granularity, hardness, friability, gritty and chewy quality, sour flavor, bitter flavor, milk flavor, dryness, salt, astringency, residues in the mouth and throat, and spicy aftertaste). In a second session, each panelist was provided with the five samples (two rectangular prisms of 1 x 1 x 1.5 cm from each cheese) in number zero plastic cups at the same time, and they were asked to rank the samples for each one of the selected attributes, using an ordinal scale of 1 to 5. The value 5 was assigned to the sample with the highest intensity of the attribute, and value 1 to that of the lowest intensity. Ranking was performed in triplicate.

Evaluation of global acceptability

This test was applied with the method described by Hernández-Morales *et al.* (2010), at Zacazonapan, Mexico. One hundred local cheese consumers were recruited (50 women and 50 men), who declared a consumption frequency of at least once a week. Each consumer was provided with the five cheese samples (in rectangular prisms of 1 x 1 x 1.5 cm) balanced in order in a Styrofoam container (21.2 x 9.1 cm). The samples were coded with random numbers of three digits and were evaluated by each consumer using a checklist with hedonic scales of 9 points (1 = Extremely dislike, 9 = Extremely like) and in duplicate, on different days. The panelists had water and cookies available (Gamesa® classic Habaneras type) to eliminate the residual taste of the previous sample.

Frequency and intensity of emotions in Zacazonapan cheese consumers

After applying the acceptability test, an evaluation was made of the emotions generated in the consumers with the method described by King and Meiselman (2010). Each consumer was provided with the five cheese samples (rectangular prisms of 1 x 1 x 1.5 cm) balanced in a Styrofoam container (21.2 x 9.1 cm), codified with random numbers of three digits and consumers evaluated samples in the order they were presented. The local consumers selected, from 39 emotions in the methodology EsSense Profile®, all those that described how they felt after consuming the Zacazonapan cheese. The list of emotions used in the evaluation was presented in a balanced form, 50% in the order A - Z and the other 50% from Z - A, to reduce the risk of bias from order of presentation. All those emotions with a frequency ≥ 30 were used to measure their intensity in duplicate, by means of a checklist with a five point scale: 1 = nothing, 2 = little, 3 = moderate, 4 = much and 5 = extremely (King and Meiselman, 2010).

consumir el queso de Zacazonapan. La lista de emociones utilizada en la evaluación se presentó en forma balanceada, 50% en el orden A - Z y el resto de Z - A, para reducir el sesgo por orden de presentación. Todas aquellas emociones con una frecuencia ≥ 30 se utilizaron para medir su intensidad por duplicado, por medio de un formato con una escala de cinco puntos: 1 = nada, 2 = poco, 3 = moderado, 4 = mucho y 5 = extremadamente (King y Meiselman, 2010).

Vida útil sensorial

La prueba se realizó con el método descrito por Hough (2010); se aplicó a 101 consumidores de queso con intervalo de edad de 17 a 69 años. Cada consumidor evaluó en forma univalente y aleatoria cinco muestras del queso C con diferente tiempo de maduración (0, 30, 95, 180 y 730 d). Las muestras fueron prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm colocadas cada una en vasos de plástico del número cero, codificados con números aleatorios de tres dígitos. Los consumidores degustaron la muestra y contestaron a la pregunta: ¿Usted normalmente consumiría este producto? y las opciones de respuestas fueron Si o No. Entre muestras tuvieron disponibilidad de agua y galletas Habaneras clásicas (Gamesa®) para realizar enjuagues.

Análisis estadístico

Variables físicas y químicas

Las variables físicas y químicas de los quesos producidos en las diferentes queserías (A, B, C, D y E) y del queso C con diferentes tiempos de maduración (0, 30, 95 y 180 d), se analizaron en un diseño completamente al azar. Un análisis de varianza (ANDEVA) se realizó y al haber evidencia para rechazar la hipótesis nula ($\alpha=0.05$), se llevó a cabo una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el uso del programa SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., 2019).

Variables sensoriales

Los datos obtenidos de las pruebas triangulares se analizaron por medio del modelo beta binomial corregido (BBC) para calcular la magnitud de diferencia (valor d') de pares de muestras. Para evaluar la diferencia entre las magnitudes obtenidas se realizó una prueba de hipótesis ($H_0: d'_1 = d'_2$) con un $\alpha=0.05$. Al final se calculó la potencia de las pruebas triangulares con mediciones repetidas y los valores d' (Bi, 2006) para estos análisis se utilizó el programa Tools¹.

Sensory shelf life

The test was carried out with the method described by Hough (2010); it was applied to 101 cheese consumers with an age interval of 17 to 69 years. Each consumer evaluated in a univalent and random form five samples of C-dairy cheese with different ripening time (0, 30, 95, 180 and 730 d). Samples were rectangular prisms of 1 x 1 x 1.5 cm each placed in number zero plastic cups, codified with random three-digit numbers. The consumers tasted the sample and answered the question: Would you normally consume this product? and the response options were Yes or No. Water and cookies (Gamesa® classic Habaneras type) were available between samples to remove the taste of the previous sample.

Statistical analysis

Physical and chemical variables

The physical and chemical variables of the cheeses produced in the different dairies (A, B, C, D and E) and C-dairy cheese with different ripening times (0, 30, 95 and 180 d) were analyzed in a completely randomized design. An analysis of variance (ANOVA) was made and when there was evidence to reject the null hypothesis ($\alpha=0.05$), a comparison of means was done with the Tukey test ($p \leq 0.05$) in SAS version 9.4 (SAS Institute, Inc., 2019).

Sensory variables

Data obtained from the triangular tests were analyzed by the corrected binomial beta model (CBB) to calculate the magnitude of difference (d' value) of pairs of samples. To evaluate the difference between the magnitudes obtained, a hypothesis test was made ($H_0: d'_1 = d'_2$) with $\alpha=0.05$. At the end, the power of the triangular tests was calculated with repeated measurements and the d' values (Bi, 2006), using the program Tools¹.

The data of global acceptability were evaluated in a design of complete randomized blocks. The blocks were the panelists and the response variable was the acceptability. To evaluate normality in the obtained data, the Kolmogórov-Smirnov test was applied. As it did not satisfy the assumption of normality, the Friedman test was applied along with multiple comparisons by pairs of means of ranks with the Nemenyi procedure, using the program XLSTAT v. 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).

Regarding the Flash Profile, the data of the three replications were analyzed in a completely randomized design to select the panelists that showed significant difference in most of the

¹The Institute for Perception. 2019. Tools IFPrograms® version 2019. Windows. Richmond, VA. USA: The Institute for Perception (con licencia de uso para autor, por el fabricante).

Los datos de la aceptabilidad global se evaluaron en un diseño en bloques completos al azar. Los bloques fueron los panelistas y la variable respuesta fue la aceptabilidad. Para evaluar la normalidad de los datos obtenidos se aplicó la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Al no cumplir con el supuesto de normalidad, se aplicó la prueba de Friedman y comparaciones múltiples por pares de medias de jerarquizaciones con el procedimiento de Nemenyi, con el programa XLSTAT versión 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).

Respecto al Perfil Flash, los datos de las tres repeticiones se analizaron en un diseño completamente al azar para seleccionar a los panelistas que mostraron diferencia significativa en la mayoría de los atributos evaluados, por medio del programa SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., 2019). Después, con los datos de los panelistas seleccionados se realizó un análisis Procrustes generalizado (APG) (Domingues *et al.*, 2019), con el programa XLSTAT versión 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).

En el caso de las emociones, la frecuencia seleccionada por los consumidores se registró para cada una de las 39 emociones. La intensidad de las emociones se analizó con un diseño en bloques completos al azar, en donde los consumidores fueron los bloques. Para evaluar la normalidad de los datos obtenidos se aplicó la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Al no cumplir con el supuesto de normalidad, se aplicó la prueba de Friedman y se hicieron comparaciones múltiples por pares de medias de jerarquizaciones con el procedimiento de Nemenyi. El análisis se llevó a cabo con el programa XLSTAT versión 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).

La determinación de la vida útil sensorial comenzó con el análisis de censura de los datos, debido a la naturaleza discreta de los tiempos de maduración; basados en las censuras, se obtuvieron los datos de inicio y fin de la aceptación, con sus frecuencias respectivas. Para realizar el análisis de supervivencia, se eligió la distribución con el ajuste de datos mejor, de acuerdo con el valor menor del estadístico Anderson Darling (AD). Las distribuciones comparadas fueron la de Weibull, normal, normal logarítmica, logística, logística logarítmica y normal logarítmica de tres parámetros (Hough, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de pH y composición química parcial

Las diferencias en las variables físicas y químicas fueron significativas. La excepción fue el pH, el cual varió de 5.29 - 5.52 (Cuadro 1). La actividad de agua (a_w) se mantuvo entre 0.902 - 0.951, todo lo cual coincide con los valores reportados por Hernández-Morales *et al.* (2010) en quesos de Zacazonapan con

attributes evaluated, with SAS v. 9.4 (SAS Institute Inc., 2019). Later, with the data of the selected panelists, a generalized Procrustes analysis (GPA) was done (Domingues *et al.*, 2019), with XLSTAT v. 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).

In the case of the emotions, the frequency selected by the consumers was registered for each one of the 39 emotions. The intensity of the emotions was analyzed with a complete randomized blocks design, in which consumers were the blocks. To evaluate the normality of the obtained data, the Kolmogórov-Smirnov test was applied. As it did not comply with the assumption of normality, the Friedman test was used and multiple comparisons were done by pairs of means of ranks with the Nemenyi procedure, with the program XLSTAT v. 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).

The determination of sensory shelf life began with the censure analysis of data, due to the discrete character of the ripening times data. Based on censures, data of start and end of acceptance were obtained, with their respective frequencies. To carry out the analysis of survival, the distribution with the best fit of data was selected, according to the lowest value of the Anderson Darling statistic (AD). Compared probability distributions were Weibull's, normal, log-normal, logistic, log-logistic and three parameter log-normal (Hough, 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of pH and partial chemical composition

The differences in the physical and chemical variables were significant. The exception was the pH, which varied from 5.29 - 5.52 (Table 1). The water activity (a_w) was maintained between 0.902 - 0.951, all of which coincides with those values reported by Hernández-Morales *et al.* (2010) in Zacazonapan cheeses with 23 - 27 d of ripening. The protein content was between 26.4 and 37.8%, and the fat content between 23.8 and 30.4%, which are comparable to those obtained by Hernández-Morales *et al.* (2010) and Villegas *et al.* (2014), who recorded protein contents of 26 to 30% and fat of 25 to 39% in this cheese. Based on the fat content, the cheeses analyzed were classified as semi-fatty ($\geq 25\%$ and $<45\%$), according to the NMX-F-713-COFOCALEC-2005 (SE, 2005).

Moisture content fluctuated between 32.43 - 40.51%, and salt content between 1.92 - 2.75%, which coincides with other researches reporting a moisture of 32 - 42% and a salt content between 1.8 - 2.8% (Hernández-Morales *et al.*, 2010 and Villegas

Cuadro 1. Variables físicas y químicas de quesos de Zacazonapan[†] con 20 d de maduración (base húmeda).
Table 1. Physical and chemical variables of Zacazonapan cheeses[†] with 20 d of ripening (wet base).

Queso	pH	a_w	Proteína (%)	Grasa (%)	Humedad (%)	Sólidos totales (%)	Sal (%)	Minerales (%)
A	5.42 ± 0.26a	0.931 ± 0.016ab	29.98 ± 1.10b	24.32 ± 2.22c	38.90 ± 2.99a	61.10 ± 2.99b	2.16 ± 0.15c	6.81 ± 0.30b
B	5.52 ± 0.06a	0.917 ± 0.010bc	29.53 ± 0.69bc	30.44 ± 1.43a	33.19 ± 2.02b	66.81 ± 2.02a	2.11 ± 0.11c	6.84 ± 0.42b
C	5.46 ± 0.06a	0.902 ± 0.004c	37.77 ± 0.41a	23.76 ± 0.43c	32.43 ± 0.80b	67.57 ± 0.80a	2.75 ± 0.02a	6.04 ± 0.20c
D	5.38 ± 0.04a	0.925 ± 0.008bc	28.83 ± 0.58c	23.59 ± 0.72c	39.29 ± 1.05a	60.70 ± 1.05b	2.59 ± 0.05b	8.28 ± 0.20a
E	5.29 ± 0.06a	0.951 ± 0.007a	26.42 ± 0.55d	26.78 ± 1.20b	40.51 ± 1.92a	59.49 ± 1.92b	1.92 ± 0.09d	6.3 ± 0.28c

[†]Valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas por columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ Average values ± standard deviation. Different letters per column indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

23 - 27 d de maduración. El contenido de proteína se encontró entre 26.4 y 37.8%, y el contenido de grasa entre 23.8 y 30.4%, los cuales son comparables a los obtenidos por Hernández-Morales *et al.* (2010) y Villegas *et al.* (2014), quienes registraron para este queso contenidos de proteína de 26 a 30% y de grasa 25 a 39%. Con base en el contenido de grasa, los quesos analizados se clasifican como semigrasos ($\geq 25\%$ y $< 45\%$), de acuerdo con la NMX-F-713-COFOCALEC-2005 (SE, 2005).

La humedad osciló entre 32.43 - 40.51% y la sal entre 1.92 - 2.75%, lo cual coincide con otras investigaciones que documentaron una humedad de 32 - 42% y un contenido de sal entre 1.8 - 2.8% (Hernández-Morales *et al.*, 2010 y Villegas *et al.*, 2014). Estas variables se relacionan de manera inversa, ya que concentraciones altas de sal favorecen la sinéresis en el queso, mientras disminuyen la a_w y la actividad microbiana (Ramírez-Navas *et al.*, 2017). Al considerar el porcentaje de humedad sin materia grasa, y acorde con la NMX-F-713-COFOCALEC-2005 (SE, 2005), los quesos evaluados se clasificaron como duros (49 - 56%) y extraduros ($< 51\%$).

En cuanto a sólidos totales, se obtuvieron valores entre 59.49 - 67.57% y un contenido de minerales de 6.04 - 8.28%. En suma, las diferencias entre cada una de las variables de respuesta pueden asociarse con la raza, alimentación y estado de lactancia de los animales, de los cuales cada productor obtiene la leche. Así mismo, el grado de estandarización del proceso se traduce en variaciones durante la manufactura y tiene efecto sobre las características del producto final (Perna *et al.*, 2014; Hernández-Morales *et al.*, 2010; Bonanno *et al.*, 2013).

et al., 2014). These variables are inversely related, given that high salt concentrations favor syneresis in the cheese, while the a_w and microbial activity are reduced (Ramírez-Navas *et al.*, 2017). Considering the percentage of moisture without fatty matter, and according to the NMX-F-713-COFOCALEC-2005 (SE, 2005), the cheeses evaluated are classified as hard (49 - 56%) and extra-hard ($< 51\%$).

With regard to total solids, values between 59.49 - 67.57% were obtained, and a mineral content of 6.04 - 8.28%. In summary, the differences between each one of the response variables can be associated to the race, feed, and stage of lactation of the animals from which each producer obtains the milk. Similarly, the degree of standardization of the process results in variations during the manufacture of the cheese and has an effect on the characteristics of the final product (Perna *et al.*, 2014; Hernández-Morales *et al.*, 2010; Bonanno *et al.*, 2013).

The physical and chemical variables showed significant statistical difference, with the exception of pH, during the ripening process of C-dairy cheese. The a_w and moisture content decreased as ripening time increased; in a_w a difference of 0.088 between 0 and 180 d (Table 2). The a_w decreased during the ripening of the cheese due to the fact that the water interacts through hydrogen bridges with the amino and carboxyl groups generated during the process of proteolysis (Ardö *et al.*, 2017). Furthermore, as salt concentration increases, the variables a_w and moisture content decrease (Ramírez-Navas *et al.*, 2017).

The percentages of total solids, protein and fat increase during the ripening period due to the fact

Las variables físicas y químicas presentaron diferencia estadística significativa, con excepción del pH, durante el proceso de maduración del queso C. La a_w y la humedad disminuyeron a medida que el tiempo de maduración aumentó, en el a_w se obtuvo una diferencia de 0.088 unidades entre el tiempo 0 y los 180 d (Cuadro 2). La a_w disminuyó durante la maduración del queso debido a que el agua interacciona por medio de puentes de hidrógeno con los grupos amino y carboxilo generados durante el proceso de proteólisis (Ardö *et al.* (2017). Además, a medida que aumenta la concentración de sal, las variables a_w y humedad disminuyen (Ramírez-Navas *et al.*, 2017).

Los porcentajes de sólidos totales, proteína y grasa aumentan durante el periodo de maduración debido a que la elaboración de un queso es un proceso en el que la caseína y la grasa de la leche se concentran unas 10 veces, según el tipo de queso. Esto depende de la temperatura, la sinéresis, la acidificación de la pasta, el trabajo mecánico, la adición de sal y el proceso de maduración (Fox *et al.*, 2015; Ramírez-Navas *et al.*, 2017). El porcentaje de minerales también aumentó a lo largo del periodo de maduración, mientras que el porcentaje de sal no presentó diferencia significativa a partir de los 30 d de maduración. Este comportamiento en el contenido de sal es similar al hallado por Kondyli, *et al.* (2016) en un queso griego después de 20 d de maduración.

Magnitud de diferencia (d')

Los pares de quesos A vs B y D vs E presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en los valores d' (Cuadro 3) indicando que las personas detectaron diferencia sensorial entre los pares de quesos. Sin embargo, al realizar la comparación de los valores d'

that the elaboration of a cheese is a process in which the casein and the fat of the milk become up to 10-fold concentrated, according to the type of cheese. This depends on temperature, syneresis, acidification of the paste, mechanical work, addition of salt and ripening process (Fox *et al.*, 2015; Ramírez-Navas *et al.*, 2017). The percentage of minerals also increased throughout ripening period, while the percentage of salt did not show significant difference after 30 d of ripening. This behavior in the salt content is similar to what was found by Kondyli *et al.* (2016) in a Greek cheese after 20 d of ripening.

Magnitude of difference (d')

The pairs of cheeses A vs B and D vs E showed significant difference ($p \leq 0.05$) in d' values (Table 3) indicating that a person detected sensory difference between the pairs of cheese. However, after doing the comparison of d' values obtained within each pair of cheeses, no significant difference was found. The powers ($1-\beta$) of the tests were of 100 and 99.8%, which indicates high probability of finding differences between the pairs of samples A vs B and D vs E (Bi, 2006).

Flash Profile

After analyzing the data of the Flash Profile, seven panelists were selected along with eight attributes that allowed to differentiate the cheeses. In the APG the optimum transformation of the consensus matrix indicated that it was sufficient to retain the first two components, which explained 81% of the total variability of the data. The first explained 64.48%, and the attributes that contributed with the higher

Cuadro 2. Características físicas y químicas del queso de Zacazonapan[†] con 0, 30, 95 y 180 d de maduración (base húmeda).
Table 2. Physical and chemical characteristics of Zacazonapan cheese[†] with 0, 30, 95 and 180 d of ripening (wet base).

Tiempo de maduración (d)	pH	a_w	Proteína (%)	Humedad (%)	Grasa (%)	Sal (%)	Sólidos totales (%)	Minerales (%)
0	5.41±0.06a	0.967±0.002a	24.23±1.53c	45.60±1.41a	23.88±0.26d	2.06±0.04b	54.40±1.41d	6.28±0.38c
30	5.33±0.10a	0.937±0.002b	29.61±1.48b	37.36±0.98b	26.14±0.32c	2.34±0.08ab	62.63±0.98c	6.88±0.28bc
95	5.35±0.09a	0.901±0.006c	33.89±1.40a	30.85±1.27c	27.83±0.29b	2.54±0.12a	69.13±1.28b	7.42±0.23b
180	5.31±0.06a	0.879±0.006d	35.66±1.06a	27.21±1.22d	28.77±0.18a	2.33±0.16ab	72.79±1.22a	8.36±0.31a

[†]Valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas en una columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ [†]Average values ± standard deviation. Different letters in a column indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 3. Magnitud de diferencia (d') para pares de quesos de Zacazonapan.
Table 3. Magnitude of difference (d') for pairs of Zacazonapan cheeses.

	Quesos A vs B	Quesos D vs E
Proporción de juicios correctos	0.64	0.56
Significancia H_0 : $p = 0.33$ de igualdad muestra	1.72×10^{-10}	1.27×10^{-6}
d'	2.17	1.78
Varianza de d'	0.059	0.060
Sobre dispersión de los datos (γ)	0.007	0.006
Significancia H_0 : $d'_{AB} = d'_{DE}$	$p = 0.261$	
Potencia ($1-\beta$)	1	0.998

obtenidos dentro de cada par de quesos, no se encontró diferencia significativa. Las potencias ($1-\beta$) de las pruebas fueron de 100 y 99.8%, lo cual indica probabilidad alta de encontrar diferencias entre los pares de muestras A vs. B y D vs. E (Bi, 2006).

Perfil Flash

Después de analizar los datos del Perfil Flash, se seleccionaron siete panelistas y ocho atributos que permitieron diferenciar los quesos. En el APG la transformación óptima de la configuración consensuada indicó que fue suficiente retener los dos primeros componentes, los cuales explicaron el 81% de la variabilidad total de los datos. El primero explicó un 64.48%, y los atributos que contribuyeron con las cargas mayores; es decir con el valor absoluto de las correlaciones atributo-componente igual o mayores a 0.6, fueron cualidad arenosa, sequedad, dureza y friabilidad. Mientras que el segundo componente explicó el 16.52% y las cargas mayores se asociaron con los atributos de astringencia y granulosidad.

Con base en la distribución de quesos y descriptores se tiene que los quesos B y C se asociaron con los atributos de cualidad arenosa, sequedad, dureza y friabilidad. Los quesos D y E se relacionaron con los atributos de granulosidad, sal y cualidad masticable, mientras que el queso A se asoció con el atributo de astringencia (Figura 1). De acuerdo con la NMX-F-713-COFOCALEC-2005 (SE, 2005), este queso es de pasta friable porque permite su disgregación en partes pequeñas al ser sometido a esfuerzos mecánicos específicos.

Evaluación de aceptabilidad global

Para el análisis de los datos se consideraron 98 consumidores debido a que una persona no cumplió con

weights; that is, with absolute values of the attribute-component correlations equal to or greater than 0.6, were gritty quality, dryness, hardness and friability. The second component explained 16.52% and the higher weights were associated with the attributes of astringency and granularity.

Based on the distribution of cheeses and description traits, cheeses B and C were associated with the attributes of gritty quality, dryness, hardness and friability. Cheeses D and E were related with the attributes of granularity, salt and chewy quality, whereas cheese A was associated with the attribute of astringency (Figure 1). According to the NMX-F-713-COFOCALEC-2005 (SE, 2005), this cheese is friable because it can be crumbled into small pieces when it is subjected to specific mechanical forces.

Evaluation of global acceptability

For the analysis of the data, 98 consumers were considered, due to the fact that one person did not comply with what was asked, thus in order to fulfill the balance criterion in the number of women and men, another consumer had to be discarded. The Kolmogorov Smirnov test showed that the data did not exhibit a normal distribution ($p=0.005$), thus the Friedman test was used along with multiple comparisons by pairs of means of ranks using the Nemenyi test (Table 4). The group with higher acceptance was formed by A, B, C and E cheeses, while those of lower acceptance were A, C, D and E. Four of the five cheeses had the same acceptability; and three cheeses were found in groups of higher and lower acceptability. These results indicated that the measurement of acceptability is not a sufficient criterion to differentiate products or to drive their development (King and Meiselman, 2010).

According to the hedonic scale used, the highest acceptance was qualified with a value of 9; in this

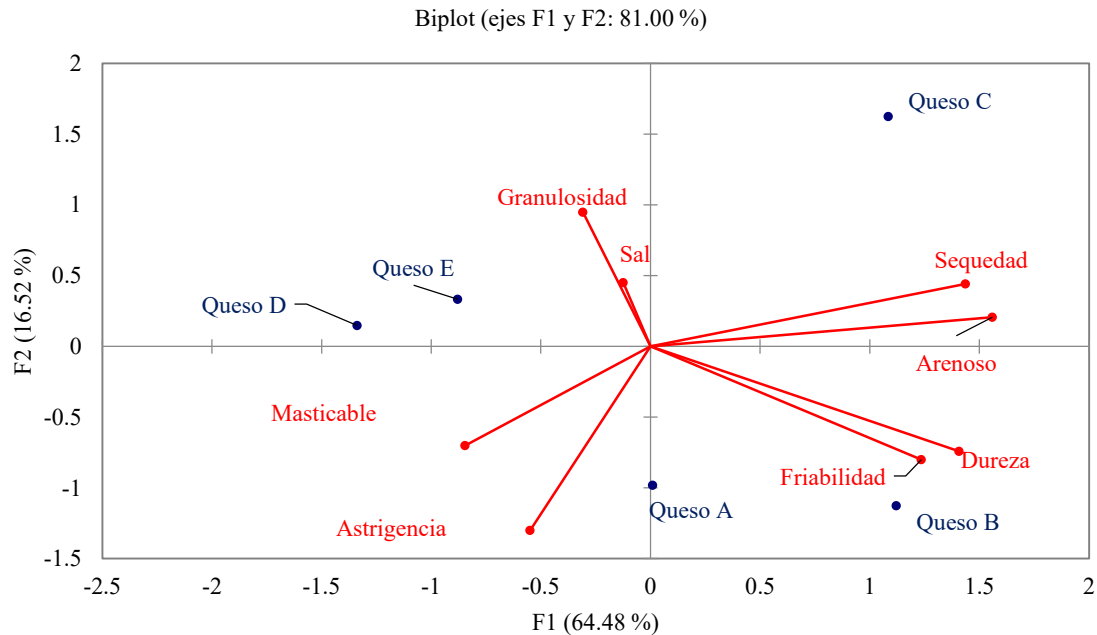


Figura 1. Representación gráfica de los quesos y descriptores con los dos primeros ejes principales del análisis Procrustes generalizado (APG).

Figure 1. Graphic representation of cheeses and description traits at the first two main axes in a generalized Procrustes analysis (APG).

lo solicitado, por lo que para cumplir con el balance entre el número de mujeres y hombres se descartó a otra. La prueba de Kolmogórov Smirnov mostró que los datos no presentaron una distribución normal ($p=0.005$), por lo cual se utilizó la prueba de Friedman y comparaciones múltiples por pares de medias de jerarquizaciones por medio de la prueba de Nemenyi (Cuadro 4). El grupo con aceptación mayor lo conformaron los quesos A, B, C y E, mientras que los de aceptación menor fueron A, C, D y E. Cuatro de cinco quesos tuvieron la misma aceptabilidad; y tres quesos se encontraron en grupos de aceptabilidad mayor y menor. Estos resultados indican que la medición de aceptabilidad no es un criterio suficiente para diferenciar o desarrollar productos (King y Meiselman, 2010).

De acuerdo con la escala hedónica utilizada, la aceptación mayor se representó con un valor de 9, en este caso se obtuvieron promedios de jerarquías entre 2.71 - 3.19, los cuales equivalen a valores de aceptabilidad entre 5.6 - 6.2, relacionados con los términos de “Ni me disgusta ni me gusta” y “Me gusta poco”. Estos valores de aceptabilidad indican que los consumidores reclutados probablemente prefieren quesos

case ranking averages were obtained between 2.71 - 3.19, which are equivalent to acceptability values between 5.6 - 6.2, related with the terms of “I don’t dislike it, nor like it” and “I don’t like it much”. These values of acceptability indicate that the recruited consumers probably prefer cheeses in other stages of ripening. According to Hernández-Morales *et al.* (2010) people can discriminate between cheeses with aged and fresh flavors.

Then, in our study, the more accepted cheeses were A, associated with astringency attribute; and B, C,

Cuadro 4. Aceptabilidad global para quesos de Zacazonapan.
Table 4. Overall acceptability of Zacazonapan cheeses.

Quesería	Aceptabilidad global
A	3.08ab
B	3.19a
C	3.14ab
D	2.71b
E	2.88ab

Medias de jerarquizaciones con letra distinta indican diferencia estadística (Nemenyi, $p\leq0.05$). ♦ Means of rankings with a different letter indicate statistical difference (Nemenyi, $p\leq0.05$).

en otras etapas de maduración. Según Hernández-Morales *et al.* (2010) las personas pueden distinguir sabores añejos y frescos en los quesos.

En nuestra investigación los quesos más aceptados fueron el queso A, asociado con el atributo de astringencia, y los quesos B y C relacionados con los atributos cualidad arenosa, sequedad, dureza y friabilidad, características asociadas con los quesos que presentan tiempo de maduración mayor. Esto difiere en parte con lo documentado por Hernández-Morales *et al.* (2010) quienes señalaron que los quesos con aceptación menor presentaron atributos asociados con un queso añejo (olor a pies, olor a pescado, pungencia, amargor, astringencia, duración de sabor global y acidez).

Frecuencia e intensidad de emociones en consumidores de queso de Zacazonapan

De las 39 emociones que provee la metodología EsSense Profile®, 21 de ellas tuvieron una frecuencia ≥ 30 : “activo, agradable, alegre, amable, amigable, bien, buen carácter, calmado, comprensivo, contento, divertido, estable, feliz, interesado, libre, obediente, pacífico, satisfecho, seguro, sensible y tranquilo”; es importante destacar que ninguna emoción fue de valencia negativa (no placenteras) (Figura 2). La presencia de emociones de valencia positiva (placenteras) y su frecuencia mayor, se relaciona con el hecho de que los alimentos pueden ejercer una experiencia agradable en los consumidores (Edwards *et al.*, 2013).

associated with gritty, dry, hard and friable attributes, all these qualities associated with longer times of ripening. This fact is different to that reported by Hernández-Morales *et al.* (2010) who indicated that cheeses with lower acceptance exhibited attributes associated with an aged cheese (smell of feet, fish odor, pungency, bitterness, astringency, duration of overall taste and acidity).

Frequency and intensity of emotions in consumers of Zacazonapan cheese

Of the 39 emotions provided by the methodology EsSense Profile®, 21 of these had a frequency ≥ 30 : “active, nice, cheerful, kind, friendly, good, good character, quiet, understanding, pleasant, fun, stable, happy, interested, free, obedient, peaceful, satisfied, safe, sensitive and calm”; it is important to point out that none of the emotions were of negative valence (unpleasant) (Figure 2). The presence of emotions of positive valence (pleasurable) and their higher frequency are related to the fact that the foods can exert a nice experience in the consumers (Edwards *et al.*, 2013).

When evaluating the intensity of the 21 emotions, the Kolmogorov-Smirnov test demonstrated that the data did not fit to a normal distribution, thus the Friedman test was applied along with multiple comparisons by pairs of means of rankings with the Nemenyi test. Only five emotions showed significant difference among cheeses (Table 5). The group formed by B, C, D and E cheeses generated higher intensities

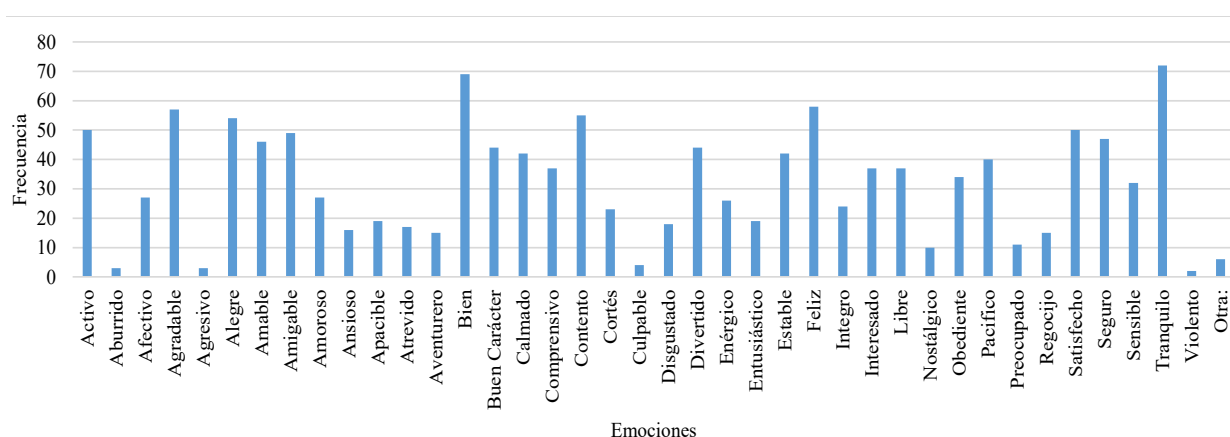


Figura 2. Frecuencia de emociones percibidas por consumidores locales después de degustar queso de Zacazonapan.
Figure 2. Frequency of emotions perceived by local consumers after tasting Zacazonapan cheese.

Al evaluar la intensidad de las 21 emociones, la prueba de Kolmogórov-Smirnov demostró que los datos no se ajustaron a una distribución normal, por eso se aplicó la prueba de Friedman y comparación múltiple por pares de medias de jerarquizaciones con la prueba de Nemenyi; solo cinco emociones mostraron diferencia significativa entre quesos (Cuadro 5). El grupo conformado por los quesos B, C, D y E generó las intensidades mayores de emociones, mientras que los quesos A, B y D conformaron el grupo relacionado con la intensidad menor. Al comparar estos grupos con los formados por aceptabilidad global, destacó que la intensidad de las emociones: activo, amable, amigable, seguro y tranquilo, permitieron diferenciar en particular a los quesos A y C, los cuales presentaron la misma aceptabilidad.

Los resultados mostraron que las emociones generadas constituyen una medida sensible para diferenciar productos. En ocasiones puede existir o no una correlación entre la aceptabilidad global y los términos de emoción; debido a esto, King y Meiselman (2010) sugirieron la combinación del uso de la medición de la intensidad de emociones y la aceptabilidad global. Al realizar esta evaluación con los resultados obtenidos, los quesos B, C y E generaron la intensidad mayor de emociones en el consumidor y se calificaron con una aceptabilidad global mayor. Las relaciones entre aceptabilidad y emociones pueden variar según el producto, los datos socio-demográficos y la psicología del consumidor (Schouteten *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Mora *et al.*, 2018).

Vida útil sensorial

Al analizar los datos, se encontró que la censura de intervalo fue la más frecuente, y el intervalo con frecuencia mayor fue el que comprendió 30 d como inicio y 95 d como fin de aceptación (Hough, 2010). Al realizar la prueba de bondad de ajuste para las distribuciones evaluadas, los valores de AD fueron: para la logística (1.816), normal (1.563), Weibull (0.800), normal logarítmica (0.772), logística logarítmica (0.763) y normal logarítmica de tres parámetros (0.761). Con base en los resultados, se eligieron la distribución normal logarítmica de tres parámetros (por tener el valor de AD menor) y la distribución de Weibull, por ser la que se usa con frecuencia mayor en el modelado de la vida útil sensorial de alimentos (Hough, 2010; Kamleh *et al.*, 2012).

Cuadro 5. Intensidad de emociones generadas que permiten diferenciar entre quesos de Zacazonapan.

Table 5. Intensity of generated emotions that make it possible to differentiate among Zacazonapan cheeses.

Queso	A	B	C	D	E
Activo	2.74b	2.86ab	3.25a	2.93ab	3.22a
Amable	2.70b	3.00ab	2.98a	2.99ab	3.09ab
Amigable	2.78b	2.88ab	3.24a	2.99ab	3.10ab
Seguro	2.75b	2.92ab	3.27a	3.03ab	3.04ab
Tranquilo	2.77b	2.85ab	3.24a	3.13ab	3.00ab

Medias de jerarquías con letra distinta indican diferencia estadística (Nemenyi, $p \leq 0.05$). ♦ Means of ranks with a different letter indicate statistical difference (Nemenyi, $p \leq 0.05$).

of emotions, whereas the A, B and D cheeses formed a group related to lower intensity. In comparing these groups with those formed by overall acceptability, it was evident that the intensity of the emotions: active, kind, friendly, safe and calm, allowed the particular differentiation of A and C cheeses, which displayed the same acceptability.

Results showed that the generated emotions integrate a sensitive measurement for product differentiation. On occasions there may or may not be a correlation between overall acceptability and terms assigned to emotion; therefore, King and Meiselman (2010) suggested combining the measurement of intensity of emotions and overall acceptability. When this evaluation was made with our results, B, C and E cheeses generated the highest intensity of emotions in the consumer and those were graded with a higher overall acceptability. The relationships between acceptability and emotions can vary according to the product, socio-demographic data and psychology of the consumer (Schouteten *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Mora *et al.*, 2018).

Sensory shelf life

On data analyses, it was found that interval censoring was the most frequent, and the interval with highest frequency was the one that had 30 d as start and 95 d as end of acceptance (Hough, 2010). When the goodness of fit test was made for the evaluated distributions, the values of AD were as follows: for the logistic (1.816), normal (1.563), Weibull's (0.800), log-normal (0.772), log-logistic

En el queso C se observó que la probabilidad de consumo (%) disminuye al aumentar el tiempo de maduración (Cuadro 6), por las características que el queso desarrolla durante el proceso de maduración, por la generación de compuestos derivados del metabolismo de la lactosa residual, lactato y citrato, lipólisis y proteólisis (Fox *et al.*, 2015). Hernández-Morales *et al.* (2010) indicaron una lista de veinte descriptores para quesos de Zacazonapan, y destacaron que algunos quesos presentaron sabores jóvenes y subdesarrollados, pero otros quesos presentaron valores altos para aromas como ácido propiónico, a pies (aroma asociado con calcetines sudados), a pescado (aroma asociado con pescado seco), y sabores tales como pungente (sensación aguda asociada con la producida por la capsaicina del chile, y otras especias), astringente, ácido y amargo. En el queso de Zacazonapan también se reportaron, ácidos grasos libres volátiles como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico.

Hasta los 78 d de maduración el queso de Zacazonapan tuvo un 50% de probabilidad de consumo, en un intervalo de 50.7 a 105.7 d con 95% IC, de acuerdo con la gráfica de supervivencia generada con la distribución normal logarítmica de tres parámetros. Un resultado similar se obtuvo con la distribución de Weibull, en la cual el 50% de probabilidad de consumo se presentó a los 77.8 d de maduración en un intervalo de 48.5 - 124.7 d con 95% de confianza (Figura 3). Hernández-Morales *et al.* (2010) reportaron que este queso se consume fresco entre los

(0.763) and three-parameter log-normal (0.761). Based on these results, the three-parameter log-normal distribution was selected (as it showed the lowest AD value) along with the Weibull's, because it is used with more frequency in modeling sensory shelf life of foods (Hough, 2010; Kamleh *et al.*, 2012).

In C-dairy cheese it was observed that the probability of acceptance (%) decreased as the ripening time increased (Table 6), due to the characteristics that this cheese develops during the ripening process. These features follow the generation of compounds derived from the metabolism of residual lactose, lactate and citrate, lipolysis and proteolysis (Fox *et al.*, 2015). Hernández-Morales *et al.* (2010) indicated a list of twenty description traits for Zacazonapan cheeses, and highlighted that some cheeses possessed young and underdeveloped flavors, but other cheeses displayed high values for odors such as propionic acid, feet (a smell associated with sweaty socks), fishy (a smell associated with dry fish), and flavors such as pungent (acute sensation associated with that produced by the capsaicin of chili-pepper, and other spices), astringent, acid and bitter. In the Zacazonapan cheese, volatile free fatty acids such as acetic acid, propionic acid and butyric acid were also reported.

Up to 78 days of ripening, the Zacazonapan cheese had a 50% probability of acceptance, within a range from 50.7 to 105.7 d at 95% CI, according to the survival graph generated with the three-

Cuadro 6. Predicción de probabilidad de consumo (%) del queso de Zacazonapan en cinco tiempos de maduración, con las distribuciones normal logarítmica de tres parámetros y Weibull.

Table 6. Prediction of probability of acceptance (%) of Zacazonapan cheese in five ripening times, with the three-parameter log-normal and Weibull's distributions.

Tiempo de maduración (d)	Normal logarítmica de tres parámetros			Weibull		
	Probabilidad de consumo (%)	Intervalo de confianza (95%)		Probabilidad de consumo (%)	Intervalo de confianza (95%)	
		LI†	LS‡		LI†	LS‡
0	98	93	99	97	91	99
30	76	65	84	70	57	79
95	44	34	55	45	34	56
180	25	17	36	29	19	39
730	4	1	10	4	1	10

Nota: LI†: Límite inferior, LS‡: Límite superior. ♦ Note: LI†: Lower limit, LS‡: Upper limit.

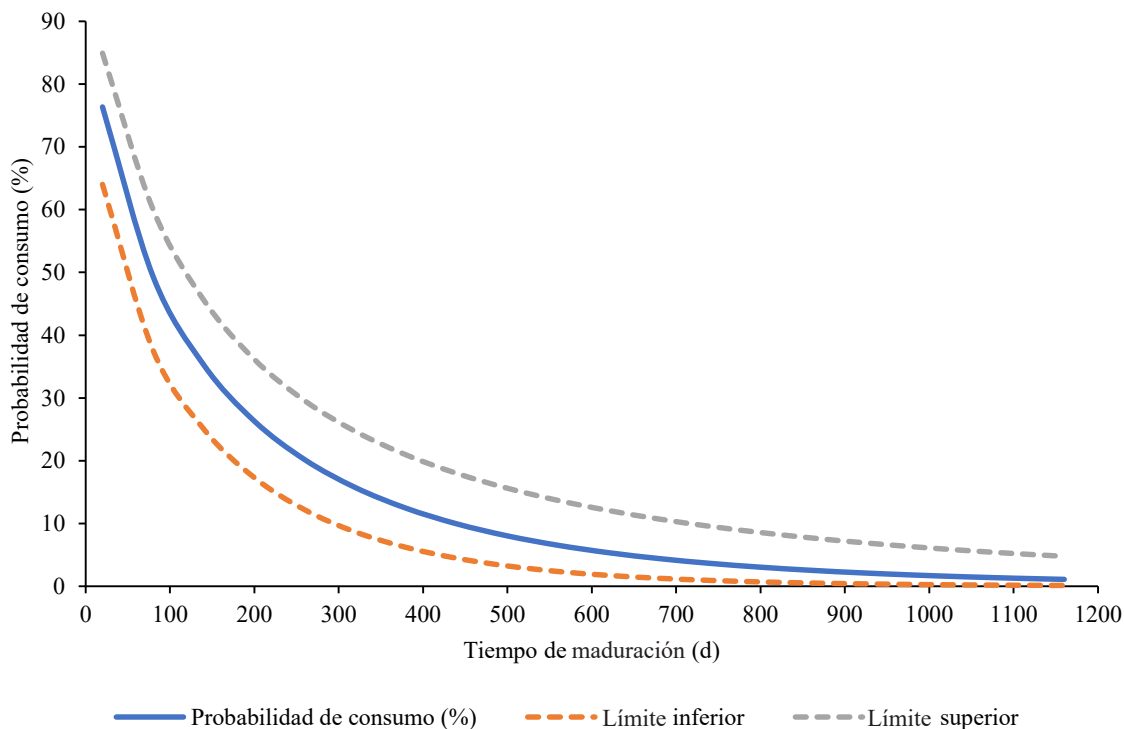


Figura 3. Probabilidad de consumo (%) de queso de Zacazonapan según el tiempo de maduración (d) y su intervalo de confianza en la distribución de Weibull.

Figure 3. Probability of acceptance (%) of Zacazonapan cheese according to ripening time (d) and its confidence interval in the Weibull distribution.

15 a 30 d después de su elaboración, o añejo con una maduración de 3 a 12 meses, pero no hay un reporte asociado con estudios con consumidores que determine este dato de manera cuantitativa.

Estudios sobre vida útil sensorial se han realizado en quesos frescos conservados en refrigeración, tales como, los quesos mantecosos Huacariz y Cepof de Cajamarca, Perú, en los cuales sus medianas de vida útil a 10 °C fueron 7.6 d y 41.7 d (Sánchez-González y Pérez, 2016). Así mismo, en el queso Halloumi, de Chipre, se documentó una mediana de vida útil de 37.8 d a 15 °C (Kamleh *et al.*, 2012). Hasta ahora no se encontró referencia en la literatura en la cual el método de supervivencia (para determinar la vida útil sensorial) se haya utilizado para conocer el estado de madurez. Tampoco algún estudio en el cual la probabilidad de consumo del queso de Zacazonapan sea mayor del 50%, ni los intervalos de tiempo máximos en los cuales el productor podría conservar en maduración el queso para disminuir su rechazo.

parameter log-normal distribution. A similar result was obtained with the Weibull distribution, in which 50% probability of acceptance was attained at 77.8 d of ripening, ranging from 48.5 to 124.7 d with 95% CI (Figure 3). Hernández-Morales *et al.* (2010) reported that this cheese is consumed fresh between 15 and 30 d after its elaboration, or aged with a ripening of 3 to 12 months, but there was no report associated to studies with consumers that quantitatively determined this date.

Some studies on sensory shelf life have been implemented on refrigerated fresh cheeses, such as the Huacariz and Cepof buttery cheeses of Cajamarca, Peru, which medians of shelf life at 10 °C were 7.6 and 41.7 d (Sánchez-González and Pérez, 2016). Also, in the Halloumi cheese of Cyprus a median shelf life of 37.8 d at 15 °C was reported (Kamleh *et al.*, 2012). Up to date no reference was found in the literature in which the survival method (in order to determine sensory shelf life) has been used to

CONCLUSIONES

Los quesos de Zacazonapan evaluados presentaron diferencias en sus características físicas, químicas y sensoriales. En la prueba de aceptabilidad global se identificaron quesos con la misma aceptación; sin embargo, cinco emociones (activo, amable, amigable, seguro y tranquilo) permitieron diferenciarlos. Esto es evidencia de la ventaja discriminante de la medición de emociones sobre las pruebas de aceptabilidad global.

Respecto a vida útil sensorial del queso, el límite de $\geq 50\%$ probabilidad de consumo se presentó a los 78 d, los consumidores reclutados mostraron una probabilidad de consumo mayor del queso con menos días de maduración. No se consideraron características sociodemográficas, ni consumidores con preferencia por los quesos añejos.

La información obtenida incrementa el conocimiento de la caracterización sensorial del queso, y contribuye a su tipificación. También genera bases para la construcción de una figura de protección, tal como una marca colectiva con referencia geográfica o una denominación de origen, para salvaguardar al queso de Zacazonapan.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo a través de la Dirección General de Investigación y Posgrado, por el financiamiento de la investigación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 283773. A las autoridades y pobladores del municipio de Zacazonapan, estado de México, por su contribución al desarrollo del trabajo de campo.

LITERATURA CITADA

- Addinsoft. 2014. XLSTAT versión 2014.5.03. XLSTAT. Paris, France. <https://www.xlstat.com/en/solutions/sensory> (Consulta: enero 2020).
- Ardö, Y., P. L. H. McSweeney, A. A. A. Magboul, V. K. Upadhyay, and P. F. Fox. 2017. Biochemistry of cheese ripening: proteolysis. *In*: McSweeney P., P. Fox, P. Cotter, D. Everett. Cheese: Chemistry, physics and microbiology 4th Ed. Elsevier Ltd. pp. 445–482. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>.
- Bi, J. 2006. Sensory discrimination tests and measurements. Statistical principles, procedures and tables. Blackwell Publishing, Ames Iowa. 560 p. <https://doi.org/10.1002/9780470277669>
- Bonanno, A., G. Tornambè, V. Bellina, C. De Pasquale, F. Mazza, G. Maniaci, and A. Di Grigoli. 2013. Effect of farming system and cheesemaking technology on the physicochemical

evaluate the state of ripening. Neither any study has been found in which the probability of acceptance of Zacazonapan cheese was higher than 50%, nor determined the maximum time interval in which the producer would conserve this cheese in ripening, in order to reduce its rejection.

CONCLUSIONS

The evaluated cheeses from Zacazonapan showed differences in their physical, chemical and sensory characteristics. In the overall acceptability test, cheeses with the same acceptance were identified; however, five emotions (active, kind, friendly, safe and calm) allowed to differentiate them. This is evidence of the discriminatory advantage of the measurement of emotions over the tests of overall acceptance.

Regarding sensory shelf life of this cheese, the $\geq 50\%$ limit of probability of acceptance was attained at 78 d; the recruited consumers showed a higher probability of acceptance of the cheese with fewer days of ripening. Sociodemographic characteristics were not considered, nor consumers with preference for aged cheeses.

The information obtained increases knowledge on sensory characterization of cheeses, and contributes to their typology. It also generates bases for the construction process towards a figure of protection, such as a collective brand with regulatory geographical indication or a designation of origin, as a safeguard for Zacazonapan cheese.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Universidad Autónoma Chapingo through the Dirección General de Investigación y Posgrado, for funding this research. To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for granting the scholarship Nu. 283773. To the authorities and people of the municipality of Zacazonapan, state of Mexico, our gratitude for their contribution to the development of the field survey.

—End of the English version—

—*—

- characteristics, fatty acid profile, and sensory properties of Caciocavallo Palermitano cheese. *J. Dairy Sci.* 96: 710–24. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5973>
- Domingues, G. B., D. Parra B., F. Giacometti C., and M. Lúcia G. 2019. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves the sensorial profile of Camembert-type cheese: An approach through flash-profile and CATA. *LWT - Food Sci. Technol.* 107: 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.077>
- Edwards, A. J. S., H. J. Hartwell, and L. Brown. 2013. The relationship between emotions, food consumption and meal acceptability when eating out of the home. *Food Qual. Prefer.* 30: 22–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.04.004>
- Fox, P. F., T. Uniacke-Lowe, P. L. H. McSweeney, and J. A. O'Mahony. 2015. Chemistry and biochemistry of cheese. In: Fox, P. F., T. Uniacke-Lowe, P. L. H. McSweeney, and J. A. O'Mahony. *Dairy chemistry and biochemistry*, 2nd ed. pp: 499–546. Switzerland: Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_12
- Garitta, L., K. Langohr, E. Elizagoyen, F. Gugole O., G. Gómez, and G. Hough. 2018. Survival analysis model to estimate sensory shelf life with temperature and illumination as accelerating factors. *Food Qual. Prefer.* 68: 371–376. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.03.014>
- Hernández-Morales, C., A. Hernández-Montes, E. Aguirre-Mandujano, and A. Villegas de Gante. 2010. Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterization of Mexican Añejo cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 63: 552–560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Hough, G. 2010. Sensory shelf life estimation of food products. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida, USA. 264 p. <https://doi.org/10.1201/9781420092943>
- Kamleh, R., I. Toufeili, R. Ajib, B. Kanso, and J. Haddad. 2012. Estimation of the shelf-life of Halloumi cheese using survival analysis. *Czech J. Food Sci.* 30: 512–19.
- Kenney, E., and K. Adhikari. 2016. Recent developments in identifying and quantifying emotions during food consumption. *J. Sci. Food Agric.* 96: 3627–3630. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7717>
- Kim J. Y., J. Prescott, and K. O. Kim. 2017. Emotional responses to sweet foods according to sweet liker status. *Food Qual. Prefer.* 59: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.01.013>
- King, S. C., and H. L. Meiselman. 2010. Development of a method to measure consumer emotions associated with foods. *Food Qual. Prefer.* 21: 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.02.005>
- Kondyli, E., Pappa, E. C., & Svarnas, C. 2016. Ripening changes of the chemical composition, proteolysis, volatile fraction and organoleptic characteristics of a white-brined goat milk cheese. *Small Ruminant Res.* 145: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.10.022>
- Liao, L. X., A. M. Corsi, P. Chrysoschou, and L. Lockshin. 2015. Emotional responses towards food packaging: A joint application of self-report and physiological measures of emotion. *Food Qual. Prefer.* 42: 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.01.009>
- Mora, M., E. Urdaneta, and C. Chaya. 2018. Emotional response to wine: Sensory properties, age and gender as drivers of consumers' preferences. *Food Qual. Prefer.* 66: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.12.015>
- Öztürk, H. İ., and N. Akin 2018. Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. *Food Sci Technol.* 38: 674–682. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Perna, A., A. Simonetti, I. Intaglietta, and E. Gambacorta. 2014. Effects of genetic type, stage of lactation, and ripening time on Caciocavallo cheese proteolysis. *J. Dairy Sci.* 97: 1909–1917. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7288>
- Ramírez-Navas J. S., J. Aguirre-Londoño, V. A. Aristizabal-Ferreira, y S. Castro-Narváez. 2017. La sal en el queso: diversas interacciones. *Agron. Mensoam.* 28: 303–316. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21909>
- Sánchez-González, J. A., and J. A. Pérez C. 2016. Sensory shelf life of mantecoso cheese using accelerated testing. *Sci. Agropec.* 7: 215 – 222. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.08>
- SAS Institute Inc. 2019. Statistical Analysis System version 9.4. Windows. Cary, NC, USA: SAS Institute, Inc.
- Schouteten, J. J., H. De Steur, S. De Pelsmaeker, S. Lagast, I. De Bourdeaudhuij, and X. Gellynck. 2015. Impact of health labels on flavor perception and emotional profiling: A consumer study on cheese. *Nutrients.* 7: 10251–10268. <http://dx.doi.org/10.3390/nu7125533>
- SE (Secretaría de Economía). 2005. NMX-F-713-COFOCALEC-2005. Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Queso y Queso de Suero-. Denominaciones, Especificaciones y Métodos de Prueba. México. 29 de noviembre de 2005. <https://docplayer.es/60107821-Nmx-f-713-cofocalec-2005.html> (Consulta: agosto 2019).
- Verastegui-Tena, L., H. van Trijp, and B. Piqueras-Fiszman. 2019. Heart rate, skin conductance, and explicit responses to juice samples with varying levels of expectation (dis)confirmation. *Food Qual. Prefer.* 71: 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103893>
- Villegas, A. 2012. Tecnología quesera. Ed. Trillas. 2da. ed. México. 404 p.
- Villegas, A., F. Cervantes, A. Cesín, A. Espinoza, A. Hernández, A. Santos, y A. Martínez. 2014. Atlas de los quesos mexicanos genuinos. Editorial Colegio de Postgraduados. Serie. Biblioteca Básica de Agricultura. México. 395 p.

EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON PATOGÉNESIS EN CHILE (*Capsicum annuum* L.) INOCULADO CON *Bacillus subtilis* Y *Meloidogyne enterolobii*

EXPRESSION OF GENES RELATED TO PATHOGENESIS IN CHILI PEPPER (*Capsicum annuum* L.) INOCULATED WITH *Bacillus subtilis* AND *Meloidogyne enterolobii*

Luis Yobani Gayosso-Rosales¹, Edgar Villar-Luna², María Dolores Rodríguez-Torres¹, María Valentina Angoa-Pérez¹, Hortencia Gabriela Mena-Violante¹, Carlos Méndez-Inocencio^{1*}

¹Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-IPN Unidad Michoacán. Justo Sierra 28, 59510, Jiquilpan, Michoacán, México. (cmendezi@ipn.mx). ²CONACYT-Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-IPN Unidad Michoacán. Justo Sierra 28, 59510, Jiquilpan, Michoacán, México.

RESUMEN

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) destaca por el valor agro-alimenticio alto del producto, aunado a su valor comercial. Los nematodos *Meloidogyne incognita* y *M. enterolobii* (*Me*) afectan al cultivo; *M. enterolobii* (*Me*) es el más relevante por su agresividad notable. El estudio de alternativas ecológicas es de interés para control estos fitoparásitos. Los objetivos de esta investigación fueron conocer el efecto de *Bacillus subtilis* (*Bs*) (CH90) sobre la expresión de los genes *PR-1*, *PR-5*, y *PR-12* que codifican proteínas relacionadas con patogénesis en chile cv. California Wonder (*Cw*) infectado con *Me*; y evaluar el efecto de *Bs* sobre agallamiento (A) y producción de huevos (H) del nematodo en raíces de *Cw*. Dos experimentos independientes (E1 y E2) se establecieron con diseño completamente al azar. En E1 y E2 los tratamientos fueron: *Cw* inoculado solo con *Me* (*CwMe*), *Cw* con *Bs* y *Me* (*CwBsMe*), *Cw* solo con *Bs* (*CwBs*), y *Cw* sin inoculación (*Cw*). En ambos experimentos, el nivel de inóculo de *Bs* fue 10^8 UFC mL⁻¹, y para *Me* fue 500 J₂ por planta. En E1 la expresión génica se determinó a 3, 7, y 14 d después de inoculación (DPI) con *Me*. En E2 las variables A y H se evaluaron 45 DPI con *Me*. *PR-1* y *PR-5* se sobre expresaron 3 y 7 DPI en los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs*, en contraste con *CwMe* ($p \leq 0.05$). A los 14 DPI, los genes en todos los tratamientos tuvieron una expresión menor ($p \leq 0.05$). La sobre expresión máxima de *PR-12* se registró a 14 DPI en los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs* ($p \leq 0.05$). Las plantas de cv. C. Wonder tratadas con *B. subtilis* CH90 solo o en combinación con *M. enterolobii* activaron las rutas de defensa dependientes del ácido salicílico (AS) y jasmónico (AJ) pero dicha activación no afectó la reproducción del nematodo en raíces de chile.

ABSTRACT

Chili (*Capsicum annuum* L.) cultivation is remarkable for the high agro-nutritional value of the product, coupled with its commercial value. The nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. enterolobii* (*Me*) affect the crop; *M. enterolobii* (*Me*) is the most relevant for its bold aggressiveness. To control these phytoparasites with ecological alternatives is of interest. The objectives of this research were to know the effect of *Bacillus subtilis* (*Bs*) (CH90) on the expression of the *PR-1*, *PR-5*, and *PR-12* genes that encode proteins related to pathogenesis in chili cv. California Wonder (*Cw*) infected with *Me*; and evaluate the effect of *Bs* on galls (A) and egg (H) production by the nematode in *Cw* roots. Two independent experiments (E1 and E2) were established with a completely randomized design. In E1 and E2 the treatments were: *Cw* inoculated only with *Me* (*CwMe*), *Cw* with *Bs* and *Me* (*CwBsMe*), *Cw* only with *Bs* (*CwBs*), and *Cw* without inoculation (*Cw*). In both experiments, the inoculum level for *Bs* was 10^8 UFC mL⁻¹, and for *Me* it was 500 J₂ per plant. In E1, the gene expression was determined at 3, 7, and 14 d after inoculation (DPI) with *Me*. In E2, variables A and H were evaluated 45 DPI with *Me*. *PR-1* and *PR-5* were overexpressed 3 and 7 DPI in the *CwBsMe* and *CwBs* treatments, in contrast with *CwMe* ($p \leq 0.05$). At 14 DPI, the genes in all treatments had a lower expression ($p \leq 0.05$). The maximum overexpression of *PR-12* was recorded at 14 DPI in the *CwBsMe* and *CwBs* treatments ($p \leq 0.05$). Plants of cv. C. Wonder treated with *B. subtilis* CH90 alone or in combination with *M. enterolobii* activated the defense pathways dependent on salicylic (AS) and jasmonic (AJ) acids; however, this activation did not affect the reproduction of the nematode in chili roots.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1563-9678>

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

Publicado en Agrociencia 55: 261-272. 2021.

Key words: *Capsicum annuum* L., *Meloidogyne enterolobii*, *Bacillus subtilis*, plant growth promoting bacteria, defense induction.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L., *Meloidogyne enterolobii*, *Bacillus subtilis*, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, inducción de defensa.

INTRODUCCIÓN

La importancia del chile (*Capsicum annuum* L.) se debe a su consumo y valor comercial. En el mundo México es el segundo productor de chile verde después de China (FAOSTAT, 2018)³. La producción del cultivo está limitada por hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos (García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Mhatre *et al.*, 2019). Los nematodos agalladores (NAGs) (*Meloidogyne* spp.) son los más importantes por los daños económicos que ocasionan en la agricultura (Jones *et al.*, 2013; Siddique and Grundler, 2018). *M. enterolobii* es el más relevante por su distribución geográfica creciente, agresividad alta y capacidad de reproducirse exitosamente en genotipos de jitomate y chile resistentes a las especies comunes de nematodos agalladores (Villar-Luna *et al.*, 2017). Los NAGs son estrictamente biotróficos e inducen la formación de agallas en las raíces, con ello alteran la absorción de agua y nutrientes (Mhatre *et al.*, 2019).

Durante la interacción de los NAGs con sus plantas hospedantes, los juveniles del segundo estadio (J₂) invaden las raíces con la combinación de mecanismos físicos (estilete) y bioquímicos (enzimas celulolíticas y pectolíticas) (Jones *et al.*, 2013). Los J₂ inducen la formación de células gigantes multinucleadas (CGM), las cuales proveen al nematodo de los nutrientes necesarios para su desarrollo y reproducción (Jones *et al.*, 2013). Las CGM son producto de las modificaciones transcripcionales que el nematodo ocasiona en el hospedante (Jones *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2017).

Un análisis transcriptómico en raíces de *Arabidopsis thaliana* infectadas por *M. incognita*, reveló que los genes sobre expresados fueron los implicados en el desarrollo y reproducción vegetal; en contraste, genes codificantes de proteínas relacionadas con patógenesis (*PRs*) fueron reprimidos. También enzimas

INTRODUCTION

The importance of chili (*Capsicum annuum* L.) is due to its consumption and commercial value. Mexico is the second world largest producer of green chili after China (FAOSTAT, 2018)³. Crop production is limited by fungi, bacteria, viruses and phytopathogenic nematodes (García-Neria and Rivera-Bustamante, 2011; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Mhatre *et al.*, 2019). Root-knot nematodes (NAGs) (*Meloidogyne* spp.) are the most important due to the economic damage they cause in agriculture (Jones *et al.*, 2013; Siddique and Grundler, 2018). *M. enterolobii* is the most relevant due to its increasing geographic distribution, high aggressiveness, and ability to reproduce successfully in tomato and chili genotypes resistant to common root-knot nematode species (Villar-Luna *et al.*, 2017). NAGs are strictly biotrophic and induce the formation of galls in the roots, thereby altering the absorption of water and nutrients (Mhatre *et al.*, 2019).

During the interaction of NAGs with their host plants, juveniles of the second stage (J₂) invade the roots with a combination of physical (stylet) and biochemical (cellulolytic and pectolytic enzymes) mechanisms (Jones *et al.*, 2013). The J₂ induce the formation of multinucleated giant cells (CGM), which provide the nematode with the necessary nutrients for its development and reproduction (Jones *et al.*, 2013). The CGMs are the product of the transcriptional modifications that the nematode causes in the host (Jones *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2017).

A transcriptomic analysis in roots of *Arabidopsis thaliana* infected by *M. incognita* revealed that the overexpressed genes were those involved in plant development and reproduction. In contrast, genes encoding pathogenesis-related proteins (*PRs*) were repressed. As well as enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids (example: phenylalanine ammonium lyase, PAL) and PAD4, an important protein for salicylic acid signaling (Jammes *et al.*, 2005). Several *PRs* possess antimicrobial activity, reinforcement of cell walls, and may be

³FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). 2018. World Crop Statistics by domain. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (Consulta: diciembre 2019).

implicadas en la biosíntesis de fenilpropanoides (por ejemplo, fenilalanina amonio liasa, PAL) y PAD4, una proteína importante para la señalización del ácido salicílico (Jammes *et al.*, 2005). Varios *PRs* poseen actividad antimicrobiana, reforzamiento de paredes celulares, y pueden estar involucrados en la señalización de defensa contra patógenos (Molinari *et al.*, 2014). Así, algunos estudios se enfocan en conocer los mecanismos de defensa de las plantas por medio del análisis de expresión de *PRs* (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014).

La protección contra patógenos biotróficos está mediada por ácido salicílico (AS), el cual activa genes como *PR-1*, *PR-2* y *PR-5* esenciales para desencadenar resistencia sistémica adquirida (RSA). En contraste, la resistencia sistémica inducida (RSI) dependiente de ácido jasmónico (AJ) parece ser más efectiva contra patógenos necrotróficos; esta vía de señalización implica una expresión mayor de *PR-3*, *PR-4* y *PR-12* (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014). La RSI se activa por microorganismos benéficos como *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, y rizobacterias como *B. subtilis*. Varios de estos microorganismos fueron eficaces para disminuir la infección por *M. incognita* en jitomate (*Solanum lycopersicum*), así como incrementar la biomasa vegetal (Mhatre *et al.*, 2019).

M. enterolobii es la especie de nematodo con importancia mayor por su distribución geográfica y agresividad alta para superar la defensa de genotipos de jitomate, chile, y otros de interés agronómico portadores de genes de resistencia (por ejemplo, *Mi-1*, *N* y *Tabasco*) efectivos contra *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita* (Ye *et al.*, 2013). Por ello, surge la necesidad de estudiar alternativas sustentables para su control. El objetivo de este estudio fue conocer el efecto de *B. subtilis* sobre la expresión de genes marcadores de resistencia sistémica adquirida (*PR-1* y *PR-5*), e inducida (*PR-12*) en plantas de chile cv. California Wonder infectadas con *M. enterolobii*; además, se evaluó el efecto de *B. subtilis* (CH90) sobre el agallamiento inducido por la producción de huevos del nematodo en las raíces. La hipótesis estableció que, en plantas de cv. C. Wonder tratadas solo con *B. subtilis* o con infección por el nematodo se activarían las rutas de defensa dependientes de AS y AJ como respuesta a las interacciones con los organismos.

involved in defense signaling against pathogens (Molinari *et al.*, 2014). Thus, some studies focus on knowing the defense mechanisms of plants through the analysis of *PRs* expression (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014).

Protection against biotrophic pathogens is mediated by salicylic acid (AS), which activates genes such as *PR-1*, *PR-2* and *PR-5* essential to trigger systemic acquired resistance (RSA). In contrast, induced systemic resistance (RSI) dependent on jasmonic acid (AJ) appears to be more effective against necrotrophic pathogens; this signaling pathway implies a higher expression of *PR-3*, *PR-4* and *PR-12* (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014). The RSI is activated by beneficial microorganisms such as *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, and rhizobacteria such as *B. subtilis*. Several of these microorganisms were effective in reducing the *M. incognita* infection in tomato (*Solanum lycopersicum*), as well as increasing plant biomass (Mhatre *et al.*, 2019).

M. enterolobii is the nematode species of greatest importance due to its geographic distribution and high aggressiveness to overcome the defense of genotypes of tomato, chili, and others of agronomic interest that carry effective resistance genes (for example, *Mi-1*, *N* and *Tabasco*) against *M. javanica*, *M. arenaria*, and *M. incognita* (Ye *et al.*, 2013). Therefore, it becomes necessary to study sustainable alternatives for control. The objective of this study was to know the effect of *B. subtilis* on the expression of marker genes for acquired systemic resistance (*PR-1* and *PR-5*), and induced (*PR-12*) in chili plants cv. California Wonder infected with *M. enterolobii*; besides, the effect of *B. subtilis* (CH90), on the galls induced by the production of nematode eggs in the roots, was evaluated. The hypothesis established that in plants of cv. C. Wonder treated only with *B. subtilis* or with infection by the nematode would activate defense pathways dependent on AS and AJ in response to interactions with organisms.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Chili plants cv. California Wonder (Cw), genotype highly susceptible to *M. enterolobii*, were used in this study. The seeds

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas de chile cv. California Wonder (*Cw*), genotipo altamente susceptible a *M. enterolobii*, se utilizaron en este estudio. Las semillas se germinaron en cajas de plástico sobre papel absorbente húmedo a 28 ± 1 °C. Las plántulas se trasplantaron a macetas con 25 cm³ de arena esterilizada, y se mantuvieron en condiciones controladas con fotoperiodo de 14 h luz, temperatura de 28 ± 1 °C, y humedad relativa de 70%. Los riegos se realizaron cada 24 h con agua esterilizada y la fertilización se realizó cada 15 d con una solución de Nitrofoska® (3.15 g L⁻¹ de agua esterilizada).

Inoculación con *B. subtilis* y *M. enterolobii*

La cepa CH90 de *B. subtilis* (GenBank JF951247) se usó; el Laboratorio de Biología Molecular de Bacterias de CINVESTAV - Unidad Irapuato proporcionó la cepa. Para la preparación del inóculo, la bacteria se multiplicó en caldo nutritivo "Difco™ Nutrient Broth" (8 g de medio nutritivo en 1000 mL⁻¹ de agua destilada), la suspensión se mantuvo en agitación (0.24 x g) a 28 °C durante 72 h. La inoculación de las plantas se realizó al momento del trasplante, con la raíz sumergida en una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC mL⁻¹ durante 15 min.

El inóculo de *M. enterolobii* se obtuvo de raíces de jitomate agalladas, cultivo monoxénico procedente de una población en Ahome, Sinaloa (Villar-Luna *et al.*, 2017). La extracción de los huevos se realizó de acuerdo con Vrain (1977) y la obtención de juveniles del segundo estadio (J₂) con el método de Baermann. A los 21 días post-inoculación (DPI) con la bacteria (Adam *et al.*, 2014), las plantas se infectaron con el nematodo (500 J₂ por planta).

Variables evaluadas y diseño experimental

Dos experimentos independientes (E1 y E2) se establecieron con un diseño completamente al azar. En el E1 y E2 los tratamientos fueron: *Cw* inoculado solo con *Me* (*CwMe*), *Cw* con *Bs* y *Me* (*CwBsMe*), *Cw* solo con *Bs* (*CwBs*) y testigo *Cw* solo con medio de cultivo (*Cw*). Cada tratamiento consistió de 15 plantas. En el E1, a 3, 7, y 14 días post-inoculación (DPI) con *Me*, se determinaron los niveles de expresión génica de *PR-1* (proteína relacionada con patogénesis 1), *PR-5* (taumatina) y *PR-12* (defensina J1-2). Las muestras de raíz se congelaron con N₂ líquido y se mantuvieron en ultracongelación (-22 °C) hasta su uso.

En el E2, a 45 DPI con *Me*, se evaluó el número de agallas, y la producción de huevos por gramo de raíz. La extracción de

were germinated in plastic boxes on wet absorbent paper at 28 ± 1 °C. Seedlings were transplanted into pots with 25 cm³ of sterilized sand and kept under controlled conditions with a photoperiod of 14 h light, a temperature of 28 ± 1 °C, and a relative humidity of 70%. Irrigation was carried out every 24 h with sterile water and fertilization every 15 d with a Nitrofoska® solution (3.15 g L⁻¹ of sterilized water).

Inoculation with *B. subtilis* and *M. enterolobii*

The *B. subtilis* strain CH90 (GenBank JF951247) was used; it was provided by the Laboratorio de Biología Molecular de Bacterias de CINVESTAV - Unidad Irapuato. For the preparation of the inoculum, the bacteria were multiplied in "Difco™ Nutrient Broth" (8 g of nutrient medium in 1000 mL⁻¹ of distilled water), the suspension was stirred (0.24 x g) for 72 h at 28 °C. The inoculation of the plants was done at the time of transplantation, with the root submerged in a bacterial suspension of 1×10^8 UFC mL⁻¹ for 15 min.

The inoculum of *M. enterolobii* was obtained from tomato roots with galls, a monoxenic culture from a population in Ahome, Sinaloa (Villar-Luna *et al.*, 2017). The extraction of the eggs was made according to Vrain (1977) and to obtain juveniles of the second stage (J₂) we used the Baermann method. At 21 days post-inoculation (DPI) with the bacteria (Adam *et al.*, 2014), plants were infected with the nematode (500 J₂ per plant).

Variables evaluated and experimental design

Two independent experiments (E1 and E2) were established with a completely randomized design. In E1 and E2 the treatments were: *Cw* inoculated only with *Me* (*CwMe*), *Cw* with *Bs* and *Me* (*CwBsMe*), *Cw* only with *Bs* (*CwBs*) and control *Cw* only with culture medium (*Cw*). Each treatment consisted of 15 plants. At E1, at 3, 7, and 14 days post-inoculation (DPI) with *Me*, we determined the levels of gene expression of *PR-1* (protein related to pathogenesis 1), *PR-5* (thaumatin) and *PR-12* (defensin J1-2). Root samples were frozen with liquid N₂ and kept deep-frozen (-22 °C) until use.

In E2, at 45 DPI with *Me*, we evaluated the number of galls and the production of eggs per gram of root. The egg extraction occurred as it was already described and they were counted with a 4X (Zeiss Primo STAR, Germany) stereoscopic microscope. In this experiment, we also evaluated the production of fresh and dry biomass (root and foliage). The fresh biomass was determined immediately after sampling, and for dry weight, the plants were placed in an air forced oven at 65 °C until weight remained constant (4 d).

huevos fue como ya se describió y se contabilizaron con un microscopio estereoscópico 4X (Zeiss Primo STAR, Germany). En este experimento también se evaluó la producción de biomasa fresca y seca (raíz y follaje). La biomasa fresca se determinó de inmediato después del muestreo, y para el peso seco, las plantas se colocaron en una estufa a 65 °C hasta que el peso se mantuvo constante (4 d).

Extracción de RNA total, síntesis de cDNA, y PCR en tiempo real

La extracción de RNA total de raíces de chile cv. California Wonder se realizó con el kit RNeasy® Plant mini kit (Qiagen) y se incluyó una digestión con DNasa (Qiagen); todo este procedimiento se desarrolló de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza del RNA obtenido se verificó por espectrofotometría de 260 nm, y la integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Para la síntesis de cDNA se utilizó la M-MLV retro transcriptasa (Promega™) y el oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen); se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los niveles de expresión génica se determinaron en un sistema CFX Connect™ Real-Time PCR Detection (Bio-Rad). Oligonucleótidos específicos se usaron para *PR-1*, *PR-5* y *PR-12* (Cuadro 1) (García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Villar-Luna *et al.*, 2017). La mezcla de reacción consistió de 5 µL de amortiguador de pH Buffer pro, 1 µL de cada oligonucleótido (10 mM), 2 µL SYBR Green I (Invitrogen) 1:75000, 0.125 µL Amplificasa® (BioTecMol) 0.625 U, y 3 µL de cDNA, para un volumen final de 25 µL ajustado con agua libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida 39 ciclos (95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s). Para descartar la formación de productos inespecíficos se incluyó un análisis de disociación.

Total RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time PCR

The extraction of total RNA from roots of chili cv. California Wonder was performed with the RNeasy® Plant mini kit (Qiagen), including a digestion with DNase (Qiagen); this entire procedure was performed in accordance with the manufacturer instructions. The purity of the RNA obtained was verified by 260 nm spectrophotometry, and integrity by electrophoresis in 1.2% agarose gel. For cDNA synthesis, we used M-MLV reverse transcriptase (Promega™) and oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen); and followed the manufacturer instructions.

Gene expression levels were determined on a CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Specific oligonucleotides were used for *PR-1*, *PR-5* and *PR-12* (Table 1) (García-Neria and Rivera-Bustamante, 2011; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Villar-Luna *et al.*, 2017). The reaction mixture consisted of 5 µL of pH Buffer pro, 1 µL of each oligonucleotide (10 mM), 2 µL SYBR Green I (Invitrogen) 1: 75000, 0.125 µL Amplificasa® (BioTecMol) 0.625 U, and 3 µL of cDNA for a final volume of 25 µL adjusted with nuclease-free water.

The amplification conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 39 cycles (95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s). To discard the formation of nonspecific products, we included a dissociation analysis, and then determined the relative expression levels by using the 2^{-ΔΔCT} method (Schmittgen and Livak, 2008), as an internal reference the *GAPDH* gene (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). As a calibrator of the values of the control plants we carried out three technical replications per treatment.

Statistical analysis

With the data, we performed an analysis of variance (ANOVA) and the means comparison Tukey test (p≤0.05) in

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para el análisis por PCR en tiempo real.
Table 1. Oligonucleotides used for real-time PCR analysis.

Gen	Número de acceso	Secuencia (5' → 3')	Amplicón (pb)
<i>GAPDH</i>	AJ246011	F: GGCCTTATGACTACAGTTCACCTCC R: GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217
<i>PR-1</i>	XM_016683907	F: CCCAAAATTACGCCAATCAAAG R: ACATCTTCACGGCACCAG	120
<i>PR-5</i>	NM_00132489 6	F: TGGTGGAGTCTTGCAAGTGC R: CGTGCAATGGATCGCGTG	181
<i>PR-12</i>	X95730	F: CAAGGGGTTGTGCCTTAGTA R: TTCCTGCAGAAGCATTAAAGA	105

GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), *PR-1* (Proteína relacionada con patogénesis 1), *PR-5* (Taumatina) y *PR-12* (Defensina J1-2). ♦ *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *PR-1* (Protein related to pathogenesis 1), *PR-5* (Thaumatatin) and *PR-12* (Defensin J1-2).

Los niveles de expresión relativa se determinaron por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak, 2008), y como referencia interna el gen *GAPDH* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Como calibrador de los valores de las plantas control se realizaron tres réplicas técnicas por tratamiento.

Análisis estadístico

Con los datos de las variables se realizaron, un análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) en cada experimento independiente. Antes del ANDEVA, los datos de número de agallas y de huevos se transformaron a $\log_{10}(x + 1)$. Todos los análisis se realizaron con el programa SAS v. 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión de genes *PRs* en raíces de chile inoculadas con *B. subtilis* y *M. enterolobii*

Los genes *PR-1* y *PR-5*, los cuales son marcadores de RSA dependiente de AS (Gruner *et al.*, 2013; Molinari *et al.*, 2014) se sobre expresaron 3 y 7 DPI con el nematodo en los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs*; en contraste, en el tratamiento *CwMe* la expresión fue inferior. A los 3 DPI, los niveles de *PR-1* en *CwBsMe* y *CwBs*, fueron 85.48% superiores al registrado en *CwMe* ($p \leq 0.05$). La expresión de *PR-5* en el tratamiento *CwBs* fue 58.27% superior a la registrada en *CwBsMe* y *CwMe* ($p \leq 0.05$). A los 14 DPI, *PR-1* y *PR-5* tuvieron una expresión menor en todos los tratamientos (Figura 1A y 1B).

Respecto al gen *PR-12*, un marcador de RSI dependiente de AJ (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014), 3 DPI la expresión en *CwMe* fue 67.40% superior al de los tratamientos *CwBs* y *CwBsMe*. A los 7 DPI, la sobre expresión de *PR-12* en el tratamiento *CwBsMe* fue 57.21% superior ($p \leq 0.05$) respecto a *CwMe* y *CwBs* (Figura 1C). Todos los tratamientos presentaron sobre expresión de *PR-12* en los 14 DPI. Los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs* fueron los que mostraron la expresión mayor ($p \leq 0.05$) en contraste con *CwMe*.

En el tratamiento *CwMe*, los niveles de expresión de *PR-1* y *PR-5* se asociaron con la interacción compatible que se estableció entre *Cw* y *Me*. Es decir, el nematodo inhibió la expresión de los genes de defensa para crear las condiciones favorables para su establecimiento y reproducción (Hamamouch *et*

each independent experiment. Before the ANOVA, the data for the number of galls and eggs were transformed to $\log_{10}(x + 1)$. All analyses were performed with SAS v. 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of *PRs* genes in chili roots inoculated with *B. subtilis* and *M. enterolobii*

The *PR-1* and *PR-5* genes, which are markers of AS-dependent RSA (Gruner *et al.*, 2013; Molinari *et al.*, 2014) were overexpressed at 3 and 7 DPI with the nematode in the treatments *CwBsMe* and *CwBs*; in contrast, in the *CwMe* treatment the expression was lower. At 3 DPI, the *PR-1* levels in *CwBsMe* and *CwBs* were 85.48% higher than that registered in *CwMe* ($p \leq 0.05$). The expression of *PR-5* in the *CwBs* treatment was 58.27% higher than that registered in *CwBsMe* and *CwMe* ($p \leq 0.05$). At 14 DPI, *PR-1* and *PR-5* had a lower expression in all treatments (Figure 1A and 1B).

Regarding the *PR-12* gene, an AJ-dependent RSI marker (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014), at 3 DPI the expression in *CwMe* was 67.40% higher than that of the *CwBs* and *CwBsMe* treatments. At 7 DPI, the overexpression of *PR-12* in the *CwBsMe* treatment was 57.21% higher ($p \leq 0.05$) compared to *CwMe* and *CwBs* (Figure 1C). All treatments presented overexpression of *PR-12* at 14 DPI. The treatments *CwBsMe* and *CwBs* were those that showed the highest expression ($p \leq 0.05$) in contrast to *CwMe*.

In the *CwMe* treatment, the expression levels of *PR-1* and *PR-5* were associated with the compatible interaction that was established between *Cw* and *Me*. That is, the nematode inhibited the expression of defense genes to create favorable conditions for their establishment and reproduction (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014). The main line of defense activated against biotrophic pathogens is a response at local and systemic levels (RSA) (Molinari *et al.*, 2014). *M. enterolobii* could interfere with the salicylic acid (AS) pathway as an early defense response indicator and activator of RSA (Jammes *et al.*, 2005; Hamamouch *et al.*, 2011) during giant cell formation. Similarly to reports in other interactions with *Meloidogyne* spp., *M. incognita* regulated RSA by reducing AS and AJ levels and consequently

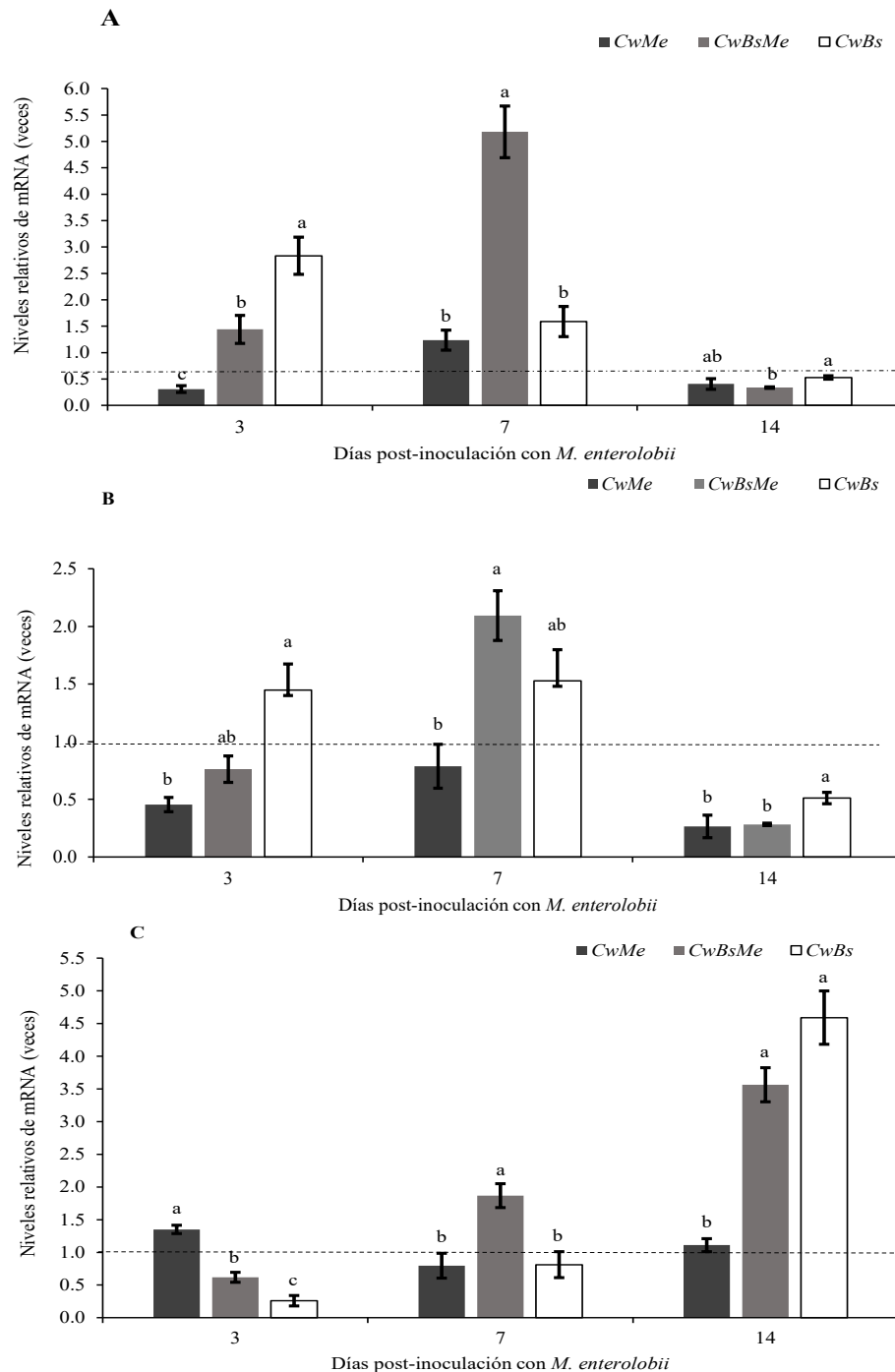


Figura 1. Niveles relativos de expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (A: *PR-1*, B: *PR-5*, C: *PR-12*) en plantas de chile cv. California Wonder. *Me*: *M. enterolobii*, *MeBs*: *B. subtilis* y *M. enterolobii*; *Bs*: *B. subtilis*. Barras son medias de tres replicas y línea sobre barra es el error estándar. Medias con letra diferente fueron significativas (Tukey; $p \leq 0.05$). Valores debajo de la línea punteada indican represión génica y arriba de la línea indican sobre expresión (Schmittgen y Livak, 2008).

Figure 1. Relative levels of expression of genes that code for proteins related to pathogenesis (A: *PR-1*, B: *PR-5*, C: *PR-12*) in chili plants cv. California Wonder. *Me*: *M. enterolobii*, *MeBs*: *B. subtilis*, and *M. enterolobii*; *Bs*: *B. subtilis*. Bars are the means of three replicates and the line in each bar is the standard error. Means with different letters were significant (Tukey; $p \leq 0.05$). Values below the dotted line indicate gene repression, and above the line indicate overexpression (Schmittgen and Livak, 2008).

al., 2011; Molinari *et al.*, 2014). La línea de defensa principal activada contra patógenos biotróficos es una respuesta a niveles local y sistémico (RSA) (Molinari *et al.*, 2014). *M. enterolobii* podría interferir en la ruta del ácido salicílico (AS) como indicador de respuesta de defensa temprana y activador de RSA (Jammes *et al.*, 2005; Hamamouch *et al.*, 2011) durante la formación de las células gigantes. En forma similar a lo reportado en otras interacciones con *Meloidogyne* spp., *M. incognita* reguló la RSA por medio de reducir los niveles de AS y AJ y en consecuencia disminuyó la expresión de *PR-1* y *PR-5* en *A. thaliana* (Hamamouch *et al.*, 2011).

Durante la interacción incompatible de *M. incognita* con jitomate, se observó una sobre expresión de *PR-1*, en contraste con lo registrado en las interacciones compatibles; lo cual sugiere que, durante la defensa contra *M. incognita*, *PR-1* tuvo una función importante dependiente de la activación de AS (Lavrova *et al.*, 2017). Martínez-Medina *et al.* (2016) indicaron que el hongo *Trichoderma* redujo la infección por *M. incognita* en plantas de tomate por medio de la activación de las respuestas de defensa dependientes de AS y AJ. A pesar de la expresión de genes *PRs* como *PR-1* y *PR-5*, importantes para desencadenar la RSA, *M. incognita* puede superar o bloquear dicho mecanismo de defensa y establecerse exitosamente en el hospedante (Hamamouch *et al.*, 2011).

En la actualidad se han evaluado cepas diferentes de *Bacillus* para desencadenar RSI en plantas susceptibles a *Meloidogyne*; lo cual ha resultado una opción prometedora para el control de nematodos en cultivos de importancia agrícola (Adam *et al.*, 2014). En los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs*, en etapas tempranas de la interacción (3 y 7 DPI), *B. subtilis* (CH90) pudo activar la ruta de AS con la expresión de *PR-1* y *PR-5*. Las rizobacterias como *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus* spp. pueden activar la resistencia sistémica (Mhatre *et al.*, 2019). En su estudio Niu *et al.* (2016) demostraron que *B. cereus* AR156 promovió la resistencia sistémica en *A. thaliana* Col-0 contra *P. syringae* pv. *tomato* con la activación de AS, AJ y ET, para así sobre expresar los genes *PR-1*, *PR-2*, *PR-5* y *PDF1.2* (*PR-12*); además, aumentó la biomasa de las plantas tratadas. *B. subtilis* es eficaz para el control de *Meloidogyne*, principalmente por medio de la activación de RSI a través de las vías de señalización dependientes de AJ (Adam *et al.*, 2014).

Leonetti *et al.* (2017) encontraron que los genes marcadores de la vía de señalización del AS (*PR-1* y

decreased the expression of *PR-1* and *PR-5* in *A. thaliana* (Hamamouch *et al.*, 2011).

During the incompatible interaction of *M. incognita* with tomato, an overexpression of *PR-1* was observed, in contrast to that registered in the compatible interactions; which suggests that during the defense against *M. incognita*, *PR-1* had an important function dependent on the activation of AS (Lavrova *et al.*, 2017). Martínez-Medina *et al.* (2016) indicated that the *Trichoderma* fungus reduced the *M. incognita* infection in tomato plants through the activation of defense responses dependent on AS and AJ. Despite the expression of *PRs* genes such as *PR-1* and *PR-5*, important for triggering RSA, *M. incognita* can overcome or block this defense mechanism and successfully establish in the host (Hamamouch *et al.*, 2011).

At present, different strains of *Bacillus* have been evaluated to trigger RSI in plants susceptible to *Meloidogyne*; which has become a promising option for the control of nematodes in crops of agricultural importance (Adam *et al.*, 2014). In the *CwBsMe* and *CwBs* treatments, in the early stages of the interaction (3 and 7 DPI), *B. subtilis* (CH90) was able to activate the AS pathway with the expression of *PR-1* and *PR-5*. Rhizobacteria such as *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus* spp. can activate systemic resistance (Mhatre *et al.*, 2019). Niu *et al.* (2016) demonstrated that *B. cereus* AR156 promoted systemic resistance in *A. thaliana* Col-0 against *P. syringae* pv. *tomato* with the activation of AS, AJ and ET, in order to overexpress the *PR-1*, *PR-2*, *PR-5* and *PDF1.2* (*PR-12*) genes; in addition, biomass of the treated plants increased. *B. subtilis* is effective for the control of *Meloidogyne*, mainly by the activation of RSI through AJ-dependent signaling pathways (Adam *et al.*, 2014).

Leonetti *et al.* (2017) found that the marker genes of the AS signaling pathway (*PR-1* and *PR-5*) and the *ACO* gene that encodes a precursor oxidase enzyme of ET biosynthesis, were induced in tomato plants inoculated with *T. harzianum* and then with *M. incognita* at 5 DPI of the nematode. But the expression of the *JERF3* gene (AJ/ET3 response factor) was not affected. Those same authors observed that the activation of RSA and the production of ET by *T. harzianum* reduced the infection of *M. incognita*; while the compatible nematode-plant interaction in the absence of *T. harzianum* suppressed locally and systemically the expression of the *PR-1*, *PR-5* and *ACO* genes

PR-5) y el gen *ACO* que codifica para una enzima oxidasa precursora de la biosíntesis de ET, se indujeron en plantas de jitomate inoculadas con *T. harzianum* y después con *M. incognita* a los 5 DPI del nematodo. Pero la expresión del gen *JERF3* (factor de respuesta AJ/ET3) no se afectó, los mismos autores observaron que la activación de RSA, y producción de ET por *T. harzianum* redujo la infección de *M. incognita*; mientras que la interacción nematodo-planta compatible en ausencia de *T. harzianum* suprimió la expresión de los genes *PR-1*, *PR-5* y *ACO* de manera local y sistémica.

Los cambios transcripcionales del gen *PR-12* fueron más notorios a los 14 DPI, se observó una sobre expresión del gen en los tratamientos *CwBs* y *CwBsMe*, donde fue evidente el antagonismo entre la ruta del AS y AJ, de esta forma la expresión de *PR-1* y *PR-5* (AS) fue menor, mientras que *PR-12* (AJ) fue sobre expresado. Molinari *et al.* (2014) encontraron que *M. incognita* puede activar la RSA, tanto dependiente de AS como dependiente de AJ, en plantas de *A. thaliana*; de modo que se considera que existe una vía de AS dependiente y una independiente de la acción del AJ y ET (Zhang *et al.*, 2012).

Las vías de señalización pueden activarse mutuamente para desencadenar respuestas de defensa contra patógenos; sin embargo, también puede ser una herramienta utilizada por los patógenos para activar o reprimir las respuestas de defensa del hospedero y poder desarrollarse (Zhang *et al.*, 2012). Otros estudios demostraron que existe un antagonismo entre la vía de señalización de AS y AJ/ET lo cual repercute en la activación de defensa (Caarls *et al.*, 2015); por lo tanto, *Meloidogyne* puede manipular las respuestas de defensa, al aprovechar las interacciones entre AS y AJ para establecerse exitosamente (Shim *et al.*, 2013).

Número de agallas, huevos y biomasa vegetal en la interacción *chile-B. subtilis-M. enterolobii*

Todas las raíces de los tratamientos *CwMe* y *CwBsMe* fueron agalladas con éxito. El tratamiento *CwMe* presentó 24.67% menos agallas que el tratamiento *CwBsMe* ($p \leq 0.05$); sin embargo, respecto al número de huevos no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos (Cuadro 2). El tratamiento *CwBsMe* presentó 41.71% mayor biomasa fresca de raíz con respecto al testigo ($p \leq 0.05$), mientras que los tratamientos *CwMe* y *CwBsMe* tuvieron 34.61%

The transcriptional changes of the *PR-12* gene were more noticeable at 14 DPI. An overexpression of the gene was observed in the *CwBs* and *CwBsMe* treatments, where the antagonism between the AS and AJ pathways was evident; thus, the expression of *PR-1* and *PR-5* (AS) was lower, while *PR-12* (AJ) was overexpressed. Molinari *et al.* (2014) found that *M. incognita* can activate RSA, both AS-dependent and AJ-dependent, in *A. thaliana* plants; thus, it is considered that there is one AS pathway dependent and one independent from the action of JA and ET (Zhang *et al.*, 2012).

Signaling pathways can activate each other to trigger defense responses against pathogens; however, they can also be a tool used by pathogens to activate or repress host defense responses and be able to develop (Zhang *et al.*, 2012). Other studies showed that there is an antagonism between the AS and AJ/ET signaling pathway, which affects defense activation (Caarls *et al.*, 2015); therefore, *Meloidogyne* can manipulate defense responses, taking advantage of the interactions between AS and AJ to establish itself successfully (Shim *et al.*, 2013).

Number of galls, eggs and plant biomass in the *chile-B. subtilis-M. enterolobii* interaction

All the roots of the *CwMe* and *CwBsMe* treatments were successfully infected with galls. The *CwMe* treatment expressed 24.67% less galls than the *CwBsMe* treatment ($p \leq 0.05$); however, regarding the number of eggs there were no significant differences between both treatments (Table 2). The *CwBsMe* treatment presented 41.71% higher fresh root biomass in regard to the control ($p \leq 0.05$), while the *CwMe* and *CwBsMe* treatments recorded 34.61% more fresh foliage biomass ($p \leq 0.05$) than the control. The dry foliage biomass increased 40.95% in the *CwBsMe* and *CwMe* treatments ($p \leq 0.05$) compared to the control (Table 2).

Even when *B. subtilis* (CH90) activated the expression of defense genes, this effect was not decisive to reduce galls and egg production; thus, *M. enterolobii* successfully concluded its life cycle in cv. California Wonder roots. Xia *et al.* (2019) evaluated different species of *Bacillus* against *M. javanica* in tomato plants; and it was *B. halotolerans* the one that showed the greatest reduction in galls and eggs of *M. incognita*. Therefore, it is suggested that not all

Cuadro 2. Efecto de *B. subtilis* en plantas de cv. California Wonder infectadas con *M. enterolobii*.
Table 2. Effect of *B. subtilis* on cv. California Wonder plants infected with *M. enterolobii*.

Tratamiento	Agallas por g de raíz [†]	Huevos por g de raíz [†]	Biomasa fresca (g)		Biomasa seca (g)	
			Raíz	Follaje	Raíz	Follaje
<i>CwBs</i>	0.00±0.00 (0.00±0.00 ^c)	0.00±0.00 (0.00±0.00 ^b)	1.120±0.084 ^{ab}	1.960±0.100 ^b	0.057±0.004 ^a	0.175±0.009 ^b
<i>CwBsMe</i>	26.59±1.94 (1.42±0.03 ^a)	3215.56±338.65 (3.47±0.04 ^a)	1.407±0.124 ^a	2.747±0.162 ^a	0.056±0.007 ^a	0.272±0.011 ^a
<i>CwMe</i>	20.03±1.29 (1.31±0.02 ^b)	3439.39±200.60 (3.52±0.02 ^a)	1.193±0.120 ^{ab}	2.493±0.148 ^a	0.060±0.006 ^a	0.270±0.014 ^a
<i>Control</i>	0.00±0.00 (0.00±0.00 ^c)	0.00±0.00 (0.00±0.00 ^b)	0.820±0.057 ^b	1.713±0.110 ^b	0.042±0.005 ^a	0.160±0.012 ^b

Los valores representan la media±error estándar (n=15). Medias con letra diferente en cada columna son significativamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). [†]El análisis ANOVA se realizó con datos transformados [$\log_{10}(x + 1)$], los valores se muestran entre paréntesis. *Cw*: cv. California Wonder; *CwBs*: *Cw* inoculado solo con *B. subtilis*; *CwBsMe*: *Cw* inoculado con *B. subtilis* y con *M. enterolobii*; *CwMe*: *Cw* inoculado solo con *M. enterolobii*; Control: *Cw* inoculado solo con medio de cultivo. ♦ The values represent the mean ± standard error (n=15). Means with different letters in each column are significantly different (Tukey; $p \leq 0.05$). [†]ANOVA analysis was performed with transformed data [$\log_{10}(x + 1)$], values are shown in parentheses. *Cw*: cv. California Wonder; *CwBs*: *Cw* inoculated only with *B. subtilis*; *CwBsMe*: *Cw* inoculated with *B. subtilis* and with *M. enterolobii*; *CwMe*: *Cw* inoculated only with *M. enterolobii*; Control: *Cw* inoculated only with culture medium.

más biomasa fresca de follaje ($p \leq 0.05$) que el testigo. La biomasa seca de follaje aumentó 40.95% en los tratamientos *CwBsMe* y *CwMe* ($p \leq 0.05$) respecto al testigo (Cuadro 2).

Aun cuando *B. subtilis* (CH90) activó la expresión de los genes de defensa, este efecto no fue determinante para reducir el agallamiento y producción de huevos, de esta forma *M. enterolobii* concluyó con éxito su ciclo de vida en raíces del cv. California Wonder. Xia *et al.* (2019) evaluaron distintas especies de *Bacillus* contra *M. javanica* en plantas de jitomate; y fue *B. halotolerans* la que mostró una mayor reducción de agallas y huevos de *M. incognita*. Por lo tanto, se sugiere que no todas las bacterias del género *Bacillus* pueden tener un efecto antagónico efectivo contra nematodos agalladores.

En este estudio se observó que *B. subtilis* no tuvo un efecto importante sobre la producción de biomasa fresca y seca. En otros, *B. subtilis* se reportó como promotora de crecimiento vegetal y ha sido eficaz para disminuir la infección de *M. incognita* en cultivos de jitomate (Adam *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2016). Sin embargo, en nuestro estudio la cepa CH90 de *B. subtilis* no mostró dichas características, lo cual podría estar relacionado con la agresividad alta de *M. enterolobii*.

Los tratamientos *CwMe* y *CwBsMe* tuvieron mayor biomasa fresca de raíz y follaje, y un incremento en

bacteria of the genus *Bacillus* may have an effective antagonistic effect against root-knot nematodes.

In this study, we observed that *B. subtilis* had no important effect on the production of fresh and dry biomass. In others, *B. subtilis* was reported as a plant growth promoter and has been effective in reducing *M. incognita* infection in tomato crops (Adam *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2016). However, in our study the CH90 strain of *B. subtilis* did not show those characteristics, which could be related to the high aggressiveness of *M. enterolobii*.

The *CwMe* and *CwBsMe* treatments had greater fresh root and foliage biomass, and an increase in dry foliage biomass, which suggests that in our study, *M. enterolobii* had a promoting effect on biomass. *Meloidogyne* spp. can induce transcriptional changes in their hosts in order to be able to develop; these changes can directly affect plant development (Jones *et al.*, 2013). The high values of fresh biomass registered in those treatments that involved *M. enterolobii* could be the result of the metabolic modifications induced by the nematode (for example, accumulation of water in the roots). Since it has been shown that in the compatible interactions of *M. incognita* with tomato and *A. thaliana* over expressions of genes involved in cell transport occur, such as those encoding for aquaporins (Jammes *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2017), and proteins associated

biomasa seca de follaje, lo cual sugiere que en nuestro estudio, *M. enterolobii* tuvo un efecto promotor sobre la biomasa. *Meloidogyne* spp. puede inducir cambios transcripcionales en sus hospederos para poder desarrollarse, estos cambios pueden repercutir directamente en el desarrollo de las plantas (Jones *et al.*, 2013). Los valores altos de biomasa fresca registrados en aquellos tratamientos que involucraron a *M. enterolobii* podrían ser producto de las modificaciones metabólicas que induce el nematodo (por ejemplo, acumulación de agua en las raíces). Ya que se ha demostrado que, en las interacciones compatibles de *M. incognita* con jitomate y *A. thaliana*, ocurren sobreexpresiones de genes implicados en el transporte celular, como aquellos que codifican para acuaporinas (Jammes *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2017), y proteínas asociadas al transporte de agua y la osmorregulación celular (Jammes *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Meloidogyne enterolobii resistió la respuesta temprana de defensa de *C. annuum* dependiente del ácido salicílico (*PR-1* y *PR-5*) e indujo la respuesta dependiente del ácido jasmónico (*PR-12*). Las plantas tratadas con *B. subtilis* (CH90) solo, o en combinación con el nematodo activaron las rutas de defensa dependientes de ambos ácidos. Sin embargo, dicha activación no afectó la reproducción de *M. enterolobii* en raíces de chile.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 717850 proporcionada al primer autor.

LITERATURA CITADA

- Adam, M., H. Heuer, and J. Hallmann. 2014. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PloS One*. 9: 1-8.
- Caarls, L., C. M. Pieterse, and S. Van Wees. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.*, 6: 170.
- García-Neria, M. A., and R. F. Rivera-Bustamante. 2011. Characterization of geminivirus resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 172-182.
- Gruner, K., T. Griebel, H. Návarová, E. Attaran, and J. Zeier. 2013. Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 4: 252.
- Hamamouch, N., C. Li, P. J. Seo, C. M. Park, and E. L. Davis. 2011. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Mol. Plant Pathol.* 12: 355-364.
- Jammes, F., P. Lecomte, J. Almeida-Engler, F. Bitton, M. L. Martin-Magniette, J. P. Renou, P. Abad, and B. Favery. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44: 447-458.
- Jones, J. T., A. Haegeman, E. G. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. Jones, T. Kikuchi, R. Lopez-Manzanilla, J. E. Rius-Palmares, W. M. Wesemael L, and R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14: 946-961.
- Lavrova, V. V., S. V. Zinovieva, Z. V. Udalova, and E. Matveeva. 2017. Expression of *PR* genes in tomato tissues infected by nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949. *Dokl. Biochem. Biophys.* 476: 306-309.
- Leonetti, P., M. C. Zonno, S. Molinari, and C. Altomare. 2017. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Cell Rep.* 36: 621-631.
- Martínez-Medina, A., I. Fernandez, G. B. Lok, M. J. Pozo, C. M. Pieterse, and S. Van Wees. 2017. Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytol.* 213: 1363-1377.
- Mhatre, P. H., C. Karthik, K. Kadirvelu, K. L. Divya, E. P. Venkatasalam, S. Srinivasan, G. Ramkumar, C. Saranyae,

with water transport and cellular osmoregulation (Jammes *et al.*, 2005).

CONCLUSIONS

Meloidogyne enterolobii resisted the salicylic acid-dependent early defense response of *C. annuum* (*PR-1* and *PR-5*) and induced the jasmonic acid-dependent response (*PR-12*). Plants treated with *B. subtilis* (CH90) alone, or in combination with the nematode activated the defense pathways dependent on both acids. However, this activation did not affect the reproduction of *M. enterolobii* in chili roots.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT) for the scholarship 717850 granted to the first author.

—End of the English version—

-----*

- and R. Shanmuganathan. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a potential alternative tool for nematodes bio-control. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17: 119-128.
- Molinari, S., E. Fanelli, and P. Leonetti. 2014. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in *Mi-1*-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Mol. Plant Pathol.* 15: 255-264.
- Niu, D., X. Wang, Y. Wang, X. Song, J. Wang, J. Guo, and H. Zhao. 2016. *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1- and SA-dependent signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469: 120-125.
- Núñez-Pastrana, R., G. F. Arcos-Ortega, R. A. Souza-Perera, C. A. Sánchez-Borges, Y. E. Nakazawa-Uejí, F. J. García-Villalobos, A. A. Guzmán-Antonio, and J. J. Zúñiga-Aguilar. 2011. Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *Eur. J. Plant Pathol.* 131: 669-683.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3: 1101.
- Shim, J. S., C. Jung, S. Lee, K. Min, Y. W. Lee, Y. Choi, J. S. Lee, J. T. Song, J. K. Kim, and Y. D. Choi. 2013. *AtMYB44* regulates *WRKY70* expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Plant J.* 73: 483-495.
- Shukla, N., R. Yadav, P. Kaur, S. Rasmussen, S. Goel, M. Agarwal, A. Jagannath, R. Gupta, and A. Kumar. 2017. Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses. *Mol. Plant Pathol.* 1-19.
- Siddique, S., and F. M. Grundler. 2018. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. *Curr. Opin. Microbiol.* 46: 102-108.
- Villar-Luna, E., R. I. Rojas-Martínez, B. Reyes-Trejo, O. Gómez-Rodríguez, and E. Zavaleta-Mejía. 2017. Mevalonate pathway genes expressed in chilli CM334 inoculated with *Phytophthora capsici* and infected by *Nacobbus aberrans* and *Meloidogyne enterolobii*. *Eur. J. Plant Pathol.* 148: 867-881.
- Vrain T., C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and comparison of eggs and larvae as inocula. *J. Nematol.* 9:249-251.
- Xia, Y., S. Li, X. Liu, C. Zhang, J. Xu, and Y. Chen. 2019. *Bacillus halotolerans* strain LYSX1-induced systemic resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato. *Ann. Microbiol.* 69: 1227-1233.
- Ye, W. M., S. R. Koenning, K. Zhuo, and J. L. Liao. 2013. First report of *Meloidogyne enterolobii* on cotton and soybean in North Carolina, United States. *Plant Dis.* 97: 1262-1262.
- Zhang, X., C. Wang, Y. Zhang, Y. Sun, and Z. Mou. 2012. The Arabidopsis mediator complex subunit16 positively regulates salicylate-mediated systemic acquired resistance and jasmonate/ethylene-induced defense pathways. *Plant Cell.* 24: 4294-4309.

***Pinus greggii* ENGELM.: RESPUESTA A LA INOCULACIÓN MICORRÍCICA CONTROLADA Y A LA FERTILIZACIÓN EN VIVERO**

***Pinus greggii* ENGELM.: RESPONSE TO CONTROLLED MYCORRHIZAL INOCULATION AND FERTILIZATION IN NURSERY**

Silvia **Salcido-Ruiz**¹, José Ángel **Prieto-Ruiz**^{2*}, José Leonardo **García-Rodríguez**³,
Enrique **Santana-Aispuro**⁴, Jorge Armando **Chávez-Simental**⁵

¹Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango. ²Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango. (jprieto@ujed.mx). ³Campo Experimental Valle del Guadiana. Centro de Investigación Regional Norte-Centro. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 34170. Durango, Durango. ⁴Vivero Forestal "Praxedis Guerrero". Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente del Estado de Durango. 34070. Durango, Durango. ⁵Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera. Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango.

RESUMEN

En México, la producción de planta de *Pinus greggii* Engelm. en vivero debe alcanzar estándares morfológicos y fisiológicos fijados por la Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales (NMX-AA-170-SCFI-2016), donde destaca la nutrición y la presencia de micorrizas. El objetivo del estudio fue evaluar el crecimiento de *Pinus greggii* en la etapa de vivero, con base en la inoculación micorrízica con dos productos comerciales y el uso de un fertilizante de liberación controlada en dos dosis. La hipótesis fue que al menos una combinación del tipo de inoculante y dosis de fertilización, favorece el crecimiento de las plantas en proporción mayor. El diseño experimental fue bloques completos al azar con nueve tratamientos, los datos se analizaron con ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. A los 11 meses de la siembra se analizaron variables morfológicas, índices de calidad, porcentaje de supervivencia y de micorrización; además, se caracterizaron las ectomicorrizas desarrolladas. La supervivencia varió de 64 a 99%, con los porcentajes mayores en los tratamientos inoculados solo con hongos nativos o exóticos. Las plantas mostraron diferencias significativas en las variables morfológicas; los tratamientos combinados, sin importar la dosis o tipo de inoculante, mostraron resultados mejores. El porcentaje de colonización micorrízica varió de 37 a 63%, y destacaron los tratamientos

ABSTRACT

In Mexico, *Pinus greggii* Engelm. in nursery must reach morphological and physiological standards set by the Mexican Standard for the Certification of the Operation of Forest Nurseries (NMX-AA-170-SCFI-2016), where nutrition and the presence of mycorrhizae are emphasized. The objective this study was to evaluate the growth of *Pinus greggii* in the nursery stage, based on mycorrhizal inoculation with two commercial products and a controlled release fertilizer in two doses. The hypothesis was that at least a combination of type of inoculant and fertilization dose would favor the growth of the plants in a greater proportion. The experimental design consisted of complete randomized blocks with nine treatments. Data were analyzed with ANOVA and the means of treatments were compared with the Tukey test. At 11 months after sowing, morphological variables, quality indices, percentage of survival and mycorrhization were analyzed. In addition, the developed ectomycorrhizae were characterized. Survival ranged from 64 to 99%, with the highest percentages in treatments inoculated only with native or exotic fungi. Plants showed significant differences in morphological variables; the combined treatments, regardless of the dose or type of inoculant, showed better results. The percentage of mycorrhizal colonization ranged from 37 to 63%, and the treatments with better response were those inoculated with spores of exotic fungi and fertilized (both doses). The diversity of fungal spores contained in the commercial inoculants did not coincide with the fungal species that established symbiosis with *P. greggii*. Thus, the addition of controlled release fertilizer and inoculation with commercial products resulted in quality plant production.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2954-535X>

Recibido: agosto, 2020. Aprobado: abril, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 273-290. 2021.

inoculados con esporas de hongos exóticos y fertilizados (en ambas dosis). La diversidad de esporas de hongos contenidos en los inoculantes comerciales no coincidió con las especies de hongos que establecieron simbiosis con *P. greggii*. En conclusión, la adición de fertilizante de liberación controlada e inoculación con productos comerciales dio como resultado una producción de planta de calidad.

Palabras clave: calidad de planta, fertilizante de liberación controlada, inoculantes comerciales, micorrización.

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas son el resultado de la relación simbiótica mutualista entre las raíces de las plantas vasculares y cierto tipo de hongos del suelo, estos últimos contribuyen a que el agua y los nutrientes sean mejor aprovechados por las plantas, y a cambio reciben elementos carbonados para alimentarse (Barragán-Soriano *et al.*, 2018). Un elemento importante para incrementar la calidad de planta en especies del género *Pinus* en vivero, es el uso de inoculantes con propágulos provenientes de zonas boscosas, o elaborados de manera comercial por ser más prácticos (Valdés *et al.*, 2019).

Pinus greggii es nativo de la Sierra Madre Oriental de México y entre sus cualidades destaca su capacidad para desarrollarse en sitios deficientes de nutrientes; se utiliza con fines de protección o restauración en áreas degradadas, así como para establecer plantaciones forestales comerciales (Dvorak, 2010). La producción de planta de *P. greggii* en vivero abarca un periodo de seis a ocho meses, tiempo en el cual el material vegetativo debe tener condiciones apropiadas de luminosidad, temperatura, humedad, nutrición, espacio de crecimiento y sanidad. De acuerdo con la Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales (NMX-AA-170-SCFI-2016) (Secretaría de Economía, 2016), al salir del vivero las plantas de esta especie deben tener de 25 a 30 cm de altura, ≥ 4 mm de diámetro a la base del cuello, seis a ocho meses de edad, con presencia de micorrizas en sus raíces y 25% o más de lignificación del tallo; estos parámetros son predictores de que tendrán probabilidades mayores de supervivencia y crecimiento en campo.

Escobar-Alonso y Rodríguez-Trejo (2019) resaltaron la importancia de estudiar aspectos sobre inoculación controlada en especies del género *Pinus* y su

Key words: plant quality, controlled release fertilizer, commercial inoculants, mycorrhization.

INTRODUCTION

Mycorrhizae are the result of the mutualistic symbiotic relationship between the roots of vascular plants and certain types of soil fungi. The latter contribute to the better use of water and nutrients by plants, and in return they receive carbon elements to feed (Barragán-Soriano *et al.*, 2018). An important element to increase plant quality in species of the genus *Pinus* in nurseries is the use of inoculants with propagules from wooded areas, or commercial strains because they are more practical (Valdés *et al.*, 2019).

Pinus greggii is native to the Sierra Madre Oriental of Mexico and among its qualities, the predominant is the ability to develop well in nutrient deficient sites. It is used for protection or restoration purposes in degraded areas, as well as to establish commercial forest plantations (Dvorak, 2010). The production of *P. greggii* plants in the nursery lasts a period of six to eight months, time during which the vegetative material must have appropriate conditions of light, temperature, humidity, nutrition, growth space and health. According to the Mexican standard Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales (NMX-AA-170-SCFI-2016) (Secretaría de Economía, 2016), at ending the nursery period, plants of this species must be 25 to 30 cm tall, ≥ 4 mm in diameter at the base of the neck, six to eight months old, with mycorrhizae evident in their roots, and 25% or more lignification of the stem. These parameters are considered signs that they will have greater probabilities of survival and growth in the field.

Escobar-Alonso and Rodríguez-Trejo (2019) highlighted the importance of studying some aspects of controlled inoculation in species of the *Pinus* genus and their effects on the quality of the plants produced in nursery. The objective of this research was to evaluate the growth of *P. greggii* in the nursery stage plus inoculation with mycorrhizal fungi from two commercial products, and the use of a controlled release fertilizer in two doses. The hypothesis was that at least a combination of type of inoculant and dose of fertilization would favor the growth of plants in a greater proportion.

efecto en la calidad de planta producida en vivero. El objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento de *P. greggii* en la etapa de vivero, más la inoculación con hongos micorrícicos de dos productos comerciales y el uso de un fertilizante de liberación controlada en dos dosis. La hipótesis fue que al menos una combinación del tipo de inoculante y dosis de fertilización, favorece el crecimiento de las plantas en proporción mayor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El estudio se realizó en el vivero forestal “Praxedis Guerrero”, ubicado en el kilómetro 12.5 de la carretera Durango-El Mezquital (23° 56' 58.3" N y 104° 34' 07.4" O, 1890 m de altitud). El vivero pertenece a la Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente del Gobierno del estado de Durango, México, tiene una superficie de 20 ha y una capacidad de producción de cinco millones de plantas.

Producción de la planta

La planta se produjo en envases, conocidos como tubetes, de polietileno rígido de color negro, con guías de raíces internas y 165 mL de capacidad, colocados en rejillas portatubetes de 98 cavidades. Como sustrato se empleó una mezcla de turba (*Sphagnum*) (57%), vermiculita (23%) y perlita (20%). La porosidad total del sustrato fue 68%, la porosidad de aireación fue 32% y la capacidad de retención de agua fue 36%; de acuerdo con la norma mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016, son valores adecuados para el desarrollo del sistema de raíces de las plantas (Secretaría de Economía, 2016).

Semilla de *Pinus greggii* Engelm. var. *greggii* procedente del estado de Nuevo León se utilizó. Antes de la siembra, como tratamiento pre germinativo la semilla se sumergió en agua a temperatura ambiente durante 24 h, después se escurrió para eliminar el exceso de agua, enseguida se aplicó fungicida Tecto'60 (Thiabendazol: 2-(4-thiazolil)-1H-benzimidazol) para evitar daños por hongos productores de *Damping off*, y se secó a la intemperie. La siembra se realizó el 18 de octubre de 2018 y se colocaron dos semillas por envase.

Durante el desarrollo del experimento la planta se colocó en diversas áreas de producción en el vivero, con base en su etapa de crecimiento. En la etapa de establecimiento, 18 de octubre de 2018 al 30 de enero de 2019, la planta permaneció en un área con estructura de metal y ventanas laterales, cubierta con película

MATERIALS AND METHODS

Location

The study was carried out in the “Praxedis Guerrero” forest nursery, located at kilometer 12.5 of the Durango-El Mezquital highway (23° 56' 58.3" N and 104° 34' 07.4" W, 1890 m altitude). The nursery belongs to the Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente under the State Government of Durango, Mexico; it has an area of 20 ha and a production capacity of five million plants.

Plant production

Plants were produced in containers, known as tubes, made of rigid black polyethylene, with internal root guides and a 165 mL capacity, placed in 98-cavity tube racks. As substrate we used a mixture of peat (*Sphagnum*) (57%), vermiculite (23%) and perlite (20%). The total porosity of the substrate was 68%, the aeration porosity was 32% and the water retention capacity was 36%; according to the Mexican standard NMX-AA-170-SCFI-2016, these are adequate values for the development of the root system of plants (Secretaría de Economía, 2016).

Pinus greggii Engelm. var. *greggii* seed from the state of Nuevo León was used. Before sowing, as a pre-germination treatment, the seed was immersed in water at room temperature for 24 h, then drained to remove water excess, then Tecto'60 fungicide (Thiabendazole: 2-(4-thiazolyl) - 1H-benzimidazole) was applied to avoid damage by *Damping off*, and dried in the open. Sowing was carried out on October 18, 2018 and two seeds were placed per container.

During the experiment, the plants were placed in different production areas in the nursery, according to their growth stage. In the establishment stage, from October 18, 2018 to January 30, 2019, plants remained in an area with a metal structure and side windows, covered with a 720 μ m milky white polyethylene film and a 50% shade mesh was placed over it. The average temperature was 17 °C, and relative humidity was 74%. From January 31 to March 17, 2019, the plants continued growing in a tunnel-type greenhouse covered with 720 μ m green polyethylene film and 50% shade mesh, where the average temperature was 18 °C, and relative humidity was 47%.

Since five months after sowing, March 18, 2019 until May 17, 2019, the experiment was in an area with a 50% shade mesh, where the average temperature was 18 °C, and relative humidity 46%. For the pre-conditioning stage, May 18 to September 17, 2019, plants were exposed to outdoor conditions, where the average temperature was 23 °C, and relative humidity was 41%.

de polietileno color blanco lechoso de 720 μm y sobre ésta se colocó una malla sombra al 50%; la temperatura promedio fue 17 °C y la humedad relativa fue 74%. Del 31 de enero al 17 de marzo de 2019 la planta continuó su crecimiento en un invernadero tipo túnel cubierto con película de polietileno color verde de 720 μm y malla sombra de 50%, donde el promedio de temperatura fue 18 °C y la humedad relativa fue 47%.

Desde los cinco meses de la siembra, 18 de marzo de 2019, hasta el 17 de mayo de 2019, el experimento estuvo en un área con malla sombra al 50%, donde la temperatura promedio fue 18 °C y la humedad relativa 46%. Para la etapa de pre acondicionamiento, 18 de mayo al 17 de septiembre de 2019, la planta se expuso a condiciones de intemperie, donde la temperatura promedio fue 23 °C y la humedad relativa fue 41%.

Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue bloques completos al azar con nueve tratamientos y cuatro repeticiones, con 49 plantas cada una. Los tratamientos incluyeron inoculación controlada con dos productos comerciales fabricados en México (Ecto-Myc® y MycorTree Ecto-inyectable®), y fertilización con Multicote 8®, de liberación controlada y con una composición de 11N-28P-11K, más microelementos (Cuadro 1). El fertilizante se aplicó durante la preparación de la mezcla de sustrato.

El inoculante Ecto-Myc® contenía una mezcla de esporas de hongos nativos de México: *Amanita rubescens* Pers., *Amanita* sp., *Lactarius indigo* [Schwein] Fr., *Ramaria* sp. y *Boletus* sp. El inoculante MycorTree Ecto-inyectable® incluía esporas de hongos exóticos: *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch y *Scleroderma citrinum* Pers. Las dosis utilizadas en los tratamientos de inoculación controlada se estimaron de acuerdo con la concentración de esporas en cada inoculante, determinada en una Cámara de

Experimental design and treatments

The experimental design was arranged in complete randomized blocks with nine treatments and four replications, with 49 plants each. Treatments included controlled inoculation with two commercial products manufactured in Mexico (Ecto-Myc® and MycorTree Ecto-injectable®), and fertilization with Multicote 8®, controlled release, and with a composition of 11N-28P-11K, plus microelements (Table 1). The fertilizer was applied during preparation of the substrate mix.

The Ecto-Myc® inoculant contained a mixture of spores of fungi native to Mexico: *Amanita rubescens* Pers., *Amanita* sp., *Lactarius indigo* [Schwein] Fr., *Ramaria* sp., and *Boletus* sp. The MycorTree Ecto-injectable® inoculant included spores of exotic fungi: *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, and *Scleroderma citrinum* Pers. The doses used in the controlled inoculation treatments were estimated according to the concentration of spores in each inoculant, determined in a Neubauer Chamber. Ecto-Myc® had a concentration of 1.05×10^7 spores mL^{-1} , and MycorTree Ecto-injectable® 6.5×10^6 spores mL^{-1} . The inoculation was performed four months after sowing when there were secondary roots. The inoculation technique consisted of injecting the spore solution directly into the root system, 5 cm below the upper level of the substrate. Then, a light irrigation was applied so that the solution had greater contact with the root system.

Variable evaluation and statistical analysis

At 11 months after sowing, seven months after inoculation, we assessed the survival percentage of the plants. Ten individuals per experimental unit were randomly extracted to measure height from the stem base to the apical bud (PILOT® model

Cuadro 1. Inoculantes micorrícicos y fertilizante de liberación controlada evaluados en el crecimiento de *P. greggii* en vivero.

Table 1. Mycorrhizal inoculants and controlled release fertilizer evaluated in the growth of *P. greggii* in the nursery.

Tratamiento	Descripción
T	Sin fertilizante y sin inoculante (testigo)
FB	Fertilizante Multicote 8® (3 g L^{-1})
FA	Fertilizante Multicote 8® (6 g L^{-1})
HN	Inoculante Ecto-Myc® (1 mL planta $^{-1}$)
HE	Inoculante MycorTree Ecto-inyectable® (1.5 mL planta $^{-1}$)
HNFB	Inoculante Ecto-Myc® (1 mL planta $^{-1}$) y fertilizante Multicote 8® (3 g L^{-1})
HNFA	Inoculante Ecto-Myc® (1 mL planta $^{-1}$) y fertilizante Multicote 8® (6 g L^{-1})
HEFB	Inoculante MycorTree Ecto-inyectable® (1.5 mL planta $^{-1}$) y fertilizante Multicote 8® (3 g L^{-1})
HEFA	Inoculante MycorTree Ecto-inyectable® (1.5 mL planta $^{-1}$) y fertilizante Multicote 8® (6 g L^{-1})

Neubauer. Ecto-Myc® tuvo una concentración de 1.05×10^7 esporas mL^{-1} , y MycorTree Ecto-injectable® 6.5×10^6 esporas mL^{-1} . La inoculación se realizó cuatro meses después de la siembra cuando había raíces secundarias. La técnica de inoculación consistió en inyectar la solución con esporas directamente al sistema radical, 5 cm debajo del nivel superior del sustrato; después, se aplicó un riego ligero a fin de que la solución tuviera contacto mayor con el sistema de raíces.

Evaluación de variables y análisis estadístico

A los 11 meses de la siembra, siete meses después de la inoculación, se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas. De manera aleatoria se tomaron 10 individuos por unidad experimental para medir altura desde la base del tallo a la yema apical (regla graduada modelo PILOT®), diámetro del cuello de la raíz (vernier digital Truper® modelo CALDI-6MP), biomasa húmeda y seca de la parte aérea, radical y total.

Para estimar biomasa seca las plantas se deshidrataron a 65°C en horno de ventilación forzada (Felisa® modelo FE-291D) hasta que alcanzaron peso constante. Después, los pesos secos se registraron en una balanza analítica (Ohaus® modelo PA1502 con una precisión de 0.001 g) y se calcularon tres índices: relación biomasa seca de la parte aérea/biomasa seca de la parte radical, índice de lignificación (ecuación 1) e Índice de Calidad de Dickson (ecuación 2):

$$IL = \left(\frac{\text{Peso total seco (g)}}{\text{Peso total húmedo (g)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$ICD = \frac{\text{Peso total seco (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}} \quad (2)$$

El porcentaje de colonización micorrícica (PCM) se evaluó en tres plantas de cada unidad experimental, seleccionadas al azar. Para ello se eliminó el sustrato del sistema de raíces con agua corriente y de cada planta se tomaron 100 cm de raíces secundarias, que para su conservación se colocaron en fijador (FAA) compuesto por formaldehído (10%), ácido acético glacial (5%) alcohol 96° (50%) y agua destilada (35%), hasta el momento de la evaluación. El número de ápices, con o sin micorrizas, se determinó por observación directa con un estereoscopio (Leica® EZ4 HD, Suiza) (Figura 1) y se calculó el PCM (ecuación 3).

$$PCM = \left(\frac{\text{Ápices micorrizados}}{\text{Ápices micorrizados} + \text{Ápices no micorrizados}} \right) \times 100 \quad (3)$$

graduated ruler), root neck diameter (Truper® digital vernier model CALDI-6MP); as well as biomass, fresh and dry, from aerial and root sections, and of complete plants.

To estimate the dry biomass, plants were dehydrated at 65°C in a forced ventilation oven (Felisa® model FE-291D) until they reached constant weight. Then, the dry weights were recorded on an analytical balance (Ohaus® model PA1502 with a precision of 0.001 g) and three indices were calculated: dry biomass ratio of the aerial section/dry biomass of the root section, lignification index (equation 1) and Dickson's Quality Index (equation 2):

$$IL = \left(\frac{\text{Peso total seco (g)}}{\text{Peso total húmedo (g)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$ICD = \frac{\text{Peso total seco (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}} \quad (2)$$

The percentage of mycorrhizal colonization (PCM) was evaluated in three plants of each experimental unit, randomly selected. To this end, we removed substrate of the root system with running water and 100 cm of secondary roots were taken from each plant. For their conservation we placed them in a fixative solution (FAA) composed of formaldehyde (10%), glacial acetic acid (5%) 96° alcohol (50%), and distilled water (35%), until the moment of evaluation. The number of apices, with or without mycorrhizae, was determined by direct observation with a stereoscope (Leica® EZ4 HD, Switzerland) (Figure 1) and the PCM was calculated (equation 3).

$$PCM = \left(\frac{\text{Ápices micorrizados}}{\text{Ápices micorrizados} + \text{Ápices no micorrizados}} \right) \times 100 \quad (3)$$

The percentage values of mycorrhizal colonization, as well as those of survival were transformed with the arcsine and square root functions. We performed analyses of variance (ANOVA) on the variables and used the Tukey test for the multiple comparison of means ($p \leq 0.05$), with the SAS statistical package (SAS Institute, 2009).

Figure 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Survival

Survival showed differences ($p \leq 0.05$) among treatments, with a variation from 64 to 99%; the

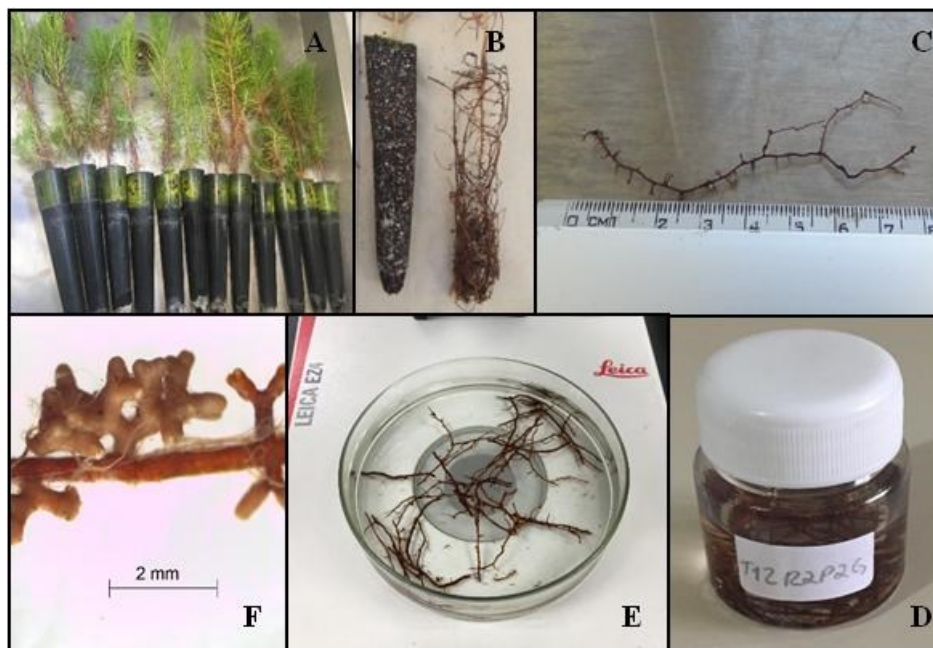


Figura 1. Proceso de determinación del porcentaje de micorrización. A) Planta evaluada. B) Planta con y sin sustrato. C) Selección de raíces secundarias. D) Muestra de raíces en conservación. E) Evaluación de raíces. F) Estructura micorrízica.

Figure 1. Process for determining the percentage of mycorrhization. A) Evaluated plant. B) Plant with and without substrate. C) Selection of secondary roots. D) Sample of roots in conservation. E) Root evaluation. F) Mycorrhizal structure.

Los valores porcentuales de colonización micorrízica así como los de supervivencia, se transformaron con las funciones arcoseno y raíz cuadrada. En las variables evaluadas se realizaron análisis de varianza (ANDEVA), con pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia

La supervivencia presentó diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, con una variación de 64 a 99%; los porcentajes mayores se obtuvieron en los tratamientos HN y HE, caracterizados por tener solo inóculo. Los tratamientos con fertilización, solos o combinados con inóculo, así como el T, tuvieron resultados intermedios; los dos tratamientos con supervivencia menor fueron los inoculados combinados con la dosis alta de fertilización (Figura 2).

La mortalidad ocurrió al inicio de la etapa de pre acondicionamiento (mes de mayo), cuando la planta

highest percentages were obtained in the HN and HE treatments, which only contained inoculum. The treatments with fertilization, alone or combined with inoculum, as well as the T, had intermediate results. The two treatments with the lowest survival were those where inoculation was combined with the higher dose of fertilization (Figure 2).

Mortality occurred at the beginning of the pre-conditioning stage (in May), when plants were placed outdoors, due to a drastic change in the environmental conditions of cultivation after being exposed to greater solar radiation, they obtained an average of $1898 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation (RFA) compared to $497 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of RFA under shade mesh, which caused light and thermal stress in the plant. Escobar-Alonso (2012) indicated that in this stage a decrease in growth is induced and resistance to greater stress is promoted; which influence the morphological and physiological attributes of the plants. In turn, this favors survival on the field; however, for this to occur, changes in the environment must be gradual.

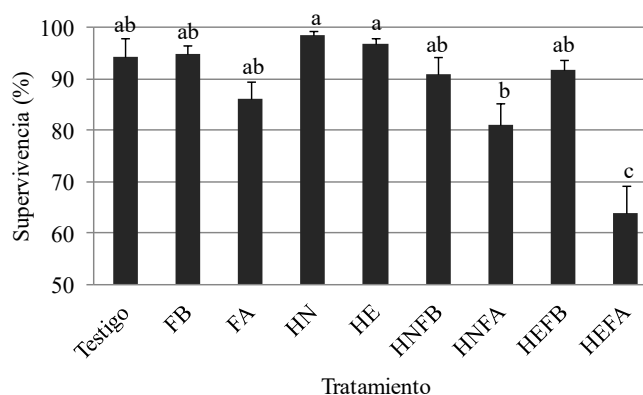


Figura 2. Supervivencia de *P. greggii* a los 11 meses de edad (Tukey; $p \leq 0.05$) bajo nueve combinaciones de tratamientos de inoculación micorrícica y fertilización en vivero. FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 2. Survival of *P. greggii* at 11 months of age (Tukey; $p \leq 0.05$) under nine combination treatments of mycorrhizal inoculation and fertilization in the nursery. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

se colocó a la intemperie, debido a un cambio drástico de las condiciones ambientales de cultivo al recibir radiación solar mayor, en promedio de $1898 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (RFA) en comparación con $497 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA bajo malla sombra, lo que ocasionó estrés lumínico y térmico en la planta. Escobar (2012) indicó que en esta etapa se induce disminución del crecimiento y se promueve resistencia al estrés mayor; lo cual influye sobre los atributos morfológicos y fisiológicos de la planta. A su vez, esto permite que la supervivencia se favorezca en campo; sin embargo, para que esto ocurra los cambios en el ambiente deben ser paulatinos.

Indicadores morfológicos y calidad de planta

El valor promedio de altura presentó diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, los valores más altos (35.0 y 34.8 cm) se observaron en las plantas producidas con los tratamientos HNFB y HNFA (Figura 3), donde la inoculación y fertilización de manera conjunta favoreció el incremento en altura; el caso contrario ocurrió cuando estos factores se utilizaron de forma separada.

Como criterio de calidad de planta, la norma mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016 establece que la altura recomendada para *P. greggii* debe ser entre

Morphological indicators and plant quality

The average height value showed differences ($p \leq 0.05$) among treatments; the highest values (35.0 and 34.8 cm) were observed in the plants produced with the HNFB and HNFA treatments (Figure 3), where the inoculation and fertilization together favored height increase; the opposite occurred when these factors were used separately.

As a criterion of plant quality, the Mexican standard NMX-AA-170-SCFI-2016 establishes that the recommended height for *P. greggii* should be between 25 and 30 cm (Secretaría de Economía, 2016). Results showed that the treatments with mycorrhizal inoculum, in combination with fertilization; and the treatments with fertilization only (regardless of the dose), obtained the minimum height required; the rest of the treatments did not reach the established criteria.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) evaluated the growth of *P. greggii* inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. without fertilizer, 14 months after sowing; in the uninoculated plant they obtained a height of 11 cm, while in the inoculated plant it was 27 cm. Bautista *et al.* (2018) analyzed the growth of *P. greggii* under different fertilization routines, and when using only

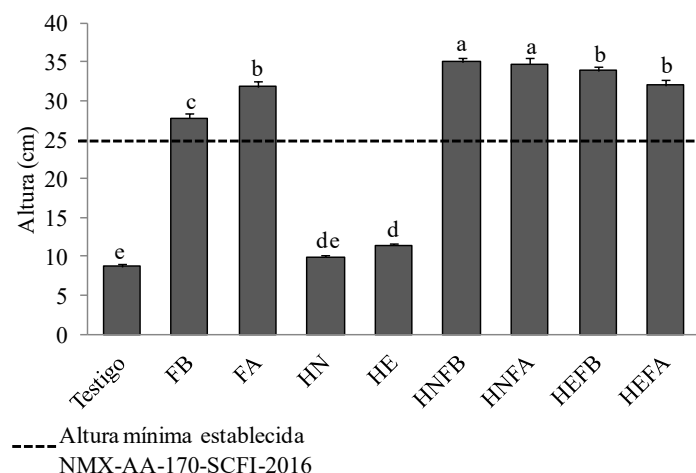


Figura 3. Altura promedio de *P. greggii* a los 11 meses de edad (Tukey; $p \leq 0.05$) bajo nueve tratamientos de inoculación micorrízica y fertilización en vivero. FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 3. Average height of *P. greggii* at 11 months of age (Tukey; $p \leq 0.05$) under nine treatments of mycorrhizal inoculation and fertilization in the nursery. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

25 y 30 cm (Secretaría de Economía, 2016); los resultados mostraron que los tratamientos con inóculo micorrízico, en combinación con fertilización; y los tratamientos sólo con fertilización (sin importar la dosis), obtuvieron la altura mínima requerida; el resto de los tratamientos no alcanzaron el criterio establecido.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) evaluaron el crecimiento de *P. greggii* inoculado con el hongo ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. sin fertilizante, 14 meses después de la siembra, en planta sin inocular obtuvieron una altura de 11 cm, mientras que en la planta inoculada fue 27 cm. Bautista *et al.* (2018) analizaron el crecimiento de *P. greggii* bajo rutinas de fertilización diferentes y al utilizar solo fertilizante de liberación controlada, con dosis de 6 kg m^{-3} , la altura promedio fue 31.3 cm, siete meses después de su siembra.

Respecto al diámetro del cuello de la raíz existieron diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, los resultados más favorables se observaron cuando se combinó la fertilización con la inoculación de hongos ectomicorrízicos, sin importar la dosis y el tipo de inoculante. En cambio, los valores inferiores, al igual que en la variable altura, se encontraron en

controlled release fertilizer, with doses of 6 kg m^{-3} , the average height was 31.3 cm, seven months after sowing.

Regarding the diameter of the root neck, there were differences ($p \leq 0.05$) among treatments; the most favorable results were observed when fertilization was combined with the inoculation of ectomycorrhizal fungi, regardless of the dose and type of inoculant. On the other hand, the lower values, as in the height variable, were found in the unfertilized treatments (T, HN and HE) (Figure 4), which did not reach the minimum diameter required by the Mexican standard NMX-AA -170-SCFI-2016 ($\geq 4 \text{ mm}$) to be labelled as quality plants (Ministry of Economy, 2016).

Rentería-Chávez *et al.* (2017) evaluated the effect of inoculation with three species of ectomycorrhizal fungi on the growth and nutrition of *P. greggii*. They found that the diameter and height variables were higher in mycorrhized plants, regardless of the species used. Martínez-Reyes *et al.* (2012) obtained diameters of 1.6 mm in uninoculated *P. greggii* plants and 2.3 mm in mycorrhizal plants, the same as the T treatment, and similarly to the HN and HE treatments of this study.

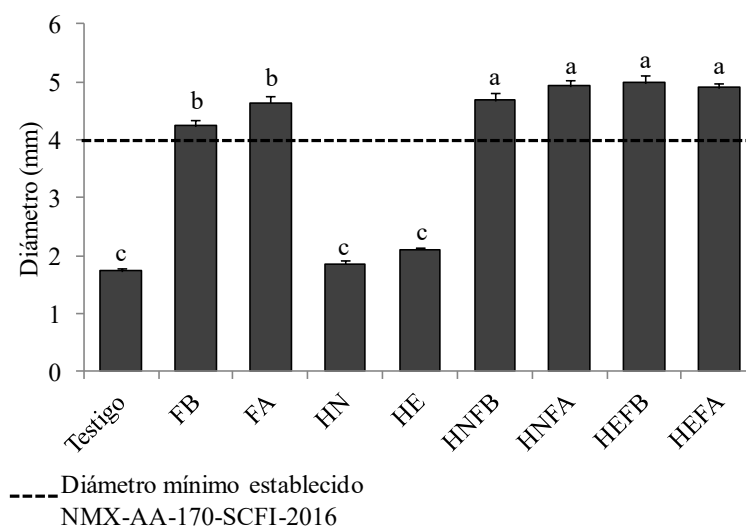


Figura 4. Diámetro promedio de *P. greggii* a los 11 meses de edad (Tukey; $p \leq 0.05$) bajo nueve tratamientos de inoculación micorrícica y fertilización en vivero. FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 4. Average diameter of *P. greggii* at 11 months of age (Tukey; $p \leq 0.05$) under nine treatments of mycorrhizal inoculation and fertilization in the nursery. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

los tratamientos sin fertilizar (T, HN y HE) (Figura 4), los cuales no alcanzaron el diámetro mínimo requerido por la norma mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016 (≥ 4 mm) para considerarla como planta de calidad (Secretaría de Economía, 2016).

Rentería-Chávez *et al.* (2017) evaluaron el efecto de la inoculación con tres especies de hongos ectomicorrícicos sobre el crecimiento y nutrición de *P. greggii*, encontraron que las variables diámetro y altura resultaron superiores en las plantas micorrizadas, sin importar la especie utilizada. Martínez-Reyes *et al.* (2012) obtuvieron diámetros de 1.6 mm en plantas de *P. greggii* sin inocular y de 2.3 mm en plantas micorrizadas, igual que el tratamiento T y de forma similar que los tratamientos HN y HE de este estudio.

Los resultados de biomasa seca aérea mostraron diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, el intervalo de valores que destaca es de 3.9 a 4.4 g, donde sobresalió el tratamiento HNFA, seguido de HEFA y FA, caracterizados por haberse fertilizado con dosis altas. En biomasa seca radical se obtuvieron valores promedio de 0.2 a 2.3 g, los tratamientos HNFB y HEFA resultaron ser los mejores. La biomasa seca total varió de 0.4 a 6.3 g, con los valores mayores en los tratamientos donde se aplicó inóculo micorrícico

The aerial dry biomass results showed differences ($p \leq 0.05$) among treatments; the higher interval of values was 3.9 to 4.4 g, where treatment HNFA was the better, followed by HEFA and FA. All of them characterized as high dose fertilization. In root dry biomass, average values of 0.2 to 2.3 g were obtained; the HNFB and HEFA treatments were the best. The total dry biomass ranged from 0.4 to 6.3 g, recording the highest values in the treatments where mycorrhizal inoculum was applied combined with fertilizer, regardless of the dose (Table 2).

In all cases, the treatments without fertilization (T, HN and HE) presented the lowest values, more than 10 times lower than those obtained in the higher treatments. Thus, on this point, we emphasize the importance of combining fertilization and inoculation to produce quality plants (Figure 5).

Biomass production in the treatments with high fertilization was similar to that reported by Vicente-Arbona *et al.* (2019), who analyzed plant quality of *P. greggii* produced in substrates based on sawdust and two doses of controlled release fertilizer (6 and 8 g L^{-1}), inoculated with *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke. Sáenz *et al.* (2014) evaluated the effect of fertilization on the quality of the *P. greggii* plants produced in

Cuadro 2. Biomasa seca de *P. greggii* a los 11 meses de edad bajo nueve tratamientos de inoculación micorrízica y fertilización en vivero. T= Testigo, FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Table 2. Dry biomass of *P. greggii* at 11 months of age under nine treatments of mycorrhizal inoculation and nursery fertilization. T = Control, FB= Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE= Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

Tratamiento	Biomasa aérea (g)	Biomasa radical (g)	Biomasa total (g)
T	0.2±0.01 d	0.2±0.01 e	0.4±0.02 c
FB	2.6±0.14 c	1.6±0.07 d	4.2±0.19 b
FA	3.9±0.16 ab	1.9±0.07 bc	5.8±0.22 a
HN	0.3±0.02 d	0.3±0.02 d	0.5±0.03 c
HE	0.4±0.02 d	0.4±0.03 d	0.8±0.04 c
HNFB	3.8±0.10 b	2.3±0.06 a	6.1±0.14 a
HNFA	4.4±0.15 a	1.9±0.08 bc	6.3±0.20 a
HEFB	3.7±0.18 b	2.1±0.10 ab	5.8±0.26 a
HEFA	4.0±0.12 ab	2.3±0.07 a	6.3±0.17 a

Medias con letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). ± Error estándar de la media. ♦ Means with different letters in a column indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$). ± Standard error of the mean.

combinado con fertilizante, sin importar la dosis (Cuadro 2).

En todos los casos, los tratamientos sin fertilización (T, HN y HE) presentaron los valores menores, más de 10 veces inferiores respecto a los obtenidos en los tratamientos superiores; en este punto destacamos la importancia de combinar la fertilización y la inoculación para producir planta de calidad (Figura 5).

La producción de biomasa en los tratamientos con fertilización alta fue similar a la documentada por Vicente-Arbona *et al.* (2019), quienes analizaron la calidad de planta de *P. greggii* producida en sustratos con base en aserrín y dos dosis de fertilizante de liberación controlada (6 y 8 g L⁻¹) e inoculados con *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke. Sáenz *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la fertilización en la calidad de planta de *P. greggii* producida en un vivero, obtuvieron una producción de biomasa seca total promedio de 2.9 g, y lo atribuyeron a la fertilización inadecuada. En nuestro estudio se obtuvo producción de biomasa seca total mayor que la registrada por estos autores.

a nursery; authors obtained an average total dry biomass production of 2.9 g, and attributed this value to inadequate fertilization. In our study, the total dry biomass production was higher than that recorded by these authors.

Results in the T, HN and HE treatments were similar to those found by Barragán-Soriano *et al.* (2018) who evaluated the contribution of the ectomycorrhizal fungus *H. mesophaeum* to the growth of *P. montezumae* Lamb. Regarding the lignification index, a percentage higher than 25% represents the reference value for a quality plant, since it reflects the optimal level of pre-conditioning. Our results showed that, except for T, HN and HE, plants produced with the other treatments had higher values than those recommended, with HNFB in the upper statistical group.

For the aerial : root dry biomass ratio, values should be between 1.5 and 2.5; of the evaluated treatments, only T, HN and HE were lower than that indicated interval. The remaining treatments showed favorable values, with a better balance between the

Los resultados en los tratamientos T, HN y HE fueron similares a los encontrados por Barragán-Soriano *et al.* (2018), quienes evaluaron el aporte del hongo ectomicorrícico *H. mesophaeum* al crecimiento de *P. montezumae* Lamb. Respecto al índice de lignificación, un porcentaje mayor a 25% representa el valor de referencia para planta de calidad, ya que refleja el nivel óptimo de pre acondicionamiento. Los resultados mostraron que salvo el T, HN y HE, la planta producida en los demás tratamientos tuvieron valores superiores al recomendado, con HNFB en el grupo estadístico superior.

Para la relación entre biomasa seca aérea y radical los valores deben ubicarse entre 1.5 y 2.5; de los tratamientos evaluados, solo el T, HN y HE fueron inferiores al intervalo indicado. El resto de tratamientos presentaron valores favorables, con equilibrio mejor entre la relación parte aérea y radical; cabe resaltar que son los mismos tratamientos donde la lignificación fue superior a 25% (Cuadro 3).

El Índice de Calidad de Dickson resultó mejor en los tratamientos combinados, sin importar la dosis o el tipo de inoculante, así como en el tratamiento FA. En contraste, los tratamientos T, HN y HE obtuvieron los valores más bajos, debido a la ausencia de fertilizante (Cuadro 3). Estos resultados significan la obtención de un índice mayor que el logrado por Bautista *et al.* (2018), Castro-Garibay *et al.* (2018) y Maldonado-Benitez *et al.* (2011).

Los valores menores en las variables de crecimiento e índices de calidad, sobre todo en los tratamientos sin fertilización, al igual que en el estudio de Domínguez-Núñez *et al.* (2004), se atribuyen a que la simbiosis micorrícica, en dependencia de su fase de establecimiento y funcionalidad, puede volverse un costo en el consumo de carbono para la planta hospedera, lo cual se expresa con un crecimiento menor (Pinkas *et al.* 2000).

Inoculación controlada

El porcentaje de colonización micorrícica varió de 37 a 63%. El tratamiento HEFA presentó el porcentaje mayor, seguido por el tratamiento HEFB, y en ambos casos destacó la aplicación del inoculante con esporas de hongos exóticos. Después, con valores entre 52 y 55% se ubicaron los tratamientos en donde se aplicó HN o HE, fertilizados y sin fertilizar. El porcentaje menor se obtuvo en el T, tratamiento sin

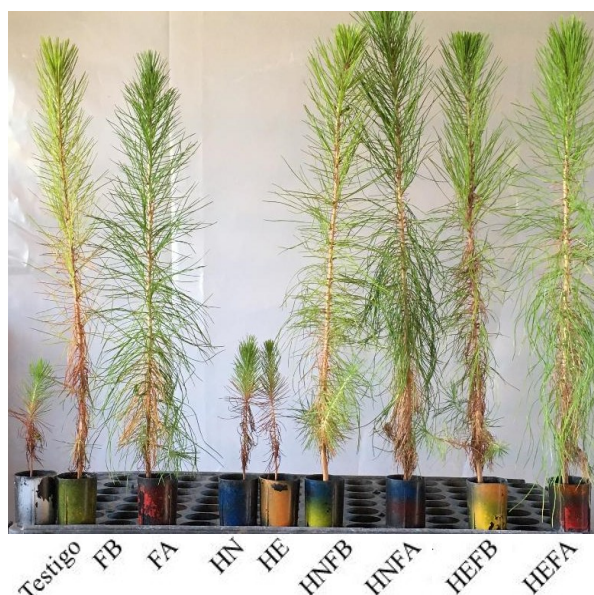


Figura 5. Aspecto final de la planta de *P. greggii* a los 11 meses de edad, bajo nueve tratamientos de inoculación micorrícica y fertilización en vivero. FB= Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN= Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB= Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA= Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB= Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA= Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 5. Final appearance of *P. greggii* plant at 11 months of age, under nine treatments of mycorrhizal inoculation and nursery fertilization. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

aerial and root sections. It is worth mentioning that these are the same treatments where lignification was higher than 25% (Table 3).

The Dickson Quality Index was better in the combined treatments, regardless of the dose or type of inoculant, as well as in the FA treatment. In contrast, the treatments T, HN and HE obtained the lowest values due to the absence of fertilizer (Table 3). These results mean obtaining a higher index than those observed by Bautista *et al.* (2018), Castro-Garibay *et al.* (2018) and Maldonado-Benitez *et al.* (2011).

The lower values in the growth variables and quality indices, especially in the treatments without

Cuadro 3. Valores medios de índices de calidad *P. greggii* a los 11 meses de edad bajo nueve tratamientos de inoculación micorrícica y fertilización en vivero. T = Testigo, FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Table 3. Mean values of *P. greggii* quality indices at 11 months of age under nine treatments from mycorrhizal inoculation and nursery fertilization. T = Control, FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

Tratamiento	Índice de lignificación (%)	Relación biomasa seca aérea/radical	Índice de Calidad de Dickson
T	23.7±1.22 d	1.2±0.09	0.1±0.00 c
FB	29.8±0.60 bc	1.6±0.10	0.5±0.03 b
FA	28.6±0.36 c	2.1±0.06	0.7±0.03 a
HN	18.9±0.75 e	1.1±0.08	0.1±0.01 c
HE	21.0±0.62 de	1.1±0.07	0.1±0.01 c
HNFB	33.4±0.44 a	1.7±0.06	0.7±0.03 a
HNFA	30.8±0.41 abc	2.4±0.11	0.7±0.04 a
HEFB	29.7±0.59 bc	1.9±0.09	0.7±0.04 a
HEFA	32.2±0.37 ab	1.8±0.07	0.8±0.03 a

Medias con letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). ± Error estándar de la media. ♦ Means with different letters in a column indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$). ± Standard error of the mean.

inocular que presentó colonización ectomicorrícica no buscada debido a que el experimento se realizó en condiciones normales de vivero, donde es posible la existencia de propágulos de hongos ectomicorrícicos radicados de forma natural (Figura 6). Al respecto, Salgado-Salomón *et al.* (2009) aportaron evidencia de que existen fuentes de inóculo micorrícico en los viveros de producción acelerada (sistema tecnificado), las cuales pueden provenir de los sustratos, del agua de riego o por esporas que existen en el sitio.

En nuestro estudio los niveles de micorrización concuerdan con lo informado por Vicente-Arbona *et al.* (2019), quienes encontraron 61% de tasa de micorrización en *P. greggii* inoculado con *L. laccata*. Resultados más altos de micorrización en *P. greggii* a los de este estudio, son los valores mayores al 77% publicados por Méndez-Neri *et al.* (2011) al inocular con *H. mesophaeum*, *L. laccata* y *Suillus aff. pseudo-brevipes*.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) encontraron 79.5% de micorrización en *P. greggii* inoculado con *H.*

fertilization, as in the study by Domínguez-Núñez *et al.* (2004), are attributed to the fact that mycorrhizal symbiosis, depending on establishment stage and functionality, may become a carbon consumption cost for the host plant, leading to lower growth (Pinkas *et al.* 2000).

Controlled inoculation

The percentage of mycorrhizal colonization ranged from 37 to 63%. HEFA treatment presented the highest percentage, followed by HEFB treatment; in both cases, we should note the application of the inoculant with exotic fungal spores. Then, with values between 52 and 55%, HN and HE treatments, fertilized and unfertilized, followed. The lowest percentage was obtained in T, uninoculated treatment that presented unintended ectomycorrhizal colonization because the experiment was carried out under normal nursery conditions,

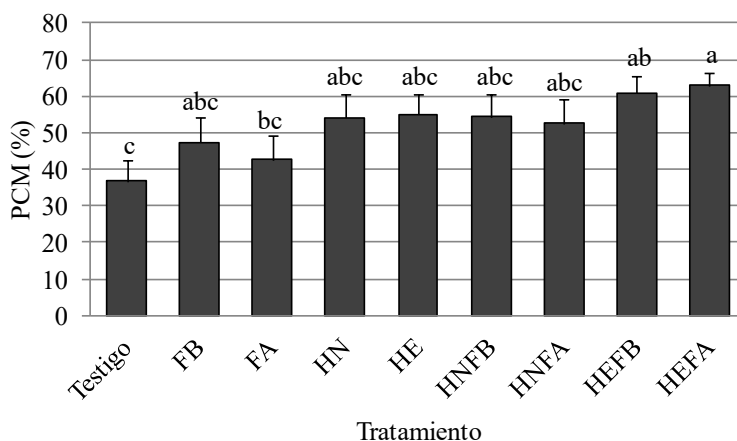


Figura 6. Porcentaje de colonización micorrícica (Tukey; $p \leq 0.05$) en raíces de *P. greggii* 11 meses después de su siembra en vivero bajo nueve tratamientos evaluados. FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 6. Percentage of mycorrhizal colonization (Tukey; $p \leq 0.05$) in *P. greggii* roots 11 months after planting in the nursery under nine evaluated treatments. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

mesophaeum. Pero, Rentería-Chavez *et al.* (2017) obtuvieron valores menores a 30% en la colonización micorrícica en *P. greggii*, inoculado con *Hebeloma leucosarx* P.D. Orton, *L. laccata* y *L. bicolor* (Maire) P.D. Orton. Según Tateishi *et al.* (2003), porcentajes de micorrización mayores al 60% se consideran altos.

En otras especies del género *Pinus* se encontraron resultados similares. Barragán-Soriano *et al.* (2018) encontraron 76% de micorrización en *P. montezumae* inoculado con *H. mesophaeum*. En contraste, Baltasar *et al.* (2007) inocularon con *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. en *P. ponderosa* Dougl. ex Laws. y encontraron 38% de micorrización en el tratamiento mejor con fertilización baja, y porcentajes menores con fertilización alta.

Las diferencias en los porcentajes de micorrización resaltan la importancia de seleccionar especies de hongos ectomicorrícicos adecuados y de utilizar la técnica de inoculación apropiada (González-Ochoa *et al.* 2003). En nuestro estudio, por medio de micorrización controlada se confirmó la amplitud de la capacidad colonizadora (de media baja a alta) de las especies fúngicas probadas y su compatibilidad con *Pinus greggii*. Las diferencias en PCM encontradas entre tratamientos se atribuyeron principalmente al nivel de compatibilidad planta-hongo.

where the existence of naturally-based propagules of ectomycorrhizal fungus is possible (Figure 6). In this regard, Salgado-Salomón *et al.* (2009) provided evidence about sources of mycorrhizal inoculum found in accelerated production nurseries (high technology systems). These spores may proceed from substrates, irrigation water or spores already existent on site.

In our study, the levels of mycorrhizal colonization agree with those reported by Vicente-Arbona *et al.* (2019), who found a 61% mycorrhizal colonization rate in *P. greggii* inoculated with *L. laccata*. Whereas higher mycorrhizal colonization results in *P. greggii* than those in our study, are those values higher than 77% reported by Méndez-Neri *et al.* (2011), after inoculating plants with *H. mesophaeum*, *L. laccata* and *Suillus aff. pseudobrevipes*.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) found 79.5% mycorrhization in *P. greggii* inoculated with *H. mesophaeum*. But Rentería-Chavez *et al.* (2017) obtained values lower than 30% in mycorrhizal colonization in *P. greggii*, inoculated with *Hebeloma leucosarx* P.D. Orton, *L. laccata* and *L. bicolor* (Maire) P.D. Orton. According to Tateishi *et al.* (2003), mycorrhizal percentages higher than 60% are considered high.

Caracterización de ectomicorizas

Con el inoculante MycorTree Ecto-inyectable® se generaron dos morfotipos afines a *Scleroderma citrinum* (Figura 7A) y a *Pisolithus tinctorius* (Figura 7B), el primer morfotipo se encontró en proporción mayor que el segundo. Para ambos morfotipos, las ectomicorizas formadas en los tratamientos sin fertilizar o con fertilización baja se encontraron en etapa madura; mientras que en los tratamientos con fertilización alta las estructuras se observaron en el desarrollo inicial.

El morfotipo afín a *S. citrinum* se caracterizó por presentar ectomicorizas estipitadas, con ramificación dicotómica, color blanco parduzco sin presencia de rizomorfos en etapa de desarrollo inicial. En etapa madura mostró ectomicorizas con ramificación coraloide estipitada, color blanco amarillento, terminaciones rectas no ramificadas y presencia de rizomorfos (DEEMY, 2019). El morfotipo afín a *Pisolithus tinctorius* presentó estructuras coraloides estipitadas con ramificaciones dicotómicas, ápices rectos no ramificados, color marrón amarillento y presencia de rizomorfos de conexión restringida. Esta caracterización coincide con la observada por Valdés *et al.* (2019) para *P. tinctorius* en simbiosis con *P. devoniana*; también utilizaron inóculo de origen comercial.

Los resultados con el inoculante Ecto-Myc®, compuesto de una mezcla de esporas de hongos nativos (*Lactarius indigo*, *Amanita rubescens*, *Amanita* sp., *Ramaria* sp. y *Boletus* sp.), no representaron la misma diversidad de especies que lo componen. Es

In other species of the genus *Pinus*, similar results were found. Barragán-Soriano *et al.* (2018) reported 76% mycorrhization in *P. montezumae* inoculated with *H. mesophaeum*. In contrast, Baltasar *et al.* (2007) inoculated *P. ponderosa* Dougl. ex Laws. with *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr., and found 38% mycorrhizal colonization in the best treatment with low fertilization, but lower percentages with high fertilization.

The differences in the percentages of mycorrhizal colonization emphasizes the importance of selecting suitable ectomycorrhizal fungal species, and using the appropriate inoculation technique (González-Ochoa *et al.* 2003). In our study, by means of controlled mycorrhizal infection, the amplitude of colonizing capacity (from medium-low to high) of the tested fungal species was confirmed, as well as their compatibility with *Pinus greggii*. The differences in PCM found among treatments were mainly attributed to the level of plant-fungus compatibility.

Characterization of ectomycorrhizae

With the MycorTree Ecto-injectable® inoculant, two morphotypes related to *Scleroderma citrinum* (Figure 7A) and *Pisolithus tinctorius* (Figure 7B) were generated. The first morphotype was found in a greater proportion than the second. For both morphotypes, the ectomycorrhizae formed in the unfertilized or low fertilization treatments were found in the mature stage; while in treatments with high fertilization, the structures were observed in their initial development.

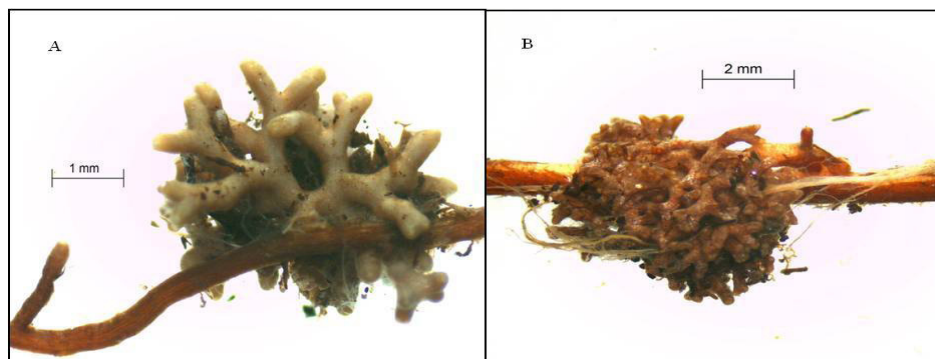


Figura 7. Estructuras micorrícicas. A) morfotipo afín a *S. citrinum*; B) morfotipo afín a *P. tinctorius*, identificados en raíces de plantas de *P. greggii* del tratamiento 5.

Figure 7. Mycorrhizal structures. A) morphotype related to *S. citrinum*; B) morphotype related to *P. tinctorius*, identified in roots of *P. greggii* plants from treatment 5.

posible que algunas de las esporas no lograran germinar y colonizar las raíces de las plantas. Una explicación factible es que las esporas de algunas especies de hongos ectomicorrícicos germinan más rápido que otras, porque requieren condiciones ambientales específicas (Nara, 2009; Ishida *et al.*, 2008).

Dos morfotipos principales se identificaron; el primero afín a *Amanita* spp. con ramificación dicotómica, terminaciones rectas no ramificadas, forma cilíndrica no inflamada y afilada, de colores ocre, ocre-amarillento o blanco con presencia de rizomorfos (Figura 8A) (DEEMY, 2019). Es preciso señalar que los productos comerciales no siempre tienen identificadas las especies de hongos que contienen, lo cual dificulta relacionar la descripción de las micorrizas formadas con el contenido de una especie en particular.

La incertidumbre respecto de las especies contenidas en este inoculante comercial, en principio ocasiona duda y no deja claro si la colonización tiene efectos sinérgicos o deletéreos sobre la calidad de la planta inoculada. Así que es difícil determinar cuál especie de hongo ectomicorrícico aportó beneficios mayores al fitobionte probado; este es el caso del se-

The morphotype related to *S. citrinum* was characterized by presenting stipitate ectomycorrhizae, with dichotomous branching, brownish-white color without the presence of rhizomorphs in the initial development stage. In its mature stage, this morphotype showed ectomycorrhizae with stipitate coral-like branching, yellowish-white color, straight unbranched terminations and the presence of rhizomorphs (DEEMY, 2019). The morphotype similar to *Pisolithus tinctorius* presented stipitate coral-like structures with dichotomous branches, straight unbranched apices, yellowish-brown color, and presence of restricted connection rhizomorphs. This characterization coincides with that observed by Valdés *et al.* (2019) for *P. tinctorius* in symbiosis with *P. devoniana*; they also used inoculum of commercial origin.

The results with the inoculant Ecto-Myc[®], composed of a mixture of spores of native fungi (*Lactarius indigo*, *Amanita rubescens*, *Amanita* sp., *Ramaria* sp. and *Boletus* sp.), did not represent the same diversity of species that compose it. It is possible that some of the spores failed to germinate and colonize the roots of the plants. A plausible

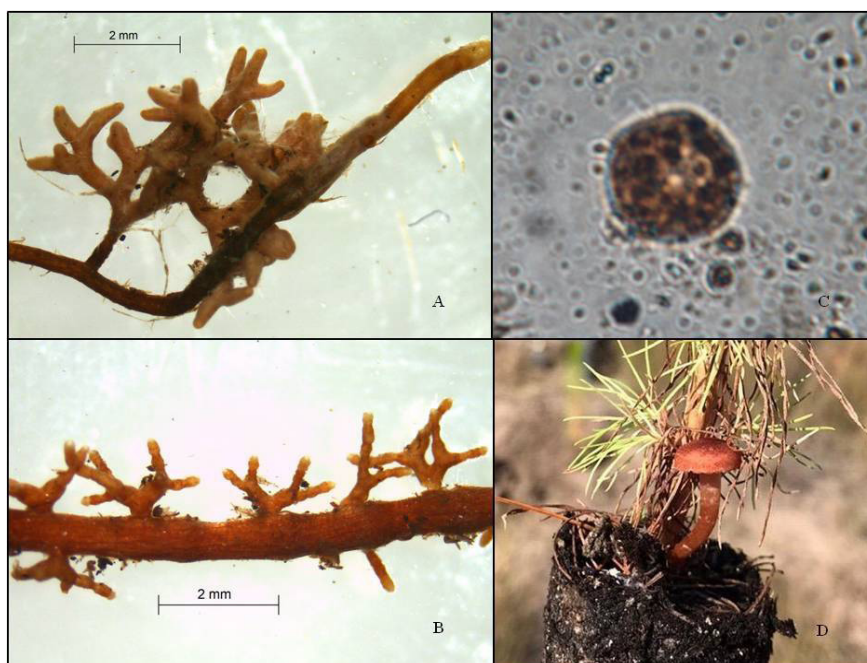


Figura 8. Estructuras micorrícicas del inoculante Ecto-Myc[®]. A) Morfotipo afín a *Amanita* spp. B) Morfotipo afín a *Laccaria* spp. C) Espora afín a *Laccaria* spp. D) Cuerpo fructífero afín a *Laccaria* spp.

Figure 8. Mycorrhizal structures of the Ecto-Myc[®] inoculant. A) Morphotype related to *Amanita* spp. B) Morphotype related to *Laccaria* spp. C) Spore related to *Laccaria* spp. D) Sporophore related to *Laccaria* spp.

gundo morfotipo encontrado, afín al género *Laccaria* spp., el cual presentó ramificación dicotómica de longitud igual, con constricciones en la base de las ramificaciones, desde la parte media y casi al llegar a los ápices, color marrón anaranjado (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2019) (Figura 8B). La identificación a nivel de género se basó en la presencia de esporas compatibles con *Laccaria* spp. al momento de analizar el producto y determinar la concentración de esporas. Incluso, en los tratamientos donde se aplicó este inoculante se observaron cuerpos fructíferos de este género (Figura 8C y 8D).

La certeza en el contenido del inóculo puede solventarse si la recolección de los cuerpos fructíferos de hongos silvestres se hace en forma directa en campo, para procesarlos por medio de secado, molido, tamizado, empaquetado y almacenado (Carrasco-Hernández *et al.*, 2018), y de esta manera, el inoculante queda disponible para su aplicación en las raíces de las plantas.

CONCLUSIONES

La adición de fertilizante de liberación controlada e inoculación con productos comerciales con hongos ectomicorrícicos resultó una alternativa buena para producir planta de *P. greggii* de calidad, sobre la base de los requerimientos que estipula la norma mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016. La falta de fertilización ocasionó un desarrollo deficiente de la planta, respecto a la norma.

El porcentaje promedio de colonización micorrícica no tuvo influencia del tipo de inoculante o dosis de fertilización, sino por el nivel de compatibilidad planta-hongo.

No todas las esporas de las especies de hongos nativos contenidas en el inoculante comercial formaron estructuras micorrícicas en las raíces de las plantas de *P. greggii*. De modo que no fue posible determinar si existió incompatibilidad específica de alguna de ellas con la especie forestal estudiada.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo de estancia posdoctoral del primer autor en el Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Juárez del estado de Durango. A la Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente del estado de Durango, por colaborar a través

de la explicación es que las esporas de algunas especies de ectomicorrizas se germinan más rápido que otras, porque requieren condiciones ambientales específicas (Nara, 2009; Ishida *et al.*, 2008).

Se identificaron dos morfotipos; el primero relacionado con *Amanita* spp. con ramificación dicotómica, terminaciones unbranched, no inflamadas y forma cilíndrica aguda, color ochre, ochre-amarillento o blanco, con la presencia de rizomorfos (Figura 8A) (DEEMY, 2019). Es worth noting que los productos comerciales no siempre tienen la especie de hongo que se ha identificado, lo que hace difícil relacionar la descripción de las micorrizas formadas con el contenido de una especie particular.

La incertidumbre sobre las especies contenidas en un inoculante comercial, en principio genera dudas y no aclara si la colonización tiene efectos sinérgicos o perjudiciales sobre la calidad de la planta inoculada. Por lo tanto, es difícil determinar qué especie de ectomicorriza proporcionó mayores beneficios al fitobionte probado. Este fue el caso del segundo morfotipo encontrado, relacionado con el género *Laccaria* spp., que mostró ramificación dicotómica de igual longitud, con constricciones en la base de las ramas, color naranja-marrón en la parte media, y casi al llegar a los ápices (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2019) (Figura 8B). La identificación a nivel de género se basó en la presencia de esporas compatibles con *Laccaria* spp. al momento de analizar el producto y determinar la concentración de esporas. Además, en los tratamientos donde se aplicó este inoculante, se observaron cuerpos fructíferos de este género (Figura 8C y 8D).

La certeza en el contenido del inóculo puede lograrse si la recolección de los cuerpos fructíferos de hongos silvestres se hace directamente en el campo. Para procesarlos se debe secar, moler, tamizar, empaquetar y almacenar (Carrasco-Hernández *et al.*, 2018). De esta manera, el inoculante quedará disponible para su aplicación en las raíces de las plantas.

CONCLUSIONS

The addition of controlled release fertilizer and inoculation with commercial products containing ectomycorrhizal fungi resulted in a good alternative to produce quality *P. greggii* plants, based on the requirements in the Mexican standard NMX-AA-

del apoyo del desarrollo del experimento en el Vivero Forestal “Praxedis Guerrero”.

LITERATURA CITADA

- Baltasar M., D., C. Barroetaveña, y M. Rajchenberg. 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque* 28: 226-233. DOI:10.4067/S0717-92002007000300007
- Barragán-Soriano, J. L., J. Pérez-Moreno, J. J. Almaraz-Suárez, M. G. Carcaño-Montiel, y K. I. Medrano-Ortiz. 2018. La inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y bacterias incrementa el crecimiento y mejora la calidad fisiológica de *Pinus montezumae* Lamb. *Rev. Chapingo Ser. Cien. For. Amb.* 241: 3-16. DOI: 10.5154/r.rchscfa.2017.01.010
- Bautista O., G. I., J. A. Prieto R., J. C. Hernández D., E. Basave V., J. R. Goche T., y E. Montiel A. 2018. Crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. bajo diferentes rutinas de fertilización en vivero. *Rev. Mex. Cien. For.* 9: 213-233. DOI: 10.29298/rmcf.v9i49.171
- Carrasco-Hernández, V., D. A. Rodríguez-Trejo, J. Pérez-Moreno, V. M. Duarte-Zaragoza, J. L. Navarros-Sandoval, y R. Quintero-Lizaola. 2018. Evaluación del costo de producción de inoculantes ectomicorrízicos neotropicales a base de esporas. *Rev. Mex. Cien. Agr.* 9: 417-429. DOI: 10.29312/remexca.v9i2.1082
- Castro-Garibay, S. L., A. Aldrete, J. López-Upton, y V. M. Ordáz-Chaparro. 2018. Efecto del envase, sustrato y fertilización en el crecimiento de *Pinus greggii* var. *australis* en vivero. *Agrociencia* 52: 115-127. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v52n1/1405-3195-agro-52-01-115.pdf> (Consulta: marzo 2020).
- DEEMY (Determination of Ectomycorrhizae). 2019. An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. München, Germany. <http://www.deemy.de/> (Consulta: marzo 2020).
- Domínguez-Núñez J., J. A. Planelles B., R. Planelles, y J. A. Sainz de Omeñaca. 2004. Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Inves. Agrar.: Sist. Rec. For.* 13:317-328. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=930093> (Consulta: marzo 2020).
- Dvorak, W. S. 2010. *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. 601-603. In: Vozzo, J. A. (ed). *Manual de semillas de árboles tropicales*. Washington DC, USDA Forest Service. 887 p. <https://rngr.net/publications/manual-de-semillas-de-arboles-tropicales> (Consulta: febrero 2020)
- Escobar R., R. 2012. Fases de cultivo: Endurecimiento. In: Buamscha, G. L., T. Contard, R. K. Dumroese, J. A. Enricci, R. Escobar, H. E. Gonda, D. F. Jacobs, T. D. Landis, T. Luna, J. G. Mexal, y K. M. Wilkinson (eds). *Producción de plantas en viveros forestales*. Colección Nexos. Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires, Argentina. pp: 142-162. https://www.researchgate.net/publication/272790732_Fases_de_cultivo_establecimiento_y_crecimiento_rapido (Consulta: abril 2020).
- 170-SCFI-2016. The lack of fertilization caused poor development of plants when compared to the standards.
- The average percentage of mycorrhizal colonization was not influenced by the type of inoculant or fertilization dose, but by the level of plant-fungus compatibility.
- Not all the spores of the native fungal species contained in the commercial inoculant formed mycorrhizal structures in the roots of *P. greggii* plants. Thus, it was not possible to determine if there was a specific incompatibility of any of them with the forest species studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACYT (the Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) for funding a postdoctoral stay granted to first author on the Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales under the University Juárez of the state of Durango. To the Ministry of environment of Durango state, for collaborating in the development of the experiment at “Praxedis Guerrero” Forest Nursery.

—End of the English version—



- Escobar-Alonso, S., y D. A. Rodríguez T. 2019. Estado del arte en la investigación sobre calidad de planta del género *Pinus* en México. *Rev. Mex. Cien. For.* 10: 1-38. DOI: 10.29298/rmcf.v10i55.558.
- González-Ochoa A. I., J. de Las Heras, P. Torres, y E. Sánchez-Gómez. 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Ann. For. Sci.* 60:43-48. DOI: 10.1051/forest:2002072.
- Ishida, T.A., K. Nara, M. Tanaka, A. Kinoshita, and T. Hogetsu. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180: 491– 500. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02572.x.
- Maldonado-Benitez, K. R., A. Aldrete, J. López-Upton, H. Vaqueza-Huerta, y V. M. Cetina-Alcalá. 2011. Producción de *Pinus greggii* Engelm. en mezclas de sustrato con hidrogel y riego, en vivero. *Agrociencia* 45: 389-398. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v45n3/v45n3a11.pdf> (Consulta: febrero 2020).

- Martínez-Reyes, M., J. Pérez-Moreno, L. Villarreal-Ruiz, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares, J. J. Vargas-Hernández, y M. Honrubia-García. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. Rev. Chapingo Ser. Cien. For. Amb. 18: 183-192. DOI:10.5154/r.rchscfa.2010.11.112
- Méndez-Neri, M., J. Pérez-Moreno, R. Quintero-Lizaola, E. Hernández-Acosta, y A. Lara-Herrera. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. Terra Latinoamericana 29: 73-81. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792011000100073&lng=es&tlng=es (Consulta: febrero 2020).
- Nara, K. 2009. Spores of Ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. New Phytologist 181: 245-248. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02691.x.
- Pinkas, Y., M. Maimon, E. Shabi, S. Elisha, Y. Shmulewich, and S. Freeman. 2000. Inoculation, isolation and identification of *Tuber melanosporum* from old and new oak host in Israel. Mycol. Res. 104: 472-477. DOI: 10.1017/S0953756299001458
- Rentería-Chávez, M. C., J. Pérez-Moreno, V. M. Cetina-Alcalá, R. Ferrera-Cerrato, y B. Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. Rev. Argentina Microbiol. 49: 93-104. DOI: 10.1016/j.ram.2016.06.004.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., D. Ramírez-Martínez, R. Garibay-Orijel, V. Jacob-Cervantes, J. Pérez-Moreno, M. P. Ortega-Larrocea, y E. Arellano-Torres. 2019. Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. Rev. Mex. Biodiv. 90: 1:11. DOI: 10.22201/ib.20078706e.2019.90.2868.
- Sáenz, R., J. T., H. J. Muñoz F., C. M. A. Pérez D., S. A. Rueda, y J. Hernández. 2014. Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero "Morelia", estado de Michoacán. Rev. Mex. Cien. For. 5: 98-111. DOI: 10.29298/rmcf.v5i26.293.
- Salgado-Salomón, M. E., M. Rajchenber, y C. Barroetaveña. 2009. Evaluación del estado micorrízico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin manejo de la micorrización. Bosque 30: 127-134. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173113299002> (Consulta: marzo 2020).
- SAS Institute. 2009. SAS/STAT® 9.2. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU. <http://support.sas.com/documentation/cdl/en/statugmcmc/63125/PDF/default/statugmcmc.pdf> (Consulta: febrero 2020).
- Secretaría de Economía. 2016. Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016: Certificación de Operación de Viveros Forestales. México, D.F. <http://www.economia-nmx.gob.mx/normasmx/consulta.nmx> (Consulta: febrero 2020).
- Tateishi, T., K. Yokoyama, N. Kohno, H. Okabe, and T. Marumoto. 2003. Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystea*. Soil Sci. Plant Nutr. 49:641-645. DOI: 10.1080/00380768.2003.10410054.
- Valdés, R., M., E. Ambríz P., A. Camacho V., y A. M. Fierros G. 2019. Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. Rev. Mex. Cien. For. 1: 53-64. DOI: 10.29298/rmcf.v1i2.637.
- Vicente-Arbona, J. C., V. Carrasco-Hernández, D. A. Rodríguez-Trejo, y A. Villanueva-Morales. 2019. Calidad de planta de *Pinus greggii* producida en sustratos a base de aserrín. Madera y Bosques 25: 1-14. DOI: 10.21829/myb.2019.2521784.