

Agrociencia

Volumen 55, Número 8

16 de noviembre - 31 de diciembre, 2021



Dr. Juan Manuel Cuca García
Profesor Investigador Emérito



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

MÉXICO



DIRECTORIO

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Said Infante Gil

DIRECTOR ADJUNTO DE AGROCIENCIA

Fernando Carlos Gómez Merino

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

Fernando Carlos Gómez Merino

Ana Rita Román Jiménez

FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN

L. Brenda Espejel Lagunas

COSECHADOR DE METADATOS

Moises Quintana Arévalo

APOYO

Belem M. Villegas Contreras

Yolanda Feroso Meraz

Oscar Vieyra Durán

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, **Volumen 55, número 8, 16 de noviembre - 31 de diciembre, 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: 1405-3195. eISSN: 2521-9766, 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, **29 de diciembre del 2021**.

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

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: Dr. Juan Manuel Cuca García



AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 55

16 de noviembre - 31 de diciembre, 2021

Número 8

Biotecnología ⇌ Biotechnology

OPTIMIZACIÓN DE ddPCR Y DESARROLLO DE MÓDULOS MULTIPLEX PARA EL ANÁLISIS DE EVENTOS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA EN MAÍZ ⇌ ddPCR OPTIMIZATION AND DEVELOPMENT OF MULTIPLEX MODULES FOR ANALYZING EVENTS OF GENETIC MODIFICATION IN MAIZE

Ángel de León **Márquez-Luna**, Ofelia Yadira **Lugo-Melchor**, Erika Nahomy **Marino-Marmolejo**, Martha Alicia **Rentoría-Ledesma**..... 663

Fitociencia ⇌ Crop Science

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DUAL DE ESPECIES DE *Trichoderma* EN EL CRECIMIENTO DE *Capsicum chinense* Jacq. ⇌ EFFECT OF THE DUAL INTERACTION OF *Trichoderma* SPECIES ON THE GROWTH OF *Capsicum chinense* Jacq.

Jairo **Cristóbal-Alejo**, Felicia Amalia **Moo-Koh**, José María **Tun-Suárez**, Arturo **Reyes-Ramírez**, Marcela **Gamboa-Angulo** 681

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

CLASIFICADOR DE RED NEURONAL CONVOLUCIONAL PARA IDENTIFICAR ENFERMEDADES DEL FRUTO DE AGUACATE *Persea americana* Mill. A PARTIR DE IMÁGENES DIGITALES ⇌ CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORK CLASSIFIER FOR IDENTIFYING DISEASES OF AVOCADO FRUIT *Persea americana* Mill. FROM DIGITAL IMAGES

Ulises Enrique **Campos-Ferreira**, Juan Manuel **González-Camacho**..... 695

Protección Vegetal ⇌ Plant Protection

LA NIXTAMALIZACIÓN DEL MAÍZ, EJE DE LA CULTURA MESOAMERICANA, TUVO SU ANTECEDENTE EN EL COMBATE DE INSECTOS ⇌ LIME-COOKING OF MAIZE, THE AXIS IN THE MESOAMERICAN CULTURE, HAD A PRECEDENT IN THE FIGHT AGAINST INSECTS

Angel **Lagunes-Tejeda**, J. Concepción **Rodríguez-Maciel**, Gonzalo **Silva-Aguayo**, Daniel Arturo **Rodríguez-Lagunes**..... 711

Recursos Naturales Renovables ⇌ Natural Renewable Resources

SUSTRATOS CON ASERRÍN DE CONÍFERAS Y LATIFOLIADAS PARA PRODUCIR PLANTA DE *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. ⇌ SUBSTRATES WITH SAWDUST FROM CONIFERS AND BROADLEAF TREES TO PRODUCE PLANT OF *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham.

Manuel **Aguilera-Rodríguez**, Arnulfo **Aldrete**, Libia Iris **Trejo-Téllez**, Víctor M. **Ordaz-Chaparro**..... 719

Socioeconomía ⇌ Socioeconomics

PREDICCIÓN DEL PRECIO DE MAÍZ EN MÉXICO ⇌ PRICE FORECAST FOR MAIZE IN MEXICO

María del Rosario **López-García**, Miguel Ángel **Martínez-Damián**, José Jaime **Arana-Coronado** 733

OPTIMIZACIÓN DE ddPCR Y DESARROLLO DE MÓDULOS MULTIPLEX PARA EL ANÁLISIS DE EVENTOS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA EN MAÍZ

ddPCR OPTIMIZATION AND DEVELOPMENT OF MULTIPLEX MODULES FOR ANALYZING EVENTS OF GENETIC MODIFICATION IN MAIZE

Ángel de León **Márquez-Luna**, Ofelia Yadira **Lugo-Melchor**^{*}, Erika Nahomy **Marino-Marmolejo**, Martha Alicia **Rentería-Ledesma**

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, A. C. Normalistas No. 800. Colonia Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, 44270 México.

^{*}**Autor para correspondencia:** Ofelia Yadira Lugo Melchor (ylugo@ciatej.mx).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2684-027>.

RESUMEN

La siembra, comercialización y consumo de maíz transgénico es motivo de debate en México, ya que es centro de origen y diversificación de variedades y razas de maíz nativo. La reacción en cadena de la polimerasa digital por goteo (droplet digital PCR, ddPCR) ha demostrado ser más eficiente que el estándar de oro para el análisis de maíz modificado genéticamente. Por tanto, el objetivo fue optimizar pruebas de ddPCR para el análisis de transgenes en maíz y generar módulos *multiplex* de detección. Por medio de un análisis bioinformático se evaluó la aplicabilidad de los iniciadores. Después, con gradientes se determinó una temperatura de hibridación y elongación óptima y se evaluó la concentración de iniciadores, la recuperación de gotas y el efecto “lluvia”. La optimización se verificó por medio de pruebas *dúplex*, y finalmente se desarrollaron módulos *multiplex*. La temperatura que permitió una separación clara entre clústeres de gotas positivas y negativas para las 11 pruebas *simplex* fue 58.5 °C, con concentraciones relativamente bajas de iniciadores y sondas. Las gotas recuperadas resultaron adecuadas según el propósito de los análisis y la “lluvia” obtenida resultó irrelevante. En las pruebas *dúplex* se confirmó el potencial para la cuantificación sin usar curvas de calibración; la mayoría de los ensayos concordaron con los reportes de validación o con los porcentajes teóricos de variabilidad genética. Por último, en los módulos *multiplex* se realizaron variaciones en la concentración de iniciadores y sondas para diferenciar clústeres de gotas positivas en un canal detector único. Las mejores diferencias se lograron con concentraciones con diferencias de 1:3. Los resultados mostraron que las pruebas optimizadas son adecuadas para la detección y posible cuantificación de 10 transgenes en maíz.

ABSTRACT

The planting, marketing and consumption of transgenic maize is a matter of debate in Mexico, since it is a centre of origin and diversification of native maize varieties and breeds. The droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) has proven to be more efficient than the gold standard test (qPCR) for the analysis of genetically modified maize. Therefore, the objective was to optimize ddPCR tests for transgene analysis in maize and to generate multiplex detection modules. The applicability of the primers was evaluated by bioinformatics analysis. Then, using gradients, an optimal hybridization and elongation temperature was determined and the primers concentration, droplet recovery and the “rain” effect were evaluated. Optimization was verified by duplex testing, and finally multiplex modules were developed. The temperature that allowed a clear separation between positive and negative droplet clusters for the 11 simplex tests was 58.5 °C, with relatively low concentrations of primers and probes. The recovered droplets were adequate for the purpose of the analyses and the “rain” obtained was irrelevant. In the duplex tests, the potential for quantification was confirmed without using calibration curves; most assays agreed with validation reports or with theoretical percentages of genetic variability. Finally, in the multiplex modules, variations in primers and probe concentration were performed to differentiate clusters of positive droplets in a single detector channel. The best differences were achieved at concentrations with 1:3 differences. The results showed that the optimized tests are suitable for the detection and possible quantification of 10 transgenes in maize.

Key words: modified maize, test optimization, ddPCR, multiplex, transgenes.

Recibido: marzo, 2021. Aprobado: noviembre, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 663-680. 2021.

Palabras clave: maíz modificado, optimización de pruebas, ddPCR, *multiplex*, transgenes.

INTRODUCCIÓN

El avance biotecnológico y el desarrollo de técnicas como la del ADN recombinante generan un sin fin de posibilidades. Entre ellas la de obtener organismos genéticamente modificados, a los cuales se les ha insertado un fragmento de ADN con el fin de que expresen proteínas que les confieran cualidades de interés agrícola como la resistencia a plagas y herbicidas (Gutiérrez *et al.*, 2015b). En el maíz transgénico estas cualidades se reflejan de manera más común en la resistencia a herbicidas, plagas o ambientes desfavorables (Trejo *et al.*, 2015).

Sin embargo, la generación de variedades de maíz transgénico y el comercio internacional de las mismas es aún motivo de debate, de manera especial en México, no solo por ser un elemento estratégico en la soberanía y seguridad alimentaria del país (González *et al.*, 2016), sino también porque se considera a México como el centro de domesticación de este grano (Acosta, 2009). A partir de que iniciaron en México los procesos de investigación, desarrollo, liberación al ambiente y comercio de organismos genéticamente modificados (OGM), se hace necesario contar con leyes y organismos reguladores. Así como con métodos que permitan la detección, identificación y cuantificación de transgenes en alimentos.

En lo referente al comercio internacional, México importa maíz amarillo para cubrir la demanda interna. Casi el 100% de dicha importación proviene de Estados Unidos, país que es el mayor productor de OGM, donde aún no existen tratamientos especiales para maíces modificados y por tanto estas semillas terminan por mezclarse con variedades no modificadas (Trejo *et al.*, 2015). Las exportaciones de maíz mexicano se dirigen en gran parte a la Unión Europea en donde existen regulaciones estrictas de etiquetado si se sobrepasa un límite (0.9% de OGM) (Dobnik *et al.*, 2015).

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de transgenes en alimentos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se basa en la detección específica de una secuencia de ADN al delimitarla por un par de iniciadores y amplificarla millones de veces gracias a la capacidad de la ADN polimerasa (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Todavía el

INTRODUCTION

Biotechnological progress and the development of techniques such as recombinant DNA have generated endless possibilities. Among them is the possibility of obtaining genetically modified organisms, to which a DNA fragment has been inserted to express proteins that give them qualities of agricultural interest such as resistance to pests and herbicides (Gutiérrez *et al.*, 2015b). In transgenic maize these qualities are most commonly reflected in resistance to herbicides, pests or unfavourable environments (Trejo *et al.*, 2015).

However, the generation of transgenic maize varieties and their international trade is still a matter of debate, especially in Mexico, not only because they are strategic elements of food sovereignty and security in the country (González *et al.*, 2016), but also because Mexico is considered the centre of domestication of maize (Acosta, 2009). Since the research, development, environmental release and trade of genetically modified organisms (OGM) began in Mexico, it has become necessary to have laws and regulatory entities. It is also necessary to have methods that allow the detection, identification and quantification of transgenes in food.

In terms of international trade, Mexico imports yellow maize to cover domestic demand. Almost 100% of such imports come from the United States, a country that is the main producer of OGM, where there are still no special treatments for modified maize and therefore these seeds end up being mixed with non-modified varieties (Trejo *et al.*, 2015). Mexican maize exports are largely directed to the European Union where there are strict labelling regulations if a limit (0.9% OGM) in seeds content is exceeded (Dobnik *et al.*, 2015).

One of the most widely used techniques for the detection of transgenes in food is the polymerase chain reaction (PCR). This technique is based on the specific detection of a DNA sequence by delimiting it by a pair of primers and amplifying it millions of times due to the capacity of DNA polymerase (Tamay de Dios *et al.*, 2013). The gold standard test for transgene identification and quantification is still the qPCR, which additionally uses fluorescent probes that bind to the amplified product and are degraded by the action of the enzyme Taq polymerase to generate

estándar de oro para la identificación y cuantificación de transgenes es la qPCR, la cual usa además sondas fluorescentes que se unen al producto amplificado y se degradan por acción de la enzima Taq polimerasa para generar una señal detectable. Luego, para estimar el contenido del transgén se usan curvas de calibración construidas con muestras estándar de concentración conocida (Burns *et al.*, 2010).

En años más recientes, otra variante conocida como ddPCR ha ganado popularidad para el análisis de organismos genéticamente modificados (Morisset *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015a). Esta técnica consiste en la partición de la mezcla de reacción de PCR en miles de microgotas y la cuantificación por evento de las moléculas de ADN de interés encapsuladas en estas gotas. Las gotas positivas que contienen al menos una copia de la molécula de ADN de interés muestran un aumento de fluorescencia en comparación con las gotas negativas.

Para el análisis de OGM, la ddPCR ha demostrado tener grandes ventajas en comparación con la qPCR, porque ofrece resultados más exactos, es menos susceptible a contaminaciones e inhibiciones derivadas de la matriz y la determinación absoluta de las copias de ADN es inherente y cuantitativa; razón por la cual no se requiere una curva de calibración (Pecoraro *et al.*, 2019). Además, para el análisis de transgenes el costo en ddPCR es menor, ya que se gasta un aproximado de \$439 MXN (20.9 USD) por muestra, en lugar de los \$469 MXN (22.3 USD) por muestra en qPCR. Estos costos además se reducen en los análisis *multiplex* (Morisset *et al.*, 2013).

En la búsqueda de mejorar el sistema de trazabilidad, el objetivo de este estudio fue optimizar pruebas *simplex* y *dúplex* para la detección y cuantificación de 10 eventos de modificación genética en maíz aprobados para consumo humano y animal tanto en México como en la Unión Europea (Bt11, Nk603, Das59122, Das1507, Ga21, Mir604, Mir162, Mon810, Mon863 y Mon88017) y generar módulos *multiplex* a partir de estas pruebas para la detección simultánea de estos eventos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Para el estudio se utilizaron muestras de maíz molido provenientes de ensayos de aptitud internacionales organizados por

a detectable signal. Calibration curves constructed with standard samples of known concentration are then used to estimate the transgene content (Burns *et al.*, 2010).

In more recent years, another variant known as ddPCR has gained popularity for the analysis of genetically modified organisms (Morisset *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015a). This technique involves partitioning the PCR reaction mix into thousands of microdroplets and event-based quantification of DNA molecules of interest encapsulated in these droplets. Positive droplets containing at least one copy of the DNA molecule of interest show increased fluorescence compared to negative droplets.

For OGM analysis, ddPCR has proven to have great advantages compared to qPCR because it provides more accurate results, is less susceptible to matrix-derived contaminations and inhibitions, and the absolute determination of DNA copies is inherently quantitative; which is the reason why a calibration curve is not required (Pecoraro *et al.*, 2019). Furthermore, the cost in ddPCR is lower for transgene analysis, since an approximate of \$20.9 USD (439 MXN) per sample is spent, instead of \$22.3 USD (469 MXN) per sample in qPCR. These costs are further reduced with the multiplex analyses (Morisset *et al.*, 2013).

In the search to improve the traceability system, the objective of this study was to optimize simplex and duplex tests for the detection and quantification of 10 genetic modification events in maize approved for human and animal consumption in both Mexico and the European Union (Bt11, Nk603, Das59122, Das1507, Ga21, Mir604, Mir162, Mon810, Mon863 and Mon88017) and to generate multiplex modules from these tests for the simultaneous detection of these events.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Milled maize samples from international proficiency trials organized by the United States Department of Agriculture (USDA) containing one or more transgenes of interest at different concentrations were used for the study. Two certified reference materials (MRC) were used, which were obtained from the Joint Research Centre (JRC; Geel, Belgium), ERM-BF413d and IRMM-412R-5 for Mon810 and Bt11.

el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA) que contenían uno o más transgenes de interés en concentraciones distintas. Dos materiales de referencia certificados (MRC) se utilizaron, los cuales se obtuvieron del Joint Research Centre (JRC; Geel, Bélgica) ERM-BF413d e IRMM-412R-5 para Mon810 y Bt11.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo de 200 mg de muestra con el kit comercial de extracción Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega, Estados Unidos) con las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN purificado se determinó por medio de espectrofotometría con el equipo NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Para la pureza se utilizó como referencia el índice 260/280. Cada muestra se ajustó a una concentración de 50 ng μL^{-1} y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Iniciadores

Las secuencias de los iniciadores y sondas se obtuvieron de una colección de la Unión Europea (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/default.htm>) (Cuadro 1 y Cuadro 2). El juego de iniciadores identificado como *Hmg* corresponde al gen endógeno. Las sondas se marcaron con FAM o HEX. El apagador en todas las sondas fue un *Black hole* sin emisión de fluorescencia.

Análisis bioinformático

Para confirmar la especificidad de los iniciadores y sondas se utilizaron las herramientas Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), JRC GMO *amplicons* (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmoamplicons/>) y JRC GMO *matrix* (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/>).

La intención era generar módulos *multiplex* de hasta cuatro genes de interés por ensayo, por lo cual se verificó la posibilidad de formación de estructuras secundarias (heterodímeros) con la herramienta OligoAnalyzer (IDT) (<https://www.idtdna.com/calc/analizer>) y se realizaron PCR *multiplex in silico* con el software FastPCR (Kalendar *et al.*, 2017) para corroborar la hibridación correcta de cada juego de iniciadores y su aplicabilidad en ensayos *multiplex*.

ddPCR simplex

La mezcla de reacción consistió en 10.5 μL de ddPCR *supermix for probes*® (Bio-Rad, USA), 300 nM de cada iniciador, 180 nM de sonda y 100 ng de ADN, ajustado con agua estéril hasta un volumen final de 21 μL . Se depositaron 20 μL de la mezcla de

DNA extraction

DNA was extracted from 200 mg of sample with the commercial extraction kit Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega, USA) according to the manufacturer instructions. The concentration and purity of the purified DNA was determined by spectrophotometry with a NanoDrop® 2000 unit (Thermo Fisher Scientific, USA). For purity, the 260/280 index was used as a reference. Each sample was adjusted to a concentration of 50 ng μL^{-1} and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Primers

The primers and probe sequences were obtained from a European Union collection (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/default.htm>) (Table 1 and Table 2). The primers set identified as *Hmg* corresponds to the endogenous gene. The probes were labelled with FAM or HEX. The quencher in all probes was a *Black hole* without fluorescence emission.

Bioinformatics analysis

The Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), JRC GMO *amplicons* (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmoamplicons/>) and JRC GMO *matrix* (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/>) tools were used to confirm the specificity of the primers and probes.

The intention was to generate multiplex modules of up to four genes of interest per assay, so the possibility of secondary structure formation (heterodimers) was verified with the OligoAnalyzer (IDT) tool (<https://www.idtdna.com/calc/analizer>) and multiplex *in silico* PCR was performed with FastPCR software (Kalendar *et al.*, 2017) to corroborate the correct hybridization of each set of primers and their applicability in multiplex assays.

Simplex ddPCR

The reaction mix consisted of 10.5 μL of ddPCR *supermix for probes*® (Bio-Rad, USA), 300 nM of each primer, 180 nM of probe and 100 ng of DNA, adjusted with sterile water to a final volume of 21 μL . Subsequently, 20 μL of this mix and 70 μL of droplet generator oil were deposited on an 8-well plate, which was then transferred to the QX200 droplet generator (Bio-Rad, USA). 40 μL of droplets were deposited on a PCR plate and amplified in the T100 thermal cycler (Bio-Rad, USA). The thermal program consisted of a first denaturation step at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, followed by 40 cycles, each cycle consisting of a denaturation step at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s and a hybridization and elongation step with temperature gradient from 58.5 to $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores y sonda.
Table 1. Primer and probe sequence.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplificón (pb)
Hmg-f	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	79
Hmg-r	GCTACATAGGGAGCCTTGTCTCT	
Hmg-p	HEX-CAATCCACACAAACGCACGCGTA	
Bt11-f	GCGGCTTATCTGTCTCAGGG	75
Bt11-r	CAACTGGTCTCCTCTCCGGA	
Bt11-p	6-FAM-CGTGTTCCCTCGGATCTCGACATGT	
Nk603-f	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTAA	108
Nk603-r	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT	
Nk603-p	HEX-TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC	
Mir604-f	GCGCACGCAATTCAACAG	76
Mir604-r	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT	
Mir604-p	6-FAM-AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG	
Mir162-f	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG	92
Mir162-r	TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA	
Mir162-p	HEX-TCTAGACAATTTCAGTACATTAAAAACGTCCGCCA	
Mon810-f	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	92
Mon810-r	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT	
Mon810-p	6-FAM-AACATCCTTTGCCATTGCCCAGC	
Das59122-f	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC	86
Das59122-r	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG	
Das59122-p	6-FAM-TTTAACTGAAGCGGGAAACGACAA	
Das1507-f	TAGTCTTCGGCCAGAATGG	58
Das1507-r	CTTTGCCAAGATCAAGCG	
Das1507-p	6-FAM-TAACTCAAGGCCCTCACTCCG	
Ga21-f	CGTTATGCTATTTGCAACTTTAGAACA	101
Ga21-r	GCGATCCTCCTCGCGTT	
Ga21-p	6-FAM-TTTCTCAACAGCAGTGGGTCCGGGT	
Mon863-f	TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT	84
Mon863-r	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC	
Mon863-p	6-FAM-TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA	
Mon88017-f	GAGCAGGACCTGCAGAAAGCT	95
Mon88017-r	GCCGGAGTTGACCATCCA	
Mon88017-p	6-FAM-TCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT	

†F: hacia adelante; †R: en reversa; †P: sonda. ♦ †F: forward; †R: reverse; †P: probe.

reacción y 70 µL de aceite generador de gotas en un cartucho de 8 pozos, el cual se trasladó luego al generador de gotas QX200 (Bio-Rad, Estados Unidos). De esta mezcla se depositaron 40 µL de gotas se depositaron en una placa de PCR y se amplificaron en el termociclador T100 (Bio-Rad, USA). El programa térmico consistió en un primer paso de desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos, cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización a 95 °C por 15 s y un paso de hibridación y elongación con gradiente de temperatura de 58.5 a 65 °C por 1 min (58.5, 59.4, 60.7, 62.3, 63.6, 64.5, y 65 °C) para las pruebas con *Hmg*, *Bt11*, *Mir162*, *Mon810*, *Mon863*, *Nk603*, *Das59122* y *Das1507* y un gradiente de temperatura de 53.5 a 60 °C por 1 min (53.5, 54.3, 55.7, 57.3, 58.5, 59.5 y 60 °C para los ensayos

for 1 min (58.5, 59.4, 60.7, 62.3, 63.6, 64.5, and 65 °C) for the *Hmg*, *Bt11*, *Mir162*, *Mon810*, *Mon863*, *Nk603*, *Das59122*, and *Das1507* tests at a 53.5 to 60 °C gradient of temperature for 1 min (53.5, 54.3, 55.7, 57.3, 58.5, 59.5, and 60 °C) for the *Ga21*, *Mir604*, and *Mon88017* tests, after the 40 cycles continued with an incubation step at 98 °C for 10 min and then cooling to 4 °C. The plates were then transferred to the QX200 bead reader (Bio-Rad, USA).

Duplex ddPCR

In the duplex assays, the endogenous *Hmg* gene and a genetic modification event were analysed simultaneously (10

Cuadro 2. Modificaciones genéticas.
Table 2. Genetic modifications.

Evento específico	Objetivo de la modificación
DAS-Ø15Ø7-1*	Resistencia al lepidóptero <i>Ostrinia nubilalis</i> y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
MON-ØØ81Ø-6 *	Resistencia al lepidóptero <i>Ostrinia nubilalis</i>
MON-88Ø17-3 *	Resistencia al coleóptero <i>Diabrotica</i> sp. y tolerancia al herbicida glifosato
MON-ØØ6Ø3-6 *	Tolerancia al herbicida glifosato
DAS-59122-7 *	Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y resistencia al coleóptero <i>Diabrotica</i> sp.
SYN-BTØ11-1 *	Resistencia al lepidóptero <i>Ostrinia nubilalis</i> y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
MON-ØØØ21-9 *	Tolerancia al herbicida glifosato
MON-ØØ863-5 *	Resistencia al coleóptero <i>Diabrotica</i> sp.
SYN-IR162-4 *	Resistencia a insectos lepidópteros
SYN-IR6Ø4-5 *	Resistencia al coleóptero <i>Diabrotica</i> sp.

Ga21, Mir604 y Mon88017, después de los 40 ciclos se continuó con un paso de incubación a 98 °C por 10 min y después enfriamiento a 4 °C. Después las placas se trasladaron al lector de gotas QX200 (Bio-Rad, Estados Unidos).

ddPCR dúplex

En los ensayos *dúplex* se analizaron de manera simultánea el gen endógeno Hmg y un evento de modificación genética (10 pruebas). El gen endógeno se detectó en el canal HEX en todas las pruebas. Mientras que el evento de modificación genética se detectó en el canal FAM en todas las pruebas con excepción del evento Nk603, el cual se detectó con el gen endógeno en el canal HEX.

En cada mezcla de reacción se agregó el juego de iniciadores adicional y se utilizaron las mismas concentraciones que en los ensayos *simplex* (300 nM de cada iniciadores y 180 nM de sonda) para lo cual se redujo la cantidad de agua estéril. En el caso del ensayo Hmg+Nk603, al detectarlos en el mismo canal de fluorescencia se modificaron las concentraciones de cada juego de iniciadores para aumentar la amplitud de las gotas positivas del evento Nk603. En este ensayo las concentraciones de iniciadores para el gen endógeno consistieron en 300 nM de cada iniciador y 100 nM de sonda, para el evento Nk603 consistieron en 900 nM de cada iniciador y 300 nM de sonda.

En el programa térmico se modificó la temperatura de hibridación y elongación de acuerdo con los resultados obtenidos de los gradientes de temperatura.

tests). The endogenous gene was detected in the HEX channel in all tests, while the genetic modification event was detected in the FAM channel in all tests except for the Nk603 event, which was detected with the endogenous gene in the HEX channel.

In each reaction mix the additional set of primer was added and the same concentrations were used as in the simplex assays (300 nM of each primer and 180 nM of probe) for which the amount of sterile water was reduced. In the case of the Hmg+Nk603 assay, upon detection in the same fluorescence channel, the concentrations of each set of primers were modified to increase the amplitude of the positive droplets of the Nk603 event. In this assay the oligos concentrations for the endogenous gene consisted of 300 nM of each primer and 100 nM of probe, for the Nk603 event consisted of 900 nM of each primer and 300 nM of probe.

In the thermal program, the hybridization and elongation temperature were modified according to the results obtained from the temperature gradients.

Multiplex ddPCR

As in the duplex tests, the optimal hybridization and elongation temperature obtained with the temperature gradients was used. Furthermore, different combinations of primers and probes were tested when analyzing two genes of interest for the same channel. The combinations tested were: 150 nM primers and 90 nM probe (*low*) and 300 nM primers and 180 nM probe (*high*); 300 nM primers and 150 nM probe (*low*) and 600 nM

ddPCR *multiplex*

Al igual que en las pruebas *dúplex*, se utilizó la temperatura de hibridación y elongación óptima obtenida con los gradientes de temperatura. Además, se probaron combinaciones de iniciadores y sondas distintas cuando se analizaron dos genes de interés para un mismo canal. Las combinaciones probadas fueron: 150 nM iniciadores y 90 nM sonda (*low*) y 300 nM iniciadores y 180 nM sonda (*high*); 300 nM iniciadores y 150 nM sonda (*low*) y 600 nM iniciadores y 300 nM sonda (*high*); y 300 nM iniciadores y 100 nM sonda (*low*) y 900 nM iniciadores y 300 nM sonda (*high*). En las pruebas en las cuales no fue necesario analizar dos genes por canal se utilizaron las concentraciones de iniciadores y sondas usadas en las pruebas *simplex* (300 nM y 180 nM). En cada grupo *multiplex* se incluyó el juego de iniciadores para el gen *Hmg*.

Análisis de resultados de ddPCR

El análisis de resultados se realizó con el programa QuantaSoft Analysis Pro v. 1.0 (Bio-Rad; <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/QuantaSoft-Analysis-Pro-v1.0-Manual.pdf>) para discriminar las gotas positivas de las gotas negativas por medio de un umbral de amplitud de fluorescencia establecido de forma manual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis bioinformático

La especificidad de los 11 juegos de iniciadores se evaluó *in silico*. Todos resultaron específicos para el gen para el cual están diseñados, esta característica ya se ha evaluado en los reportes de validación de la propia Comisión Europea (Mazzara *et al.*, 2005; Delobel *et al.*, 2007) y se reafirmó con las herramientas ya mencionadas. Así mismo cada iniciador hibridó correctamente en su templado específico y generó un amplicón del tamaño esperado de acuerdo con las pruebas PCR *in silico* realizadas con el software FastPCR.

Ya que un objetivo de este estudio fue el desarrollo de módulos *multiplex*, se comprobó esta capacidad para cada juego de iniciadores. En primer lugar, se evaluaron las interacciones entre cada iniciador y sonda (formación de heterodímeros) con la herramienta OligoAnalyzer. Con base en estos resultados, se generaron 4 grupos *multiplex* (1 *tetraplex* y 3 *triplex*). Grupo 1: Hmg, Nk603, Bt11 y Mon810; grupo 2:

primers and 300 nM probe (*high*); and 300 nM primers and 100 nM probe (*low*) and 900 nM primers and 300 nM probe (*high*). In the tests in which it was not necessary to analyze two genes per channel, the concentrations of primers and probes applied in the *simplex* tests (300 nM and 180 nM) were used. In each *multiplex* group, the set of primers for the *Hmg* gene was included.

Analysis of ddPCR results

Results analysis was performed with QuantaSoft Analysis Pro v. 1.0 (Bio-Rad; <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/QuantaSoft-Analysis-Pro-v1.0-Manual.pdf>) to discriminate positive from negative droplets by a fluorescence amplitude threshold set manually.

RESULTS AND DISCUSSION

Bioinformatics analysis

The specificity of the 11 sets of primers was evaluated *in silico*. All of them were specific for the gene for which they were designed; this characteristic has already been evaluated in the validation reports of the European Commission (Mazzara *et al.*, 2005; Delobel *et al.*, 2007) and was reaffirmed with the aforementioned tools. Likewise, each primer hybridized correctly to its specific template and generated an amplicon of the expected size according to the *in silico* PCR tests performed with FastPCR software.

Since one goal of this study was the development of *multiplex* modules, this capability was tested for each set of primers. First, the interactions between each primer and probe (heterodimer formation) were evaluated with the OligoAnalyzer tool. Based on these results, 4 *multiplex* groups (1 *tetraplex* and 3 *triplex*) were generated. Group 1: Hmg, Nk603, Bt11 and Mon810; group 2: Hmg, Mon88017 and Mon863; group 3: Hmg, Ga21 and Das59122; and group 4: Hmg, Mir604 and Das1507. These were constructed with the combination of primers and probe sets with the lowest number of interactions with each other and therefore lower probability of secondary structure generation. The primer set for Mon810 event was the only one with no interactions within its *multiplex* group (according to OligoAnalyzer standards).

In a previous study, Dobnik *et al.* (2015) evaluated the interactions of these same primer sets with the Autodimer program, in that study only

Hmg, Mon88017 y Mon863; grupo 3: Hmg, Ga21 y Das59122; y grupo 4: Hmg, Mir604 y Das1507. Estos se construyeron con la combinación de juegos de iniciadores y sondas con el menor número de interacciones entre sí y por lo tanto probabilidad menor de generación de estructuras secundarias. El juego de iniciadores para el evento Mon810 fue el único que no presentó interacciones dentro de su grupo multiplex (según los estándares de OligoAnalyzer).

En un estudio previo, Dobnik *et al.* (2015) evaluaron las interacciones de estos mismos juegos de oligos con el programa Autodimer, encontraron dos combinaciones (Das59122P-Mon88017P y Mir604P-Das59122R) que afectaron la eficiencia de las pruebas. Las diferencias entre ese estudio se deben probablemente al programa informático utilizado para evaluar las interacciones y sus reglas de decisión. En cualquier caso, la interacción *in vitro* de los iniciadores ya se había evaluado en aquel estudio (Dobnik *et al.*, 2015). Por lo tanto, los grupos formados se mantuvieron en este estudio.

Así mismo, con las pruebas PCR *multiplex in silico* realizadas con FastPCR se comprobó que los cuatro módulos *multiplex* formados eran adecuados. Esto debido a que cada iniciador hibridó de manera específica con la generación de los productos esperados y sin la formación de estructuras secundarias no deseadas.

ddPCR *simplex*

Gradiente de temperatura

La meta era obtener una amplitud que permitiera discriminar entre el clúster de gotas positivas y el clúster de gotas negativas. De modo que se ensayó con un primer gradiente de 65-58.5 °C (Figura 1).

Con la consideración de que todos los juegos de iniciadores tenían una temperatura de fusión similar (64 °C promedio) se probó un gradiente más bajo para observar el efecto en la amplitud. Por tal razón, para los ensayos restantes se probó con un gradiente menor (Figura 2).

La temperatura de hibridación y elongación de 58.5 °C (marcada en rojo) arrojó la diferencia mayor en la amplitud y permitió discriminar de manera clara y en todos los ensayos los clústers de gotas positivas y

two combinations (Das59122P-Mon88017P and Mir604P-Das59122R) were found to affect testing efficiency. The differences between that study and this study are probably due to the software used to evaluate the interactions and its decision rules. In any case, the *in vitro* interaction of the primers had already been evaluated in that study (Dobnik *et al.*, 2015). Therefore, the groups formed were maintained in this study.

Likewise, with *in silico* multiplex PCR tests performed with FastPCR, the four multiplex modules formed were found to be adequate. Because each primer hybridized in a specific manner with the generation of the expected products and without the formation of unwanted secondary structures.

Simplex ddPCR

Temperature gradient

The goal was to obtain an amplitude that would allow discrimination between the cluster of positive droplets and the cluster of negative droplets. Therefore, a first gradient of 65-58.5 °C was tested (Figure 1).

Considering that all sets of primers had a similar melting temperature (64 °C average), a lower gradient was tested to observe the effect on amplitude. For this reason, a lower gradient was tested for the remaining assays (Figure 2).

The hybridization and elongation temperature of 58.5 °C (marked in red) yielded the greatest difference in amplitude and allowed clear discrimination of positive and negative droplet clusters in all assays. Moreover, this temperature was not so far from the temperature at which these primers were validated in qPCR assays (60 °C) (Mazzara *et al.*, 2005).

The increase in amplitude as a consequence of reduced hybridization and elongation temperature is something already reported (Gerdes *et al.*, 2016; Lievens *et al.*, 2016). However, this has to be evaluated with special care, as the reduction in temperature may result in non-specificities (Lievens *et al.*, 2016). In this study, nonspecific co-amplifications were not observed in any of the tests. Therefore, the temperature of 58.5 °C was chosen for all subsequent tests.

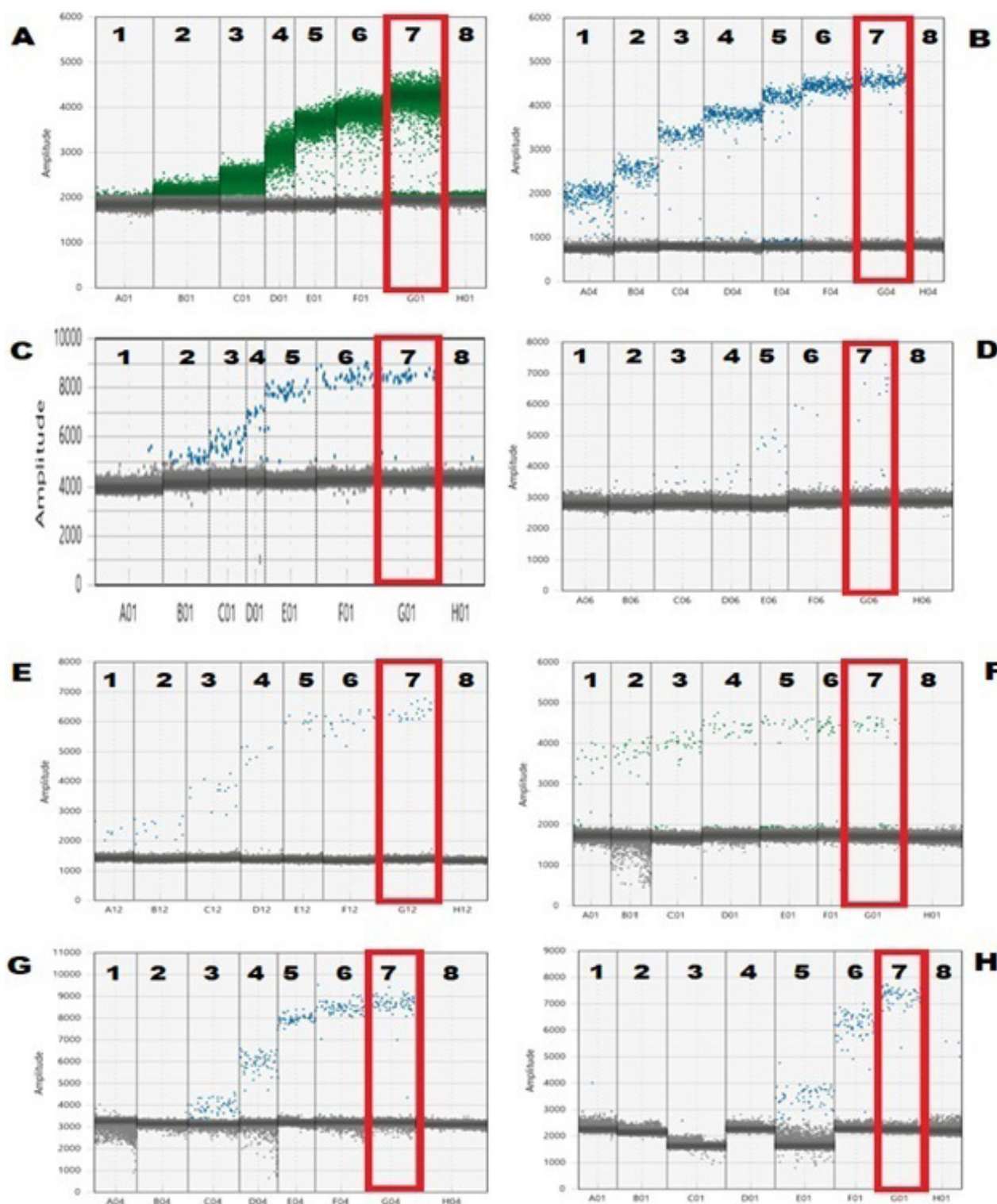


Figura 1. A) Ensayo Hmg, B) Ensayo Bt11, C) Ensayo Mir162, D) Ensayo Mon810, E) Ensayo Mon863, F) Ensayo Nk603, G) Ensayo Das59122 y H) Ensayo Das1507. Gradiente de temperatura (°C): 65(1), 64.5(2), 63.6(3), 62.3(4), 60.7(5), 59.4(6), 58.5(7); y NTC(8).

Figure 1. A) Hmg assay, B) Bt11 assay, C) Mir162 assay, D) Mon810 assay, E) Mon863 assay, F) Nk603 assay, G) Das59122 assay and H) Das1507 assay. Gradient of temperature (°C): 65(1), 64.5(2), 63.6(3), 62.3(4), 60.7(5), 59.4(6), 58.5(7); and NTC(8).

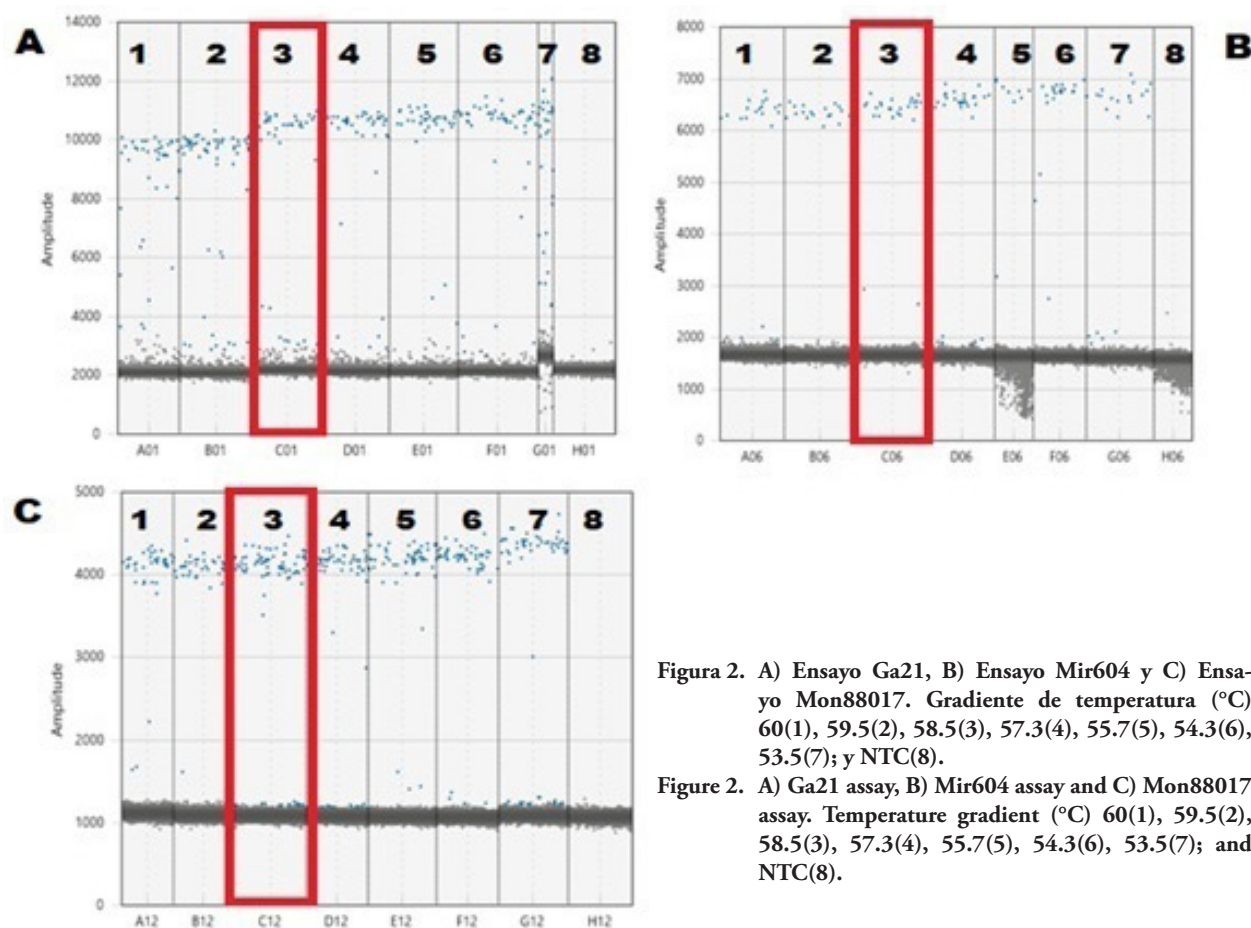


Figura 2. A) Ensayo Ga21, B) Ensayo Mir604 y C) Ensayo Mon88017. Gradiente de temperatura (°C) 60(1), 59.5(2), 58.5(3), 57.3(4), 55.7(5), 54.3(6), 53.5(7); y NTC(8).

Figure 2. A) Ga21 assay, B) Mir604 assay and C) Mon88017 assay. Temperature gradient (°C) 60(1), 59.5(2), 58.5(3), 57.3(4), 55.7(5), 54.3(6), 53.5(7); and NTC(8).

negativas. Además, esta temperatura no se alejó tanto de la temperatura con la que se validaron estos iniciadores en ensayos de qPCR (60°C) (Mazzara *et al.*, 2005).

El incremento en la amplitud como consecuencia de la reducción de la temperatura de hibridación y elongación es algo ya documentado (Gerdes *et al.*, 2016; Lievens *et al.*, 2016). Sin embargo, esto tiene que evaluarse con especial cuidado, ya que la reducción en la temperatura puede derivar en inespecificidades (Lievens *et al.*, 2016). En este estudio no se observaron co-amplificaciones inespecíficas en ninguna de las pruebas. Por lo tanto, se eligió la temperatura de 58.5 °C para todas las pruebas subsecuentes.

Concentración de iniciadores y sondas

Las recomendaciones en cuanto a las concentraciones de iniciadores rondan los 500 nM y en general se recomienda que sean mayores a las concentraciones

Concentration of primers and probes

Recommendations for primers concentrations hover around 500 nM and are generally recommended to be higher than the concentrations that would be used in qPCR assays (Pecoraro *et al.*, 2019). However, relatively low concentrations (300 nM for primers and 180 nM for probes) were used in this study. This was decided based on two considerations; to guarantee efficiency with low concentrations, due to the development of multiplex modules in which tests would be performed with combinations that would include these concentrations; and also, that there is evidence of the use of low concentrations of primers and probes in OGM detection tests without recorded problems (Morisset *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015a).

While an increase in primer concentration leads to higher fluorescence in positive droplets and thus better separation between this cluster of positive and

que se utilizarían en pruebas de qPCR (Pecoraro *et al.*, 2019). No obstante, en este estudio se utilizaron concentraciones relativamente bajas (300nM para oligos y 180nM para sondas). Lo anterior se decidió al tomar en cuenta dos consideraciones; garantizar la eficiencia con concentraciones bajas, debido al desarrollo de módulos *multiplex* en los cuales se harían pruebas con combinaciones que incluirían estas concentraciones; y también, que existe evidencia del uso de concentraciones bajas de iniciadores y sondas en pruebas de detección de OGM sin problemas registrados (Morisset *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015a).

Si bien, un aumento en la concentración de iniciadores provoca una fluorescencia mayor en las gotas positivas y por ello una separación mejor entre este clúster de gotas positivas y el de gotas negativas, no hay efectos en la reducción del efecto de “lluvia” ni en la cuantificación (Koppel *et al.*, 2017; Grelewska *et al.*, 2018). Con esta consideración aunada a la evidente separación de clústers con la concentración de iniciadores y sondas en combinación con la temperatura de hibridación y elongación (58.5 °C), no se evaluaron más concentraciones para los ensayos *simplex* y *dúplex*. Debido a que, además del buen desempeño obtenido al reducir las cantidades utilizadas de iniciadores y sondas, también se redujo el costo por reacción. Dicho costo es uno de los puntos más criticados en pruebas de ddPCR.

Conteo de gotas

El manual de usuario de ddPCR de Bio-Rad recomienda entre 12 000 y 16 000 gotas para cálculos de concentración, y al menos 10 000 para cualquier otra prueba. En las corridas de optimización (88 *runs*) el promedio de gotas correspondió a 12 655 gotas, con casos poco frecuentes de generación por debajo de las 10 000 gotas (14 *runs*). Este promedio resultó adecuado de acuerdo con el propósito de las pruebas y las recomendaciones del fabricante. Además, coincide con otras pruebas de detección de OGM (Koppel y Bucher, 2015; Koppel *et al.*, 2017).

Las diferencias con otras pruebas que promedian mayor recuperación de gotas (Gerdes *et al.*, 2016) se pueden explicar por el uso de micropipetas multicanal que facilitan la transferencia. Otro punto para considerar es la estandarización del proceso, que eventualmente mejorará el conteo de gotas.

negative droplets, there is no effect on reducing the “rain” effect or quantification (Koppel *et al.*, 2017; Grelewska *et al.*, 2018). With this consideration coupled with the evident cluster separation with the concentration of primers and probes in combination with the hybridization and elongation temperature (58.5 °C), no further concentrations were evaluated for the simplex and duplex assays. Because, in addition to the good performance obtained by reducing the amounts of primers and probes used, the cost per reaction was also reduced. This cost is one of the most criticized points in ddPCR assays.

Droplet count

The Bio-Rad ddPCR user manual recommends between 12 000 and 16 000 droplets for concentration calculations, and at least 10 000 for any other test. In the optimization runs (88 runs) the average number of drops corresponded to 12 655 drops, with rare cases of generation below 10 000 drops (14 runs). This average was adequate according to the purpose of the tests and manufacturer recommendations. In addition, it coincides with other OGM screening tests (Koppel and Bucher, 2015; Koppel *et al.*, 2017).

Differences with other tests that average higher droplet recovery (Gerdes *et al.*, 2016) can be explained by the use of multichannel micropipettes that facilitate transfer. Another point to consider is the standardization of the process, which shall eventually improve the droplet count.

“Rain” effect

“Rain” is referred to as droplets that have a fluorescence amplitude above the upper boundary of the negative droplet cluster and below the lower boundary of the positive droplet cluster; because of this, their classification is complicated (Deprez *et al.*, 2016). This effect can be clearly seen in the temperature gradient assay of the endogenous *Hmg* gene (Figure 1). Regardless, the possibility to manually adjust the fluorescence threshold allows to classify these droplets as positive and negative.

Lievens *et al.* (2016) evaluated modes of operation to reduce the amount of “rain” in ddPCR assays. The most prominent consisted of sonication of the reaction mix, increasing the number of cycles (which

Efecto “lluvia”

“Lluvia” se denomina a las gotas que tienen una amplitud de fluorescencia sobre el límite superior del clúster de gotas negativas y debajo del límite inferior del clúster de gotas positivas; debido a ello, su clasificación es complicada (Deprez *et al.*, 2016). Este efecto se puede apreciar de manera clara en el ensayo de gradiente de temperatura del gen endógeno *Hmg* (Figura 1). No obstante, la posibilidad de ajustar de forma manual el umbral de fluorescencia permite clasificar estas gotas como positivas y negativas.

Lievens *et al.* (2016) evaluaron modos de operación para reducir la cantidad de “lluvia” en ensayos de ddPCR; las más destacadas consistieron en la sonicación de la mezcla de reacción, el aumento del número de ciclos (el cual resultó poco significativo; en ensayos de hasta 90 ciclos se registró una cantidad considerable de “lluvia”) y por último el rediseño de iniciadores, ya que la “lluvia” parece ser dependiente de la secuencia de los iniciadores o del amplicón deseado.

No obstante, en un experimento realizado por Bio-Rad se probaron tres escenarios de ajuste manual del umbral (umbral alto: por debajo del límite inferior del clúster de gotas positivas, umbral bajo: por arriba del límite superior del clúster de gotas negativas y un umbral medio). Los resultados de este experimento mostraron que se mantiene una precisión de $\pm 5\%$ con independencia del umbral establecido en Bio-Rad, razón por la cual no habría sesgo. Entonces, la “lluvia” en el ensayo del gen endógeno *Hmg* puede ser tolerada con el establecimiento manual del umbral, sin la necesidad de invertir recursos para el rediseño y optimización de un nuevo juego de iniciadores.

Ensayos *dúplex*

Para verificar los ensayos optimizados se realizaron ensayos *dúplex*. En estos ensayos se analizaron de manera simultánea para el gen endógeno y un evento de modificación genética. Con dos materiales de referencia certificados ERM-BF413d e IRMM-412R-5 se realizaron los eventos respectivos Mon810 y Bt11. Para el resto de los ensayos se utilizaron muestras preparadas (peso/peso) correspondientes con pruebas de aptitud (USDA) que contenían uno o más eventos de interés (MRC) mezclados con variedades comerciales de maíz de las cuales se desconoce su composición biológica.

proved not very significant; in assays of up to 90 cycles a considerable amount of “rain” was recorded) and finally primers redesign, as the “rain” seems to be dependent on the sequence of the primers or the desired amplicon.

Regardless, in an experiment performed by Bio-Rad, three manual threshold setting scenarios were tested (high threshold: below the lower boundary of the positive droplet cluster, low threshold: above the upper boundary of the negative droplet cluster, and a medium threshold). The results of this experiment showed that an accuracy of $\pm 5\%$ is maintained regardless of the threshold set in Bio-Rad; hence, there would be no bias. Then, the “rain” in the endogenous *Hmg* gene assay can be tolerated with manual threshold setting, without the need to invest resources for the redesign and optimization of a new set of primers.

Duplex assays

To verify the optimized assays, duplex assays were performed. In these assays, the endogenous gene and a genetic modification event were analysed simultaneously. With two certified reference materials ERM-BF413d and IRMM-412R-5 the respective events Mon810 and Bt11 were performed. For the rest of the essays, prepared samples (w/w) were used, corresponding with ability tests (USDA) that contained one or more events of interest (MRC) mixed with commercial maize varieties of which their biological composition was unknown.

A conversion to genetic modification percentage (GM%) was performed according to the European Union Reference Laboratory (EURL) technical guide on the implementation of regulation 619/2011 with equation 1:

$$GM\% \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{GM \text{ copies}}{\text{Taxon-specific copies}} \times 100 \quad (1)$$

In addition, variation related to the biological composition of the maize (zygosity) was considered. In heterozygous maize, the variability ranges from approximately 40% if the hybrid is derived from a genetically modified male and a non-modified female, to approximately 60%, if the hybrid was derived from a non-modified male and a genetically modified female (EURL, 2011).

La conversión a porcentaje de modificación genética (MG%) se realizó de acuerdo con la guía técnica European Union Reference Laboratory (EURL) sobre la implementación del reglamento 619/2011 con la ecuación 1:

$$MG\% \left(\frac{m}{n} \right) = \frac{\text{Copias del GM}}{\text{Copias del taxón específico}} \times 100 \quad (1)$$

Además, se consideró la variación relacionada con la composición biológica del maíz (cigotidad). En maíz heterocigoto los intervalos de variabilidad oscilan de un 40% aproximado, si el híbrido se deriva de un macho con modificación genética y de una hembra no modificada, a un 60% aproximado, si el híbrido se derivó de un macho no modificado y de una hembra con modificación genética (EURL, 2011).

Los valores obtenidos con estas pruebas de ddPCR (Cuadro 3) se expresan en comparación con los valores teóricos descritos en los reportes de validación (Mon810 y Bt11) y en las pruebas de aptitud de USDA.

El reporte del material de referencia ERM-BF413d (Mon810) certifica el porcentaje (%) de copias para el evento Mon810, que corresponde a 0.57% (incertidumbre 0.17%), lo cual es comparable con el resultado obtenido en las pruebas de ddPCR; esto indicaría que el maíz del material de referencia Mon810 es heterocigoto. En el caso del reporte de certificación del material de referencia IRMM-412R-5 (Bt11 5%) se especifica en primer lugar que

Values obtained with the ddPCR tests (Table 3) are expressed in comparison with the theoretical values described in validation reports (Mon810 and Bt11) and USDA ability tests.

The report of the reference material ERM-BF413d (Mon810) certifies the percentage (%) of copies for the Mon810 event, which corresponds to 0.57% (uncertainty 0.17%); this is comparable with the result obtained in the ddPCR tests and it would indicate that the maize of the Mon810 reference material is heterozygous. In the case of the certification report of the reference material IRMM-412R-5 (Bt11 5%), it is specified in the first place that the real value corresponds to $4.89 \pm 0.21\%$. Also, it is specified that the reference material was elaborated from heterozygous maize samples. Therefore, the theoretical value of variability corresponds with the value obtained in the ddPCR test.

In the samples corresponding to the ability assays, a percentage of variation corresponding to that expected in hybrid samples was observed in most cases; except the Ga21, Mir162 and Nk603 events. However, all these samples were prepared with maize of which the biological composition is unknown and therefore the bias was expected. Although in these cases the accuracy of the tests could not be confirmed with these types of samples, tests were able to detect the absence/presence of the transgenes.

Bias arising from weight/weight prepared samples or those in which the biological composition of the seed is unknown has been evaluated in previous essays

Cuadro 3. Cuantificación de eventos de modificación genética por medio de pruebas dúplex de ddPCR.
Table 3. Quantification of genetic modification events by ddPCR duplex assays.

Evento	Concentración (copias μL^{-1})	Concentración (copias μL^{-1})	Porcentaje MG teórico	Porcentaje MG obtenido	Porcentaje de variación
	Transgén	Taxón			
Mon810	6.7	1192	1	0.562	43.8
Bt11	12.4	646	5	1.919	60.75
Ga21	0.509	310	0.5	0.124	75.2
Das59122	1.5	369	1	0.406	59.4
Mir604	1.87	505	0.8	0.37	53.75
Das1507	2.54	535	0.9	0.474	47.33
Mon863	2.06	370	1	0.556	44.4
Mon88017	1.91	418	0.8	0.456	43
Mir162	6.14	411	2	1.49	25.5
Nk603	1.64	370	1.5	0.443	70.46

[†]MG: modificación genética. ♦ [†]MG: genetic modification.

el valor real corresponde con $4.89 \pm 0.21\%$, y que el material de referencia se elaboró a partir de muestras de maíz heterocigoto. Por lo tanto, el valor teórico de variabilidad corresponde con el valor obtenido en la prueba de ddPCR.

En las muestras correspondientes a los ensayos de aptitud se observó en la mayoría de los casos un porcentaje de variación que corresponde al esperado en muestras híbridas; con excepción de los eventos Ga21, Mir162 y Nk603. Sin embargo, todas estas muestras se prepararon con maíz del cual se desconoce la composición biológica y por tanto el sesgo era esperado. Aunque en estos casos no se pudo confirmar la precisión de las pruebas con este tipo de muestras, las pruebas sirvieron para detectar ausencia/presencia de los transgenes.

El sesgo derivado de muestras preparadas peso/peso o aquellas en las cuales se desconoce la composición biológica de la semilla se ha evaluado en ensayos previos (Koppel and Bucher, 2015; Cottenet *et al.*, 2019). En esos ensayos el uso de factores de conversión teórico resultó adecuado en la mayoría; pero no en todos los casos, tal como ocurrió en este estudio.

Respecto a los estudios mencionados antes, existió coincidencia en que el sesgo correspondió a la variabilidad genética de la muestra y no al ensayo de ddPCR en sí; por lo tanto, este método persiste como una alternativa viable para la cuantificación precisa de transgenes en maíz sin la necesidad de una curva de calibración. Así mismo, es necesaria la determinación de un factor de conversión consenso para cada línea de modificación genética, con el objetivo de reducir el sesgo en muestras en las cuales se desconoce la composición biológica.

Ensayos multiplex

Dos de los métodos principales para hacer *multiplexing* de grado alto en la ddPCR son el basado en proporciones y el basado en amplitud. El *multiplexing* basado en amplitud es una alternativa para aprovechar las capacidades de detección y cuantificación de la ddPCR; consiste en distinguir clústers de gotas positivas marcados con el mismo reportero fluorescente al variar las concentraciones de los iniciadores y sondas, y por lo tanto detectar diferentes niveles de amplitud de fluorescencia (Dobnik *et al.*, 2016). Este tipo de *multiplexing* se ha realizado de manera satisfactoria, en pruebas en las cuales se han

(Koppel and Bucher, 2015; Cottenet *et al.*, 2019). In those trials the use of theoretical conversion factors proved adequate in most, but not all cases; as it was the case in this study.

Regarding the aforementioned studies, there was agreement that the bias corresponded to the genetic variability of the sample and not to the ddPCR assay *per se*; therefore, this method persists as a viable alternative for the accurate quantification of transgenes in maize without the need for a calibration curve. Likewise, it is necessary to determine a consensus conversion factor for each genetic modification line in order to reduce bias in samples in which the biological composition is unknown.

Multiplex assays

Two of the main methods for performing high-throughput multiplexing in ddPCR are ratio-based and amplitude-based multiplexing. Amplitude-based multiplexing is an alternative to take advantage of the detection and quantification capabilities of ddPCR; it consists of distinguishing clusters of positive droplets labeled with the same fluorescent reporter by varying the concentrations of the primers and probes, and thus detecting different levels of fluorescence amplitude (Dobnik *et al.*, 2016). This type of multiplexing has been performed successfully, in tests in which from four (Dobnik *et al.*, 2016) to 10 genes of interest have been detected (Dobnik *et al.*, 2015). In this study, we took advantage of that capability to perform tetraplex and three triplex assays.

Once a common hybridization temperature was generated for all sets of primers, the multiplex assays were performed by making arbitrary mixtures with the events of interest for each group. In the tetraplex assay (Hmg, Mon810, Bt11 and Nk603) concentrations were tested, equivalent to half of the standard concentrations with which the simplex assays were optimized. However, because the expected performance did not occur (Figure 3), it was necessary to increase the concentrations beyond the standard concentration in order to separate the highest cluster.

The best overall difference in separating positive droplet clusters at the same channel in the four multiplex assays was achieved with the concentrations of 900 nM (primers) and 300 nM (probe) for the

detectado desde cuatro (Dobnik *et al.*, 2016) hasta 10 genes de interés (Dobnik *et al.*, 2015). En este estudio se aprovechó dicha capacidad para realizar *tetraplex* y tres ensayos *triplex*.

Una vez generada una temperatura de hibridación en común para todos los juegos de iniciadores se procedió a realizar los ensayos *multiplex*, para esto se hicieron mezclas arbitrarias con los eventos de interés para cada grupo. En el ensayo *tetraplex* (Hmg, Mon810, Bt11 y Nk603) se probaron concentraciones equivalentes a la mitad de las concentraciones estándar con las cuales se optimizaron los ensayos *simplex*. Sin embargo, al no tener el rendimiento esperado (Figura 3), fue necesario aumentar las concentraciones más allá de la concentración estándar con el fin de separar el clúster más alto.

En términos generales la mejor diferencia al separar los clústers de gotas positivas en un mismo canal en los cuatro ensayos *multiplex* se logró con las concentraciones de 900 nM (iniciadores) y 300 nM (sonda) para el grupo *high* y 300 nM (iniciadores) y 100 nM (sonda) para el grupo *low* (Figura 4).

Estos resultados son comparables (en concentraciones) a los obtenidos en un estudio previo (Dobnik *et al.*, 2016), lo que indica que en términos generales las diferencias amplias en las concentraciones de iniciadores y sondas tienden a generar diferencias claras entre dos grupos positivos en un solo canal. Por lo tanto, el número de ensayos iterativos se podría reducir al probar combinaciones distintas de concentraciones, para ahorrar así tiempo y reactivos.

high group and 300 nM (primers) and 100 nM (probe) for the low group (Figure 4).

These results are comparable (in concentrations) to those obtained in a previous study (Dobnik *et al.*, 2016), which indicates that generally speaking wide differences in primers and probe concentrations tend to generate clear differences between two positive groups in a single channel. Therefore, the number of iterative assays could be reduced by testing different combinations of concentrations, thus saving time and reagents.

Finally, there are studies reporting a higher degree of multiplexing. Dobnik *et al.* (2015) performed a decaplex assay, in which 10 genes of interest were simultaneously analysed. However, in this type of study the accuracy is reduced, as it is difficult to discriminate so many clusters of positive droplets in a single detector channel. Therefore, it is considered preferable to be cautious with the degree of multiplexing, in order to guarantee accurate results that comply with current legislation in the countries in which these tests are applied.

CONCLUSIONS

In droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) analyses, on simplex tests with 10 genetic modification events in maize and one endogenous gene, it was possible to determine the appropriate hybridization and elongation temperature for clear differentiation of the cluster of positive and

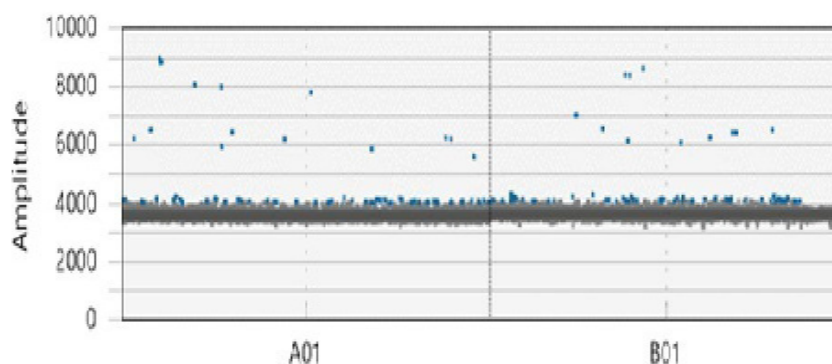


Figura 3. Eventos Mon810 y Bt11 (Canal FAM). Gráfico de amplitud 1D. Concentraciones de 0.5x para Bt11 y 1x para Mon810. La discriminación de ambos clústers positivos resulta imposible.

Figure 3. Mon810 and Bt11 events (FAM Channel). 1D amplitude graphic. Concentrations of 0.5x for Bt11 and 1x for Mon810. Discrimination of both positive clusters is impossible.

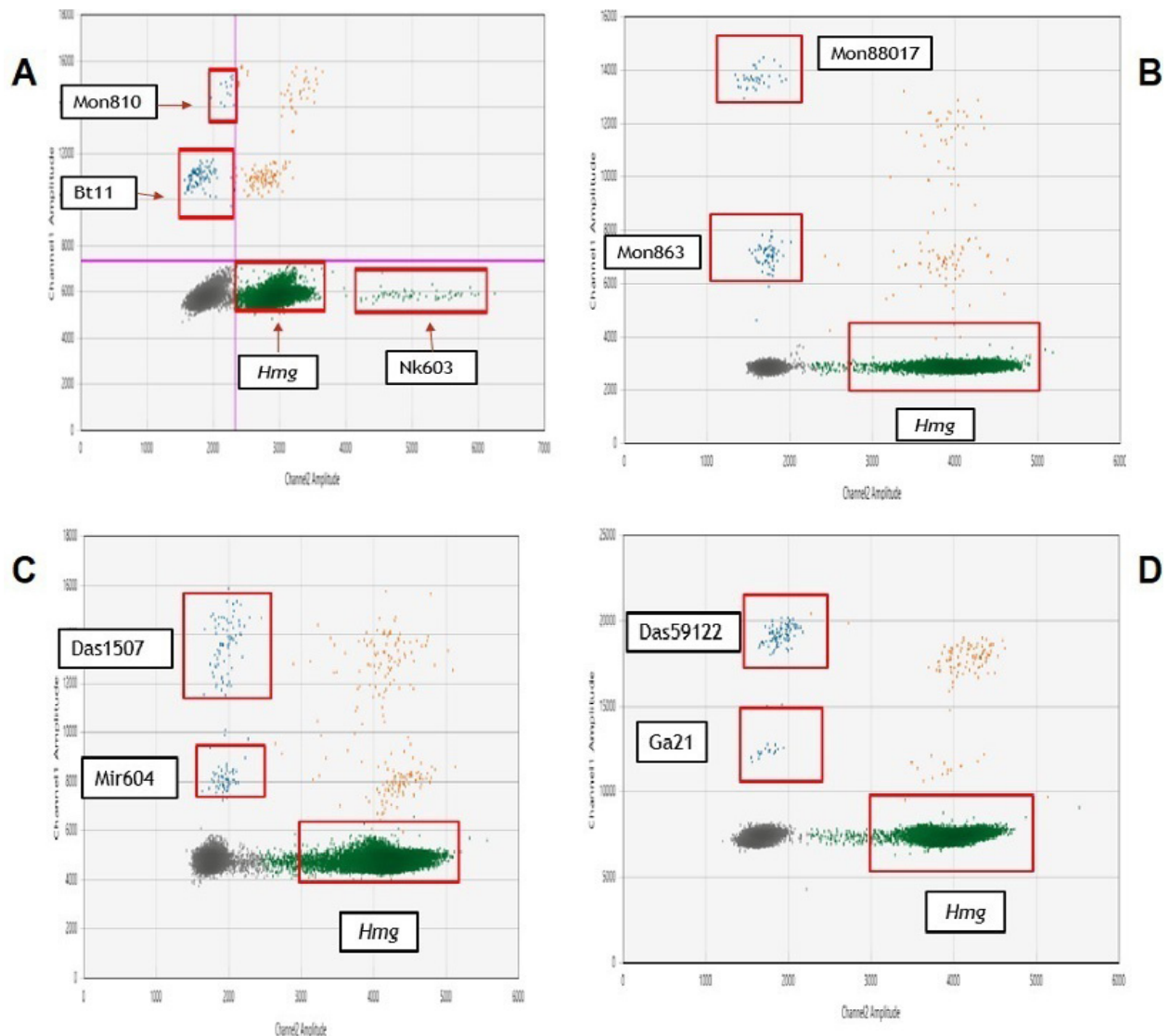


Figura 4. Módulos *multiplex*: A) Ensayo *tetraplex*: Hmg(HEX *low*), Nk603(HEX *high*), Bt11(FAM *low*) y Mon810(FAM *high*), B) Ensayo *triplex*: Hmg(HEX), Mon88017(FAM *high*) y Mon863(FAM *low*), C) Ensayo *triplex*: Hmg(HEX), Das1507(FAM *high*) y Mir604(FAM *low*), D) Ensayo *triplex*: Hmg(HEX), Das59122(FAM *high*) y Ga21(FAM *low*).

Figure 4. Multiplex modules: A) Tetraplex assay: Hmg(HEX *low*), Nk603(HEX *high*), Bt11(FAM *low*) and Mon810(FAM *high*), B) Triplex assay: Hmg(HEX), Mon88017(FAM *high*) and Mon863(FAM *low*), C) Triplex assay: Hmg(HEX), Das1507(FAM *high*) and Mir604(FAM *low*), D) Triplex assay: Hmg(HEX), Das59122(FAM *high*) and Ga21(FAM *low*).

Por último, existen estudios documentados con un grado de *multiplexing* más alto. Dobnik *et al.* (2015) realizaron un ensayo *decaplex*, en el cual se analizaron de manera simultánea 10 genes de interés. Sin embargo, en este tipo de estudios la precisión se reduce, ya que se dificulta discriminar tantos clústers de gotas positivas en un solo canal detector. Por lo tanto, se considera que es preferible ser medurado con el grado de *multiplexing*, para así garantizar resulta-

negative droplets. The duplex tests matched those of the simplex tests in hybridization and elongation temperature; as well as in the concentrations of primers and probes. They also showed potential for transgene quantification (Mon810 and BT11), in regard to validation documents of reference materials.

In multiplex tests, differences between primers and probe concentrations corresponding to the 1:3 ratio showed the best performance; they generated

dos precisos que cumplan con las legislaciones actuales en los países en los cuales esas pruebas se apliquen.

CONCLUSIONES

En las pruebas *simplex* de reacción en cadena de la polimerasa digital por goteo (ddPCR) con 10 eventos de modificación genética en maíz y un gen endógeno se logró determinar la temperatura de hibridación y elongación adecuada para diferenciación clara del clúster de gotas positivas y negativas. Las pruebas *dúplex* coincidieron con las *simplex* en la temperatura de hibridación y elongación, y en las concentraciones de iniciadores y sondas. También mostraron potencial para cuantificación de transgenes (Mon810 y BT11), respecto a documentos de validación de los materiales de referencia.

En las pruebas *multiplex*, las diferencias entre concentraciones de iniciadores y sondas correspondientes con la proporción 1:3 mostraron el rendimiento mejor; generaron grupos más compactos de gotas y discriminaron los clústeres de gotas positivas para dos eventos de modificación genética diferentes en un solo canal detector de fluorescencia.

Por último, las pruebas realizadas demostraron su potencial como métodos de rutina para la detección y cuantificación *simplex* y *multiplex* de eventos de modificación genética en maíz, con la referencia de los eventos probados.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) por el financiamiento otorgado para realizar este estudio.

LITERATURA CITADA

- Acosta, R. 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. Cultivos Tropicales 30: 113-120.
- Bio-Rad Laboratories. N.D. Droplet digital PCR Applications Guide. Bulletin 6407 Ver B US/EG Sig. 1216 https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf (Consulta: febrero 2019).
- Burns, M. J., A. M. Burrell, and C. A. Foy. 2010. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. European Food Research and Technology 231: 353-362. DOI 10.1007/s00217-010-1277-8
- Cottenet, G., C. Blancpain, and P. Chuah. 2019. Performance assessment of digital PCR for the quantification of GM-maize and GM-soya events. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01692-7>

more compact groups of droplets and discriminated clusters of positive droplets for two different genetic modification events in a single fluorescence detector channel.

Finally, the tests performed demonstrated their potential as routine methods for simplex and multiplex detection and quantification of genetic modification events in maize, against the reference of the tested events.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) for the funding provided for this study.

—End of the English version—



- Delobel, C., S. Larcher, M. Savini, M. Mazzara, and G. Van den Eede. 2007. Event specific method for the quantification of maize line GA21 using real-time PCR. Validation report and protocol. EUR. Publications office of the European Union. <http://dx.doi.org/10.2788/62889>
- Deprez, L., P. Corbisier, A. Kortekaas, S. Mazoua, R. Beaz-Hidalgo, S. Trapmann, and H. Emons. 2016. Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material. Biomolecular Detection and Quantification 9: 29-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2016.08.002>
- Dobnik, D., B. Spilsberg, A. Bogozalec, A. Holst-Jensen, and J. Zel. 2015. Multiplex Quantification of 12 European Union Authorized Genetically Modified Maize Lines with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. Analytical Chemistry 87: 8218-8226. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01208>
- Dobnik, D., D. Stebih, A. Blejec, D. Morisset, and J. Zel. 2016. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. Scientific Reports 6: 35451. <http://dx.doi.org/10.1038/srep35451>
- EURL (European Union Reference Laboratory). 2011. Technical guidance document from the European union reference laboratory for genetically modified food and feed on the implementation of commission regulation (EU) No 619/2011. Joint Research Centre. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC68082/technical%20guidance%20from%20eurl%20on%20llp.pdf> (Consulta: abril 2019).
- Gerdes, L., A. Iwobi, U. Busch, and S. Pecoraro. 2016. Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for

- quantification of genetically modified organisms. *Biomolecular Detection and Quantification* 7: 9-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2015.12.003>
- González, C. N., H. Silos, J. C. Estrada, J. A. Chávez, y L. Tejero. 2016. Características y propiedades del maíz criollo cultivado en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 669-680. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i3.326>
- Grelewski-Nowotko, K., M. Żurawska-Zajfert, E. Żmijewska, and S. Sowa. 2018. Optimization and Verification of Droplet Digital PCR Even-Specific Methods for the Quantification of GM Maize DAS1507 and NK603. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 185:207-220. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2634-x>
- Gutiérrez A., L. E., L. C. Castillo D, B. E. Gómez C., y A. I. Acatzi S. 2015a. Cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las técnicas de qPCR Y dPCR. *Agrocien- cia*. 49: 373-394.
- Gutiérrez G., D. F., R. Ruiz, y B. Xoconostle. 2015b. Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en Méxi- co y su contexto internacional. IPN. <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/Estado-actual-de-los-cultivos.pdf> (Consulta: febrero 2019).
- Kalendar, R., A. Muterko, M. Shamekova, K. Zhambakin. 2017. *In Silico* PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching. *In: Domingues, L. (eds). PCR. Methods in Molecular Biology*. Springer. New York, NY, USA. 1-31. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_1
- Koppel, R., and T. Bucher. 2015. Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis. *European Food Research and Technology* <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-015-2475-1>
- Koppel, R., T. Bucher, D. Bar, F. van Velsen, and A. Ganeshan. 2017. Validation of 13 duplex droplet digital PCR systems for quantitative GMO analysis of most prevalent GMO traits. *Eur Food Res Techno*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-017-2957-4>
- Lievens, A., S. Jacchia, D. Kagkli, C. Savini, and M. Querci. 2016. Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization. *PLoS ONE* 11: e0153317. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153317>
- Mazzara, M., E. Grazioli, S. Larcher, and G. Van den Eede. 2005. Event-specific method for the quantification of maize line DAS-59122-7 using Real-time PCR. Validation report and Protocol. European Commission. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6440f5e2-5c30-4fd3-863b-fdea20b1479c/language-en> (Consulta: marzo 2019).
- Morisset, D., D. Stebih, M. Milavec, K. Gruden, and J. Zel. 2013. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS ONE*. 8. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062583>
- Pecoraro, S., G. Berben, M. Burns, P. Corbisier, M. De Giacomo, M. De Loose, E. Dagand, D. Dobnik, R. Eriksson, A. Holst-Jensen, D. M. Kagkli, J. Kreysa, A. Lievens, D. Mäde, M. Mazzara, A. Paternò, V. Peterseil, C. Savini, T. Sovová, S. Sowa, and B. Spilsberg. 2019. Overview and recommendations for the application of digital PCR. *EUR 29673 JRC* 115736. <http://dx.doi.org/10.2760/192883>.
- Tamay de Dios, L., C. Ibarra, y C. Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2: 70-78.
- Trejo, S. D. L., E. A. Rodríguez, y R. F. Rivera. 2015. Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria* 25: 24-39.

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DUAL DE ESPECIES DE *Trichoderma* EN EL CRECIMIENTO DE *Capsicum chinense* Jacq.

EFFECT OF THE DUAL INTERACTION OF *Trichoderma* SPECIES ON THE GROWTH OF *Capsicum chinense* Jacq.

Jairo Cristóbal-Alejo¹, Felicia Amalia Moo-Koh^{1,2*}, José María Tun-Suárez¹, Arturo Reyes-Ramírez¹, Marcela Gamboa-Angulo²

¹Tecnológico Nacional de México/Campus Conkal. Avenida Tecnológico s/n. Conkal, Yucatán. 97345 México. ²Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán. 97205 México.

*Autor para correspondencia: Felicia Amalia Moo Koh (famk22@hotmail.com)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9346-1783>

RESUMEN

La interacción de especies bioestimulantes de *Trichoderma* puede tener beneficios para aumentar la producción de metabolitos involucrados en la promoción de crecimiento vegetal. La combinación de dos organismos con mayor grado de antagonismo podría potenciar los efectos promotores del crecimiento en plantas. El objetivo del estudio fue seleccionar *in vitro* especies nativas de *Trichoderma* cultivadas de manera dual y evaluar su efecto promotor del crecimiento en *Capsicum chinense*. La selección de aislados *in vitro* se realizó por medio de enfrentamientos duales con las siguientes características: crecimiento proporcional de ambos aislados en la caja Petri, presencia de barrera micelial y coloración del medio de cultivo. Los enfrentamientos seleccionados y sus aislados individuales se evaluaron en plantas de *C. chinense* cv. Mayapan. Además, dos testigos sin inoculación fúngica, uno como testigo al 100% (250N-200P-300K) de la fertilización química recomendada para el cultivo; y el segundo como testigo al 50%, con la mitad de la fertilización indicada. Tres aplicaciones de suspensiones de 10⁶ conidios mL⁻¹ se realizaron en la etapa de almácigo y otras tres durante el crecimiento del cultivo. El efecto de los tratamientos se evaluó a través del crecimiento vegetal y la producción del cultivo a los 145 días después de la siembra. La interacción de *Trichoderma virens* (Th05-02)/*Trichoderma koningiopsis* (Th41-11) fue igual ($p>0.05$) al testigo fertilizado al 100% en las variables evaluadas. Además, se obtuvieron incrementos del 14.53% en altura de la planta, 11.20% en diámetro del tallo, 28.54% en la biomasa seca aérea, 12.97% en biomasa seca de raíz, 33.13% en número de frutos y 25.77% en el peso de frutos, respecto al testigo con 50% de fertilización química. La interacción de las especies *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) ejerció un efecto promotor de crecimiento vegetal con

ABSTRACT

The interaction of biostimulant species of *Trichoderma* may have benefits to increase the production of metabolites involved in promoting plant growth; combining two organisms with a higher degree of antagonism could enhance their plant growth promoter effects. The objective of this study was to select *in vitro* native species of *Trichoderma* in a dual cultivation, and to evaluate their growth-promoting effect on *Capsicum chinense*. The selection of isolates *in vitro* was done by dual confrontations with the following characteristics: proportional growth of both isolates in the Petri dish; presence of mycelial barrier; and colour of the culture medium. The selected confrontations and their individual isolates were evaluated in plants of *C. chinense* cv. Mayapan. Also, two controls without fungal inoculation were assessed, one as control with 100% of the chemical fertilization (250N-200P-300K) recommended for the culture; and the second as control at 50%, with half of the indicated fertilization. Three applications of suspensions of 10⁶ conidia mL⁻¹ were made in the seedbed stage and another three during the growth of the culture. The effect of the treatments was evaluated through plant growth and crop production 145 days after sowing. The interaction of *Trichoderma virens* (Th05-02)/*Trichoderma koningiopsis* (Th41-11) was equal ($p>0.05$) to the 100% fertilized control in the variables evaluated. In addition, increases of 14.53% were recorded in plant height, 11.20% in stem diameter, 28.54% in foliar dry biomass, 12.97% in dry root biomass, 33.13% in a number of fruits, and 25.77% in the weight of fruits, compared to the control with 50% chemical fertilization. The species interaction of *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) exerted a plant growth promoting effect with 50% reduction in the recommended chemical fertilization for habanero pepper cultivation.

Recibido: abril, 2021. Aprobado: noviembre, 2021.

Publicado en Agrociencia 55: 681-693. 2021.

Key words: antagonism, *Capsicum chinense*, specific interactions, *Trichoderma virens*, *Trichoderma koningiopsis*, inoculation.

la reducción del 50% de la fertilización química recomendada en el cultivo de chile habanero.

Palabras clave: antagonismo, *Capsicum chinense*, interacciones específicas, *Trichoderma virens*, *Trichoderma koningiopsis*, inoculación.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de dos o más microorganismos bioestimulantes en cultivos hortícolas, beneficia la producción agrícola, este efecto se atribuye a sus interacciones sinérgicas. En este grupo de microorganismos, se encuentran hongos y bacterias de la rizosfera asociados con el sistema radical. Por ello, la respuesta de la planta a la inoculación combinada con este tipo de microorganismos depende de su capacidad para coexistir (Bansal *et al.*, 2021) en un ambiente donde las interacciones pueden ser de incompatibilidad (antagonismo) o compatibilidad (sinergismo).

Entre los hongos utilizados como bioestimulantes se encuentran especies de *Trichoderma* que en semillero o al momento del trasplante pueden mejorar la capacidad de la raíz para absorber nutrientes y con ello incrementar el crecimiento de las plantas y controlar fitoparásitos (Candelero *et al.*, 2015).

Aislados nativos de *Trichoderma* spp., en *Capsicum chinense* (Candelero *et al.*, 2015) y *Solanum lycopersicum* (Moo-Koh *et al.*, 2017) tiene una actividad promotora de crecimiento lo que fortalece la importancia de la aplicación de aislados nativos adaptados a las condiciones climáticas de los suelos de donde se aislaron.

Otros estudios muestran la importancia de inoculaciones duales o en consorcios de *Trichoderma*, capaces de potenciar y promover el crecimiento vegetal en comparación con inoculaciones individuales. En el primer caso se produce un estrés biológico, como consecuencia de la competencia por espacio y nutrientes. Lo anterior conduce a un incremento en la producción de compuestos fúngicos que impiden el crecimiento de otros aislados (antagonismo), hecho que resulta eficiente para la protección contra fitopatógenos, estrés ambiental y promoción en el crecimiento vegetal (Ortuño *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013).

El crecimiento dual *in vitro* de los aislados *T. harzianum* con *T. asperelloides* y *T. koningiopsis* y este último con *T. asperellum*, promovieron el crecimiento

INTRODUCTION

The application of two or more bio-stimulant microorganisms in horticultural crops benefits agricultural production; such an effect is attributed to synergistic interactions. In this group of microorganisms, rhizosphere bacteria and fungi were found associated with the root system. Therefore, plant response to combined inoculation with bio-stimulant microorganism depends on their capacities to coexist (Bansal *et al.*, 2021) in an environment where interactions can be due to incompatibility (antagonism) or compatibility (synergism).

Among those fungi used as biostimulants there are some species of *Trichoderma*. On the seedbed or at the time of transplantation can improve root capacity to absorb nutrients, thereby increasing plant growth and controlling plant parasites (Candelero *et al.*, 2015).

Native isolates of *Trichoderma* spp. in *Capsicum chinense* (Candelero *et al.*, 2015) and *Solanum lycopersicum* (Moo-Koh *et al.*, 2017) are reported with growth promoting activity. This strengthens the importance of the application of native isolates adapted to the climatic conditions of the soils they were isolated from.

Other studies show the importance of dual or in consortium inoculations of *Trichoderma*, capable of enhancing and promoting plant growth compared to individual inoculations. In the first case, a biological stress occurs, as a consequence of competition for space and nutrients. Which leads to an increase in the production of fungal compounds that prevent the growth of other isolates (antagonism); a fact that is efficient for protection against phytopathogens, environmental stress and plant growth promotion (Ortuño *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013).

The dual *in vitro* growth of *T. harzianum* isolates with *T. asperelloides* and *T. koningiopsis* and the latter with *T. asperellum*, promoted the growth of lettuce and radish, and were associated with a higher production of indole-3-acetic acid (Ortuño *et al.*, 2017). Also, the dual combination of *T. koningiopsis* with *T. virens* improved tomato growth and decreased the damage of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Moo-Koh *et al.*, 2018). Therefore, the combination of two organisms with a higher degree of antagonism would enhance the bio-stimulant effects in plants. Based on the above, the objective of this study was to

de lechuga y rábano, y se asoció con mayor producción de ácido indol-3-acético (Ortuño *et al.*, 2017). También, la combinación dual de *T. koningiopsis* con *T. virens* mejoraron el crecimiento de tomate y disminuyeron el daño del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* (Moo-Koh *et al.*, 2018). Por lo tanto, la combinación de dos organismos con mayor grado de antagonismo podría potenciar los efectos bioestimulantes en las plantas. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue seleccionar *in vitro*, especies nativas de *Trichoderma* cultivadas de manera dual y evaluar su efecto promotor en el crecimiento de *C. chinense*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de *Trichoderma* spp.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, ubicado en el estado de Yucatán, México. Este laboratorio cuenta con una colección fúngica del estado de Yucatán, de la cual se obtuvieron siete aislados de especies de *Trichoderma* a partir de partículas lavadas, secadas y depositadas en cajas de Petri provistas de medio de cultivo; seis aislados se identificaron en otros estudios a nivel especie y un aislado se identificó en esta investigación (Cuadro 1).

Al aislado Th05-02 se le realizó identificación molecular, por medio de extracción de ADN de acuerdo con la metodología establecida en el laboratorio (Moo-Koh *et al.*, 2017). Los hongos se activaron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), y se hizo crecer la cepa del hongo durante 3 d. Después, con ayuda de un portaobjeto estéril se obtuvo el micelio de la caja Petri y se depositó en un tubo de microcentrifuga de 2 mL con solución

select *in vitro* native *Trichoderma* species, which were dual cultivated, to evaluate their promoting effect on the growth of *C. chinense*.

MATERIALS AND METHODS

Obtention of *Trichoderma* spp.

The study was carried out at the Plant Pathology Laboratory of Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, located in the state of Yucatan, Mexico. This laboratory guards a fungal collection from the state of Yucatan, from which seven isolates of *Trichoderma* species were obtained from particles washed, dried and deposited in Petri dishes provided with culture medium; six isolates were identified in other studies at the species level, and one isolate was identified in this study (Table 1).

Molecular identification was carried out on the Th05-02 isolate by DNA extraction according to the methodology established in the Laboratory (Moo-Koh *et al.*, 2017). Fungi were activated in potato-dextrose-agar (PDA) culture medium, and the fungus strain was grown for 3 d. Then, with the help of a sterile slide, the mycelium was obtained from the Petri dish and placed in a 2 mL microcentrifuge tube with lysis buffer solution of the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit (Zymo Research) for DNA extraction.

The standard polymerase chain reaction (PCR) was used for DNA amplification; with the ITS1 and ITS4 primers, the ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified (White *et al.*, 1990). The final amplification products were sent to Macrogen USA for sequencing. The sequences obtained were analysed and compared with the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database using the Blast algorithm; the sequence of isolate Th05-02 was deposited in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Cuadro 1. Especies de *Trichoderma* aisladas de partículas de suelo en Yucatán, México.

Table 1. *Trichoderma* species isolates from soil particles in Yucatan, Mexico.

Clave	Especie	Número de acceso al GenBank	Origen	Suelo [†]	Referencia
Th26-52	<i>T. ghanense</i>	MF078651	Tahdziú	1	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2017
Th02-01	<i>T. harzianum</i>	MF952887	Tizimín	1	Candelero <i>et al.</i> , 2015 Moo-Koh <i>et al.</i> , 2018
Th33-59	<i>T. harzianum</i>	MF078648	Ticul	2	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2017
Th41-11	<i>T. koningiopsis</i>	MF952888	Sanahcat	2	Candelero <i>et al.</i> , 2015
Th09-06	<i>T. simmonsii</i>	MF078647	Dzidzantun	2	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2018
Th27-08	<i>T. virens</i>	MF078646	Chacsinkín	2	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2018
Th05-02	<i>Trichoderma</i> sp.	MF952889	Dzilam González	2	Aislado en estudio

[†]Tipo de suelo 1: suelo agrícola, 2: suelo de selva primaria sin actividad agrícola. ♦ [†]Soil type 1: agricultural soil, 2: primary forest soil without agricultural activity.

amortiguadora de lisis del Kit ZR Fungal/Bacterial DNA Mini-Prep™ (Zymo Research) para extracción de ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional se utilizó para la amplificación del ADN; con los iniciadores ITS1 e ITS4 se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 (White *et al.*, 1990). Los productos finales de la amplificación se enviaron a la empresa Macrogen USA para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el algoritmo de Blast; la secuencia del aislado Th05-02 se depositó en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Enfrentamiento dual *in vitro* de aislados de especies de *Trichoderma*

Los enfrentamientos duales se realizaron en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA. Un disco de micelio de 5 mm de diámetro, de cada aislado con 8 d de crecimiento se depositó en puntos equidistantes de la caja Petri. Con siete aislados de *Trichoderma* se generaron 21 enfrentamientos duales al azar con cuatro réplicas, con el cuidado de que no se repitan los enfrentamientos. Como testigos se utilizaron los aislados individuales sin enfrentamiento, los cultivos fúngicos se incubaron a 25 °C por 8 d. Para seleccionar los aislados fúngicos duales se consideró el crecimiento proporcional (50:50 en porcentaje) de ambos aislados en la caja Petri; la presencia de una barrera micelial con medida de 0.2 a 0.7 cm; y la coloración que indica maduración de la colonia al esporular en el medio de cultivo (Ortuño *et al.*, 2013).

Efecto de la interacción dual de especies de *Trichoderma* en *C. chinense*

Los enfrentamientos duales seleccionados y sus aislados individuales se evaluaron en condiciones controladas con plantas de *C. chinense* cv. Mayapan. Primero, se prepararon suspensiones de conidios de cada enfrentamiento y sus aislados individuales a una concentración de 10^6 conidios mL⁻¹. Luego, en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato Cosmopeat® mezclado con Agrolita® (1:1, v:v), se inoculó 1 mL de solución con las suspensiones de conidios en cada cavidad. Tres inoculaciones en semillero se realizaron al momento de la siembra, a los 8 y 15 d después de la germinación. Después de 45 d de la siembra se procedió al trasplante, en bolsas negras con capacidad de 5 kg, se llenaron con suelo Luvisol ródico esterilizado por arrastre de vapor de agua durante 4 h. A los 15 y 30 d después del trasplante se hicieron aplicaciones con 50 mL de las suspensiones de conidios por bolsa, con la misma concentración utilizada en semillero.

In vitro dual confrontation of *Trichoderma* species isolates

The dual confrontations were carried out in Petri dishes of 90 mm in diameter with PDA culture medium. A mycelium disc of 5 mm in diameter, of each isolate, with 8 d of growth, was deposited in equidistant points of the Petri dish. With seven isolates of *Trichoderma*, 21 random dual confrontations were generated with four replicates, observing not to repeat the confrontations. The individual isolates without confrontation were used as controls, the fungal cultures were incubated at 25 °C for 8 d. To select the dual fungal isolates, the proportional growth (50:50, %) of both isolates in the Petri dish was considered; as well as the presence of a mycelial barrier measuring 0.2 to 0.7 cm; and the coloration that indicates maturation of the colony when sporulating in the culture medium (Ortuño *et al.*, 2013).

Effect of the dual interaction of *Trichoderma* species on *C. chinense*

The selected dual confrontations and their individual isolates were evaluated under controlled conditions with plants of *C. chinense* cv. Mayapan. First, suspensions of conidia from each confrontation and their individual isolates were prepared at a concentration of 10^6 conidia mL⁻¹.

Then, in 200-cavity polystyrene trays with Cosmopeat® substrate mixed with Agrolita® (1:1, v:v), 1 mL of solution was inoculated with the conidia suspensions in each cavity. Three inoculations in the seedbed were done at the time of sowing, at 8 and 15 d after germination. After 45 d of sowing, seedlings were transplanted in black bags with 5 kg capacity; bags were filled with soil Luvisol rhodic, sterilized by steam dragging for 4 h. At 15 and 30 d after transplantation, applications were made with 50 mL of the conidia suspensions per bag, at the same concentration used in the seedbed.

The treatments used consisted of four selected dual confrontations and their individual isolates. In addition, two controls without fungal inoculation were included, each one represented one treatment, with 20 plants per treatment and four replicates. Each replicate consisted of five plants as an experimental unit. The 100% control treatment was the recommended fertilization for the cultivation of *C. chinense*, corresponding to the formula 250N-200P-300K for a density of 20 000 plants ha⁻¹ and it was applied distributed in four phenological stages. The second control at 50% contained half of the recommended fertilization doses (125N-100P-150K). The dual confrontations previously selected *in vitro* and their individual isolates were mixed with 50% fertilization. Fertilization was balanced with commercial grade fertilizers: Urea (46-00-00), monoammonium phosphate (MAP, 12-61-00) and potassium nitrate (NKS, 13-2-44).

Los tratamientos utilizados consistieron en cuatro enfrentamientos duales seleccionados y sus aislados individuales. Además, se incluyeron dos testigos sin inoculación fúngica, cada uno representó un tratamiento, con 20 plantas por tratamiento y cuatro repeticiones. Cada repetición consistió en cinco plantas como unidad experimental. El testigo al 100% representó la fertilización recomendada para el cultivo de *C. chinense*, la cual correspondió con la fórmula 250N-200P-300K para una densidad de 20 000 plantas ha⁻¹ y se distribuyó en cuatro etapas fenológicas. El segundo testigo al 50% (125N-100P-150K) contenía la mitad de la fertilización recomendada. Los enfrentamientos duales seleccionados antes *in vitro* y sus aislados individuales se mezclaron con la fertilización al 50%. La fertilización se balanceó con los fertilizantes grado comercial: Urea (46-00-00), fosfato monoamónico (MAP, 12-61-00) y nitrato de potasio (NKS, 13-2-44).

Variables de crecimiento

Después de 145 d desde la siembra se midieron las variables de crecimiento: altura de planta (AP) y diámetro del tallo (DT). Para medir las variables biomasa seca aérea (BSA) y biomasa seca de raíz (BSR) se separó el material vegetal en parte aérea y raíz, se depositaron en un horno a 65 °C hasta peso constante. También se registraron variables de producción como número de frutos por planta y peso de frutos por planta. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar; con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y la comparación de medias se estimó por el método de Scott-Knott ($p \leq 0.05$) con el programa InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación del aislado nativo de *Trichoderma* (Th05-02)

La identificación morfológica del aislado Th05-02, correspondió al género *Trichoderma* de acuerdo con la observación de conidios en fialides y conidioforos, de color amarillo en medio de cultivo (Barnett y Hunter, 1998). Al analizar y comparar la secuencia obtenida del aislado Th05-02 con las secuencias del GenBank®, ésta correspondió a *T. virens* (número de acceso del GenBank®, MF952889) con un porcentaje de identidad del 100% y cobertura del 99%. Es importante identificar de manera molecular las especies de *Trichoderma* porque la identificación morfológica resulta insuficiente para distinguir entre especies, debido a la biología y a la similitud morfológica entre ellas (Moo-Koh *et al.*, 2017). Además, muchos

Growth variables

After 145 d from sowing, growth variables were measured: plant height: (AP) and stem diameter (DT). To measure the foliar dry biomass (BSA) and root dry biomass (BSR) variables, the plant material was separated in foliage and roots; both were placed in an oven at 65 °C until constant weight. Production variables such as number of fruits per plant and weight of fruits per plant were also recorded. Treatments were distributed in a completely randomized experimental design. Data obtained were analysed with ANOVA, and the comparison of means was estimated by the Scott-Knott method ($p \leq 0.05$) with InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2020).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of the native isolate of *Trichoderma* (Th05-02)

The morphological identification of the isolate Th05-02 corresponded to the genus *Trichoderma*, according to the observation of conidia in phialides and conidiophores, yellow in colour in culture medium (Barnett and Hunter, 1998). When analysing the sequence obtained from the Th05-02 isolate and comparing it with the GenBank® sequences, it corresponded to *T. virens* (GenBank® accession number, MF952889) with a 100% identity percentage and 99% coverage. It is important to molecularly identify *Trichoderma* species because morphological identification is insufficient to distinguish between species, due to the biology and morphological similarity between them (Moo-Koh *et al.*, 2017). In addition, many widely used commercial fungus are identified up to their genus branch. Instead, the specific identification of bio-stimulant organisms provides knowledge of the presence of species in tropical areas (Mukherjee *et al.*, 2013).

For *Trichoderma*, 488 species have been registered (<http://www.indexfungorum.org>) of which 14 are reported in Mexico. Previous studies have shown the antagonistic and plant growth promoter potential of this genus. The species of *T. harzianum*, *T. hammatum*, *T. koningiopsi*, and *T. simmonsii* (Moo-Koh *et al.*, 2018) were registered as antagonistic species. While *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. ghanense*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, and *T. virens* were classified as plant growth promoters (Candelero *et al.*, 2015; Moo-

hongos comerciales de uso extenso se identifican a nivel género. En cambio, la identificación específica de los organismos bioestimulantes proporciona un conocimiento de la presencia de especies en zonas tropicales (Mukherjee *et al.*, 2013).

Para *Trichoderma* se han registrado 488 especies (<http://www.indexfungorum.org>) de las cuales 14 están reportadas en México. Estudios previos han mostrado el potencial antagónico y promotor de crecimiento vegetal de este género. Las especies de *T. harzianum*, *T. hammatum*, *T. koningiopsis*, y *T. simmonsii* (Moo-Koh *et al.*, 2018) se incluyeron como especies antagónicas. *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. ghanense*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis* y *T. virens*, se catalogaron como promotoras de crecimiento vegetal (Candelero *et al.*, 2015; Moo-Koh *et al.*, 2017). *T. crassum*, *T. brevicompactum*, *T. pleuroticola*, *T. reesei* y *T. spirale* se encontraron en el agroecosistema de cacao y banano (Torres *et al.*, 2015). La identificación de especies de *Trichoderma* demuestra la presencia y distribución en zonas distintas con y sin actividad agrícola, y con la obtención de especies nativas se contribuye a la búsqueda de agentes alternativos bioestimulantes nativos.

Efecto *in vitro* de la interacción dual de especies de *Trichoderma*

En general, se observó mayor antagonismo dual en aquellas especies provenientes de suelos con actividad agrícola que en los aislados de suelos sin actividad agrícola. Los aislados que sobresalieron con interacción dual mayor fueron: *T. ghanense* (Th26-52) proveniente de suelo con actividad agrícola y *T. koningiopsis* (Th41-11) de suelo sin actividad agrícola (Cuadro 2).

Cuando estos aislados se enfrentaron con otros, su coloración micelial cambió a un color de intensidad mayor por la presencia abundante de esporas, estimulada por la competencia de los aislados enfrentados (Figura 1).

En ocho enfrentamientos se observó barrera micelial de 0.2-0.7 cm, con los aislados *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52) y *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11), los cuales mostraron una barrera de 0.7 cm, así como un cambio de color en el medio de cultivo. Solo la barrera micelial del enfrentamiento de *T. koningiopsis* (Th41-11)/*T. harzianum* (Th33-59) midió 0.2 cm y no presentó

Koh *et al.*, 2017). *T. crassum*, *T. brevicompactum*, *T. pleuroticola*, *T. reesei*, and *T. spirale* were found in the cocoa tree and banana plant agroecosystems (Torres *et al.*, 2015). The identification of *Trichoderma* species shows their presence and distribution in different areas with and without agricultural activity; and obtaining native species contributes to the search for alternative native bio-stimulant agents.

In vitro effect of the dual interaction of *Trichoderma* species

In general, greater dual antagonism was observed in those species from soils with agricultural activity than in isolates from soils without agricultural activity. The isolates with the highest dual interaction were: *T. ghanense* (Th26-52) from soil with agricultural activity, and *T. koningiopsis* (Th41-11) from soil without agricultural activity (Table 2).

When those isolates faced each other, their mycelial coloration changed to a colour of greater intensity due to the abundant presence of spores, stimulated by the competition of the confronting isolates (Figure 1).

In eight confrontations a mycelial barrier of 0.2-0.7 cm was observed, with the isolates *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52) and *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11), which showed a barrier of 0.7 cm, as well as a colour change in the culture medium. Only the mycelial barrier from the *T. koningiopsis* (Th41-11)/*T. harzianum* (Th33-59) confrontation measured 0.2 cm and did not show a colour change in the culture medium. No dual interaction was observed between isolates of the same species, even when they had different origin.

The *in vitro* study of *Trichoderma* isolates is the basis for their selection and agricultural use because it allows to select confrontations that can be used as biostimulants in agriculture. *In vitro* confrontation studies of *Trichoderma* isolates reported greater antagonism against phytopathogenic fungi, depending on the quantity of metabolites produced and the sensitivity of the microorganisms involved (Leylaie and Zafari, 2018).

The competition capacity of an antagonist organism for substrate is favoured by antibiosis and the mycoparasitism exerted on other organisms (Mukhopadhyay and Kumar 2020; Sood *et al.*, 2020). This capacity was observed in the dual isolates that had proportional growth, a defence barrier of 0.7 cm,

Cuadro 2. Enfrentamientos duales con capacidad de competencia *in vitro* de especies de *Trichoderma*.
Table 2. Dual confrontations with *in vitro* competition capacity of *Trichoderma* species.

Enfrentamientos	Origen [†]	Barrera micelial (cm)	Coloración en el medio [‡]
<i>T. harzianum</i> / <i>T. ghanense</i> Th02-01/Th26-52	1/1	0.7	Sí
<i>T. virens</i> / <i>T. koningiopsis</i> Th05-02/Th41-11	2/2	0.5	Sí
<i>T. virens</i> / <i>T. ghanense</i> Th05-02/Th26-52	2/1	0.7	Sí
<i>T. virens</i> / <i>T. ghanense</i> Th27-08/Th26-52	2/1	0.2	No
<i>T. simmonsii</i> / <i>T. ghanense</i> Th09-06/Th26-52	2/1	0.3	No
<i>T. koningiopsis</i> / <i>T. harzianum</i> Th41-11/Th33-59	2/2	0.2	No
<i>T. ghanense</i> / <i>T. harzianum</i> Th26-52/Th33-59	1/2	0.3	No

[†]Tipo de suelo 1: suelo con actividad agrícola, 2: suelo sin actividad agrícola; [‡]Coloración en el medio; Sí: con coloración; No: sin coloración. ♦ [†]Type of soil 1: soil with agricultural activity, 2: soil without agricultural activity; [‡]Colouring in the medium; Sí: with colouring; No: with no colouring.

cambio de color en el medio de cultivo. No se observó interacción dual entre aislados de la misma especie, aun cuando provinieron de origen diferente.

El estudio *in vitro* de aislados de *Trichoderma* es la base para su selección y uso agrícola, porque permite seleccionar enfrentamientos con las características para su aprovechamiento como bioestimulantes en la agricultura. Estudios de enfrentamientos *in vitro* de aislados de *Trichoderma* reportaron antagonismo mayor contra hongos fitopatógenos en función de la

and coloration in the culture medium (Bansal *et al.*, 2021; Ortuño *et al.*, 2013). The antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. depends on the isolate and not on the species, since the same species may have a different biocontrol capacity. This was confirmed with the changes in colouring according to the confrontation; for example, *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) isolates from soils without agricultural activity presented a barrier of 0.5 cm and coloration in the culture medium.

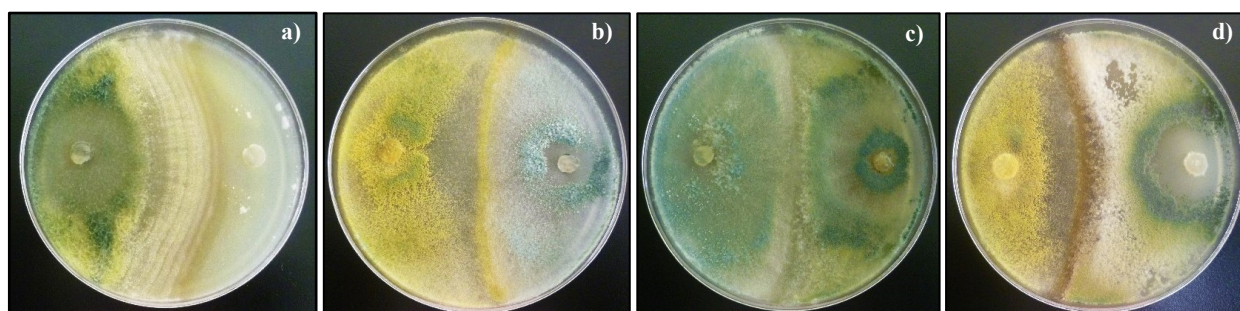


Figura 1. Enfrentamientos *in vitro* de especies de *Trichoderma*, a) *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52), b) *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11), c) *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11) y d) *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52).

Figure 1. *In vitro* confrontations of *Trichoderma* species, a) *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52), b) *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11), c) *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11), and d) *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52).

cantidad de metabolitos producidos y de la sensibilidad de los microorganismos involucrados (Leylaie y Zafari, 2018).

La capacidad de competencia de un organismo antagonista por sustrato se favorece por la antibiosis y el micoparasitismo que se ejerce sobre otros organismos (Mukhopadhyay y Kumar 2020; Sood *et al.*, 2020). Esta capacidad se observó en este estudio con los aislados duales que tuvieron crecimiento proporcional, una barrera de defensa de 0.7 cm y con coloración en el medio de cultivo (Bansal *et al.*, 2021; Ortuño *et al.*, 2013). La capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. es dependiente del aislado y no de la especie, ya que de la misma especie pueden poseer capacidad de biocontrol diferente. Lo anterior se confirmó con los cambios en la coloración según el enfrentamiento; por ejemplo, *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) aislados provenientes de suelos sin actividad agrícola, presentaron barrera de 0.5 cm y coloración en el medio de cultivo.

Así mismo, *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11), provenientes de suelos sin actividad agrícola, tuvieron una menor barrera de defensa de 0.4 cm y sin coloración en el medio. A diferencia de *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52) provenientes de suelos con y sin actividad agrícola, los cuales tuvieron una barrera de 0.7 cm y coloración en el medio. Pocos estudios de interacciones duales *in vitro* de aislados de *Trichoderma* existen antes de sus aplicaciones directas en plantas (Ortuño *et al.*, 2017). Por ejemplo, *T. harzianum* y *T. asperellum* *in vitro* presentaron una barrera gruesa de 0.7 cm, e *in vivo* se probaron en *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus* (Ortuño *et al.*, 2013). En tanto que *T. atroviride* y *T. citrinoviride* en combinación produjeron ácido indolacético y sideróforos, los cuales fueron bioestimulantes multifuncionales para el crecimiento y desarrollo de *Brassica chinensis* (Chen *et al.*, 2021).

El efecto benéfico de la combinación interespecífica de *Trichoderma* se atribuye a la capacidad de proliferar en el suelo y competir por espacio y nutrientes con otros microorganismos; actividad que se potencializa en presencia de materia orgánica (Ali *et al.*, 2020). Además, el desencadenamiento de una serie de compuestos con efecto en otros organismos antagonistas inclusive de la misma especie y dentro de una población mixta en nichos ambientales, como los sistemas con suelos agrícolas tanto cultivados como los no cultivados. Lo anterior puede sugerir que las especies de *Trichoderma* tienen características

Likewise, *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11) from soils without agricultural activity had a smaller defence barrier of 0.4 cm, and without coloration in the medium. In contrary, *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52) from soils with and without agricultural activity, which had a barrier of 0.7 cm and coloration in the medium. There are few studies of dual *in vitro* interactions of *Trichoderma* isolates before their direct applications in plants (Ortuño *et al.*, 2017). For example, *in vitro* *T. harzianum* and *T. asperellum* presented a thick barrier of 0.7 cm, and *in vivo* they were tested on *Lactuca sativa* and *Raphanus sativus* (Ortuño *et al.*, 2013). Whereas *T. atroviride* and *T. citrinoviride* in combination produced indoleacetic acid and siderophores, which were multifunctional biostimulants for the growth and development of *Brassica chinensis* (Chen *et al.*, 2021).

The beneficial effect of the interspecific combination of *Trichoderma* is attributed to the capacity to proliferate in the soil and compete for space and nutrients with other microorganisms; activity that is potentiated in the presence of organic matter (Ali *et al.*, 2020). Also, a series of compounds resulting from *Trichoderma* combinations have an effect on other antagonistic organisms, including those in the same species, and within a mixed population in environmental niches, like systems with either cultivated or non-cultivated agricultural soils. This may suggest that *Trichoderma* species have evolutionary characteristics, selective and protective roles when they interact between species and with plants (Chen *et al.*, 2021).

Biostimulant effect of *Trichoderma* species on *C. chinense* plants

The analysis of variance between treatments of the growth variables showed differences ($p \leq 0.05$). In the isolates of dual interaction and in the control with 100% chemical fertilization, the highest averages were recorded. The control with 50% fertilization, after the inoculation of the dual confrontations and the individual isolates, caused increases of 0.58-14.53% in plant height, 0.96-11.20% in stem diameter, 2.39-28.54% in foliar dry biomass, 1.22-12.97% in dry root biomass, 3.47-33.13% in number of fruits, and 0.11-25.77% in fruit weight (Table 3).

In particular, the treatment of *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) was equal ($p \leq 0.05$) to

evolutivas, roles selectivos y protectores cuando interaccionan entre especies y con las plantas (Chen *et al.*, 2021).

Efecto bioestimulante de especies de *Trichoderma* en plantas de *C. chinense*

Los análisis de varianza entre tratamientos de las variables de crecimiento mostraron diferencias ($p \leq 0.05$). En los aislados de interacción dual y en el testigo con fertilización química al 100% se tuvieron los promedios mayores. El testigo con 50% de fertilización, tras la inoculación de los enfrentamientos duales y los aislados individuales originó incrementos de 0.58-14.53% en altura de la planta, 0.96-11.20% en diámetro del tallo, 2.39-28.54% en biomasa seca aérea, 1.22-12.97% en biomasa seca de raíz, 3.47-33.13% en número de frutos y 0.11-25.77% en el peso de frutos (Cuadro 3).

En particular, el tratamiento de *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) fue igual ($p \leq 0.05$) al testigo con fertilización al 100% en las variables estimadas. Con efecto menor resultaron los tratamientos de *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52), *T.*

the control with 100% fertilization in the estimated variables. The treatments of *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52), and *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11) resulted with a lower effect. With the dual interactions, increases of 7.62-14.53% were obtained in plant height, 7.20-11.20% in stem diameter, 9.53-28.54% in foliar dry biomass, 1.82-12.97% in root dry biomass, 15.26-33.13% in number of fruits, and 19.43-25.77% in fruit weight, with respect to the control with 50% fertilization.

The individual isolates also exerted a promoter effect by obtaining higher averages than the 50% control. With the isolates of *T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01), and *T. virens* (Th05-02), increases went from 0.58-6.16% in plant height, 0.96-4.62% in stem diameter, 2.39-14.64% in foliar dry biomass, 1.22-3.59% in dry root biomass, 3.47-15.26% in number of fruits per plant, and 0.11-9.88% in the weight of fruits per plant, with respect to the control with fertilization at 50%.

Inoculation studies in *C. chinense* seedlings with individual native isolates of *T. virens* (Th05-02 and Th27-08) showed positive effects of fungi on the

Cuadro 3. Efecto de la interacción dual de especies de *Trichoderma* en las variables de crecimiento vegetal en plantas de *C. chinense*.

Table 3. Effect of the dual interaction of *Trichoderma* species on the variables of plant growth in *C. chinense* plants.

Tratamiento	AP (cm)	DT (mm)	BSA (g)	BSR (g)	No. de frutos	Peso de frutos (g)
<i>T. harzianum</i> Th02-01 + 50% Fert	126.1 d	10.5 c	41.8 d	16.3 b	130 c	454.9 e
<i>T. virens</i> Th05-02 + 50% Fert	123.9 e	10.8 c	47.8 c	16.5 b	131 c	470.5 d
<i>T. virens</i> Th27-08 + 50% Fert	126.6 d	10.4 c	46.0 c	16.6 b	115 e	424.6 f
<i>T. ghanense</i> Th26-52 + 50% Fert	119.5 f	10.6 c	44.4 c	16.6 b	129 c	453.6 e
<i>T. koningiopsis</i> Th41-11 + 50% Fert	121.1 f	10.6 c	45.4 c	16.7 b	121 d	424.5 f
Th05-02/Th26-52+ 50% Fert	135.4 b	11.2 b	56.0 a	17.1 b	152 b	554.3 b
Th27-08/Th41-11 + 50% Fert	128.6 d	11.4 b	45.1 c	16.4 b	131 c	526.3 c
Th02-01/Th26-52 + 50% Fert	132.6 c	11.1 b	53.3 b	17.1 b	136 c	545.9 b
Th05-02/Th41-11 + 50% Fert	139.0 a	11.6 a	57.1 a	18.5 a	166 a	571.2 a
Testigo 100%	140.3 a	11.6 a	58.1 a	18.0 a	172 a	574.6 a
Testigo 50% de Fertilización	118.8 f	10.3 c	40.8 d	16.1 b	111 e	424.0 f
DS	4.95	1.09	5.43	3.32	7.70	37.88

Medias con letra distinta en cada columna indican diferencia estadística (Scott-Knott, $p \leq 0.05$). AP: altura de planta, DT: diámetro del tallo, BSA: biomasa seca aérea, BSR: biomasa seca de raíz. Testigo al 100%: 250N-200P-300K; Testigo al 50% de fertilización: 125N-100P-150K. DS: desviación estándar. ♦ Means with different letters in each column indicate statistical difference (Scott-Knott, $p \leq 0.05$). AP: plant height, DT: stem diameter, BSA: foliage dry biomass, BSR: root dry biomass. Control at 100% fertilization: 250N-200P-300K; Control at 50% fertilization: 125N-100P-150K. DS: standard deviation.

harzianum (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52) y *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11). Con las interacciones duales se obtuvieron incrementos de 7.62-14.53% en altura de la planta, 7.20-11.20% en diámetro del tallo, 9.53-28.54% en biomasa seca aérea, 1.82-12.97% en biomasa seca de raíz, 15.26-33.13% en número de frutos y 19.43-25.77% en peso de frutos, respecto al testigo con fertilización al 50%.

Los aislados individuales también ejercieron un efecto promotor al obtener mayores promedios que el testigo 50%. Con los aislados de *T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01) y *T. virens* (Th05-02) se incrementaron, del 0.58-6.16% en altura de la planta, 0.96-4.62% en diámetro de tallo, 2.39-14.64% en biomasa seca aérea, 1.22-3.59% en biomasa seca de raíz, 3.47-15.26% en número de frutos por planta y 0.11-9.88% en el peso de frutos por planta, respecto al testigo con fertilización al 50%.

Estudios de inoculaciones en plántulas de *C. chinense* con aislados nativos individuales de *T. virens* (Th05-02 y Th27-08) mostraron efectos positivos de los hongos en la variable altura de plántula con incrementos del 55.57 y 47.62% (Candelero *et al.*, 2015). También, en este estudio se observó un incremento con la aplicación de estos aislados en altura de planta, del 4.11% con Th05-02, y del 6.16% con Th27-08. En cambio, en combinación con otros aislados el incremento fue del 12.25-14.53% en esta variable respecto al testigo sin inoculantes. Así, el uso de combinaciones intra e interespecíficas de microorganismo es común para mejorar el potencial de productos bioestimulantes en plantas.

En este estudio las combinaciones para evaluar la interacción dual sobre *C. chinense* se realizaron de manera interespecífica entre: *T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01), *T. koningiopsis* (Th41-11) y *T. virens* (Th05-02, Th27-08). Otros estudios hallaron evidencias de combinaciones interespecíficas sobre *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*; con la inoculación de aislados duales de *T. harzianum* y *T. asperellum* mejoró el crecimiento hasta un 80% en el primer caso y hasta un 82% en el segundo caso en relación con aislados individuales (Ortuño *et al.*, 2017). También en *Nicotiana tabacum*, la mezcla de aislados nativos de *Trichoderma* (T1024 y T0912) mejoró el rendimiento respecto a aislados individuales, con porcentajes del 18.73% para T1024 y 11.30% para T0912 (Zapata *et al.*, 2012).

seedling height variable, with increases of 55.57 and 47.62% (Candelero *et al.*, 2015). Also, in this study we observed an increase with the application of these isolates in plant height, of 4.11% with Th05-02, and 6.16% with Th27-08. In contrast, in combination with other isolates the increase was 12.25-14.53% in this variable compared to the control without inoculants. Thus, the use of intra- and interspecific combinations of microorganisms usually improves the potential of biostimulant products in plants.

In this study, the combinations to evaluate dual interaction on *C. chinense* were done interspecifically between: *T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01), *T. koningiopsis* (Th41-11), and *T. virens* (Th05-02, Th27-08). Other studies reported interspecific combinations results on *Lactuca sativa* and *Raphanus sativus*; with the inoculation of dual isolates of *T. harzianum* and *T. asperellum*, growth increased up to 80% in the first case, and up to 82% in the second case in relation to individual isolates (Ortuño *et al.*, 2017). Also, in *Nicotiana tabacum*, the mixture of native *Trichoderma* isolates (T1024 and T0912) improved the yield compared to individual isolates, with percentages of 18.73% for T1024 and 11.30% for T0912 (Zapata *et al.*, 2012).

In *C. annuum*, the combination of *Trichoderma* spp. with *Glomus intraradices* (*Rhizophagus intraradices*) increased shoot dry weight by 115% and root dry weight 133% compared to individual inoculations with *G. intraradices* or *T. atroviride*. Such increases in shoot dry weight and root dry weight were associated with a higher level of nutrient absorption. The former shows a better effect when consortia of microorganisms are used, since there is greater competition, which often results in benefits on the growth and health of the plants (Colla *et al.*, 2015). Different isolates of *Trichoderma* produce and release growth-promoting compounds in interaction with other organisms, for example, in *S. lycopersicum*, harzianolide, and 6-pentyl pyrone (6-PP) had an effect on plant height and dry biomass (Vinale *et al.*, 2008). Also, *Trichoderma* species produce 3-indole acetic acid (AIA) and siderophores that act as iron chelating compounds, which is why they are important for the absorption of this element (Zeilinger *et al.*, 2016).

The inoculations of microorganisms are a factor to consider at the time of sowing, because when the roots are transplanted, they are already colonized by them;

En *C. annuum* la combinación de *Trichoderma* spp. con *Glomus intraradices* (*Rhizophagus intraradices*) aumentaron 115% el peso seco de brotes y 133% el peso seco de raíz en comparación con inoculaciones individuales con *G. intraradices* o *T. atroviride*. Este aumento en el peso seco de brotes y raíz se asoció con un nivel mayor de absorción de nutrientes. Lo anterior demuestra mejor efecto cuando se utilizan consorcios de microorganismos, ya que se tiene competencia mayor, lo cual con frecuencia resulta en beneficios sobre el crecimiento y la sanidad de las plantas (Colla *et al.*, 2015). Diferentes aislamientos de *Trichoderma* producen y liberan compuestos promotores de crecimiento en interacción con otros organismos, por ejemplo, en *S. lycopersicum* la harzianolida y el 6-pentil pirona (6-PP) tuvieron un efecto en la altura de planta y biomasa seca (Vinale *et al.*, 2008). También especies de *Trichoderma* producen ácido 3-indol acético (AIA) y sideróforos que actúan como compuestos quelantes de hierro, por lo cual son importantes para la absorción de este elemento (Zeilinger *et al.*, 2016).

Las inoculaciones de microorganismos son un factor por considerar al momento de la siembra, debido a que cuando se trasplanta las raíces ya se encuentran colonizadas por ellos; esto resulta en un sistema de raíces mejor, mayor vigor y crecimiento de la planta (Candellero *et al.*, 2015). Para asegurar la persistencia y colonización es importante hacer más aplicaciones durante el desarrollo del cultivo; porque la colonización implica capacidad de reconocimiento o adherencia en raíces, seguida de una penetración en la planta para resistir metabolitos tóxicos producidos por la misma, en respuesta a una invasión desde las primeras etapas de desarrollo vegetal, por lo que, la dosis de conidios no depende del tamaño de la semilla, sino de la especificidad del efecto de germinación y, por lo tanto, es un área que se debe explorar con mayor profundidad.

Con el propósito de estimar la cantidad necesaria de inoculante para promover el crecimiento de la planta, es importante evaluar el inóculo adecuado de esporas para cada cultivo (Mukherjee *et al.*, 2013). Por último, la inoculación de combinaciones duales o consorcios de microorganismos favorece el crecimiento vegetal, ya que se involucra la naturaleza y la relación de los microorganismos con las plantas. Por lo tanto, comprender cuáles factores ambientales

this results in a better root system, as well as greater vigour and plant growth (Candellero *et al.*, 2015). In order to ensure persistence and colonization, it is important to make more applications during the development of the crop; because colonization implies the ability to recognize or adhere to roots, followed by penetration into the plant to resist toxic metabolites produced by it. This occurs in response to an invasion since early stages of plant growth; therefore, the dose of conidia does not depend on the size of the seed, but on the specificity of the germination effect and, therefore, it is an area that it should be explored in depth.

In order to estimate the necessary amount of inoculant to promote plant growth, it is important to evaluate the appropriate spore inoculum for each crop (Mukherjee *et al.*, 2013). Finally, the inoculation of dual combinations or consortiums of microorganisms favours plant growth, since the nature and relationship of microorganisms with plants are involved. Therefore, knowing which environmental factors limit the performance of these inoculants will be very useful to improve their efficiency as biostimulants (Xiang *et al.*, 2012). This is the first report of dual applications of *Trichoderma* species isolates in the state of Yucatan, with a growth-promoting effect on *C. chinense*.

CONCLUSIONS

The dual *in vitro* interactions of *Trichoderma virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) made it possible to select organisms with biostimulant capacity. These *in vivo* combinations promoted plant growth and increased the production of *Capsicum chinense*. The use of this interspecific combination reduced the recommended synthetic fertilization to 50%.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Tecnológico Nacional de México for funding this research through Project No. 10759.21 P, "Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* y detección de genes Epl1 y Sm1 involucrados en la resistencia sistémica inducida" (Antagonism *in vitro* of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* and detection of Epl1 and Sm1 genes involved in induced systemic resistance").

limitan el rendimiento de estos inoculantes será muy útil para mejorar su eficiencia como bioestimulantes (Xiang *et al.*, 2012). Este reporte es el primero de aplicaciones duales de especies *Trichoderma* aisladas en el estado de Yucatán con efecto promotor de crecimiento en *C. chinense*.

CONCLUSIONES

Las interacciones duales *in vitro* de *Trichoderma virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) permitieron seleccionar organismos con capacidad bioestimulante. Estos, en combinaciones *in vivo* promovieron el crecimiento vegetal y aumentaron la producción de *Capsicum chinense*. El uso de esta combinación interespecífica redujo al 50% la fertilización sintética recomendada.

AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México, por el financiamiento de este estudio a través del Proyecto No. 10759.21P, "Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* y detección de genes *Epl1* y *Sm1* involucrados en la Resistencia sistémica inducida".

LITERATURA CITADA

- Ali, A., A. Javaid, A. Shoaib, and I. H. Khan. 2020. Effect of soil amendment with *Chenopodium album* dry biomass and two *Trichoderma* species on growth of chickpea var. Noor 2009 in *Sclerotium rolfii* contaminated soil. The Egyptian Journal of Biological Pest Control 30: 1-9. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00305-1>
- Bansal, R., S. Pachauri, D. Gururajiah, P. D. Sherkhane, Z. Khan, S. Gupta, B. Kaushik, A. Kumar, and P. K. Mukherjee. 2021. Dual role of a dedicated GAPDH in the biosynthesis of volatile and non-volatile metabolites-novel insights into the regulation of secondary metabolism in *Trichoderma virens*. Microbiological Research 253: 126862. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126862>
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA 218 p.
- Candelero, D. J., J. Cristóbal A., A. Reyes R., J. M. Tun S., M. M. Gamboa A., y E. Ruíz S. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. Phytom 84: 113-119.
- Chen, D., Q. Hou, L. Jia, and K. Sun. 2021. Combined use of two *Trichoderma* strains to promote growth of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.). Agronomy 11: 726. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040726>
- Colla, G., R. Youssef, E. Di Mattia, C. El-Nakhel, and M. Cardarelli. 2015. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. Journal of the Science of Food and Agriculture 95: 1706-1715. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
- Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M. Balzarini G., L. Gonzalez, M. Tablada, y C. Robledo W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> (Consulta: octubre 2021).
- Leylaie, S., and D. Zafari. 2018. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from *Vinca* plants. Frontiers in Microbiology 9: 1484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01484>
- Moo-Koh, F. A., J. Cristóbal-Alejo, A. Reyes-Ramírez, J. M. Tun Suárez, y M. Gamboa-Angulo. 2017. Identificación molecular de aislados de *Trichoderma* spp. y su actividad promotora en *Solanum lycopersicum* L. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes 71: 5-11. <https://doi.org/10.33064/iycuaa201771335>
- Moo-Koh, F. A., J. Cristóbal A., A. Reyes A., J. M. Tun S., M. Gamboa A., y I. R. Islas F. 2018. Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum* L. Scientia Fungorum 47: 37-45. <https://doi.org/10.33885/sf.2018.47.1191>
- Mukherjee, K. P., B. A. Horwitz, U. S. Singh, M. Mukherjee, and M. Schmoll. 2013. *Trichoderma* Biology and Applications. British Library. London, UK. 327 p.
- Mukhopadhyay, R., and Kumar, D. 2020. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. The Egyptian Journal of Biological Pest Control 30: 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Ortuño, N., C. Miranda, y M. Claros. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. Journal of the Selva Andina Biosphere 1: 16- 24. <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2013.010100016>
- Ortuño, N., J. A. Castillo, C. Miranda, M. Claros, and X. Soto. 2017. The use of secondary metabolites extracted from *Trichoderma* for plant growth promotion in the Andean highlands. Renewable Agriculture and Food Systems 32: 366-375. <https://doi.org/10.1017/S1742170516000302>
- Sood, M., D. Kapoor, V. Kumar, M. S. Sheteiwy, M. Ramakrishnan, M. Landi, F. Araniti, and A. Sharma. 2020. *Trichoderma*: the "secrets" of a multitasking biocontrol agent. Plants 9: 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>
- Torres, C., M., C. F. Ortiz G., C. Bautista M., J. A. Ramírez P., N. Ávalos C., S. Cappello G., y A. De la Cruz P. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 86: 947- 961. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, H. M. J. Barbetti, H. Li, and M. Lorito. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and Molecular Plant Pathology 72: 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>

- White, T., J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp: 315-322.
- Xiang, W., L. Zhao, X. Xu, Y. Qin, and G. Yu. 2012. Mutual information flow between beneficial microorganisms and the roots of host plants determined the bio-functions of bio-fertilizers. *American Journal of Plant Sciences* 3: 115-1120. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.38134>.
- Zapata, R., M. Quiroga, B. Murillo, D. Agüero, B. Lisi, y P. Mena. 2012. *Trichoderma* spp. biocontrolador y promotor de crecimiento: una alternativa al uso de agroquímicos en cultivos intensivos. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 16: 47-55.
- Zeilinger, S., S. Gruber, R. Bansal, and P. K. Mukherjee. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* e chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* 30: 74-90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

CLASIFICADOR DE RED NEURONAL CONVOLUCIONAL PARA IDENTIFICAR ENFERMEDADES DEL FRUTO DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.) A PARTIR DE IMÁGENES DIGITALES

CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORK CLASSIFIER FOR IDENTIFYING DISEASES OF AVOCADO FRUIT (*Persea americana* Mill.) FROM DIGITAL IMAGES

Ulises Enrique Campos-Ferreira¹, Juan Manuel González-Camacho^{2*}

¹Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, Texcoco 56239, Estado de México, México. ²Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Programa de Socioeconomía, Estadística e Informática-Cómputo Aplicado. Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México, México.

*Autor para correspondencia: Juan Manuel González Camacho (jmgc@colpos.mx).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5479-7316>

RESUMEN

México es el productor principal de aguacate (*Persea americana* Mill.) en el mundo; sin embargo, este fruto en postcosecha es susceptible a hongos fitopatógenos que reducen su calidad. Por ello, la identificación oportuna de estos organismos con base en herramientas no invasivas, como los análisis por medio de inteligencia artificial resulta de interés para reducir pérdidas económicas. El objetivo de este estudio fue implementar un modelo de aprendizaje automático con una base de datos de imágenes digitales de frutos colectados en campo, a través de crear un clasificador de red neuronal convolucional (CNN), entrenarlo y validarlo para identificar frutos sanos de aguacate cv. Fuerte y frutos infectados con roña (*Sphaceloma perseae* Jenkins) o antracnosis (*Colletotrichum* spp.) de la zona productora en el Estado de Morelos, México. Frutos de aguacate sanos se recolectaron en campo, y también frutos con roña y antracnosis de huertos diferentes para generar un conjunto de 569 imágenes digitales. Las transformaciones de éstas aumentaron el conjunto de datos a 3983 imágenes. El modelo CNN se entrenó con una partición aleatoria de 80% de las imágenes y se validó para predicción con el 20% restante. La CNN alcanzó una precisión global de clasificación correcta de 80% con el conjunto de validación. Además, el clasificador se evaluó con un conjunto de prueba de 100 imágenes no incluidas en el conjunto original y obtuvo una precisión global de clasificación correcta de 87%. El clasificador de aprendizaje profundo por CNN implementado en este estudio representa el uso factible de la inteligencia artificial para su aplicación en la identificación de enfermedades en aguacate a partir de imágenes digitales en la etapa de postcosecha.

ABSTRACT

Mexico is the main avocado (*Persea americana* Mill.) producer in the world; however, this fruit is susceptible to phytopathogenic fungi that reduce quality during postharvest. Therefore, the timely identification of these organisms using non-invasive tools, such as artificial intelligence analysis, is of interest to reduce economic losses. The objective of this study was to implement a machine learning model with a database of digital images of fruits collected in the field, by creating a convolutional neural network (CNN) classifier, training and validating it to identify healthy avocado cv. Fuerte fruits and fruits infected with scab (*Sphaceloma perseae* Jenkins) or anthracnose (*Colletotrichum* spp.) from the production area in the State of Morelos, Mexico. Healthy avocado fruits were collected in the field, as well as fruits with the scab and anthracnose from different orchards to generate a set of 569 digital images. Transformations of these increased the dataset to 3983 images. The CNN model was trained with a random partition of 80% of the images and validated for prediction with the remaining 20%. CNN achieved an overall correct classification accuracy of 80% with the validation set. In addition, the classifier was evaluated with a test set of 100 images not included in the original set and achieved an overall correct classification accuracy of 87%. The CNN deep learning classifier implemented in this study represents the feasible use of artificial intelligence for application in avocado disease identification from digital images at the postharvest stage.

Key words: artificial intelligence, artificial vision, pattern recognition, deep learning, *Persea americana*, *Sphaceloma perseae*.

Recibido: febrero, 2021. Aprobado: noviembre, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 695-709. 2021.

Palabras clave: inteligencia artificial, visión artificial, reconocimiento de patrones, aprendizaje profundo, *Persea americana*, *Sphaceloma perseeae*.

INTRODUCCIÓN

México es el principal productor de aguacate (*Persea americana* Mill.) en el mundo, con una producción anual de 2 393 000 Mg (SIAP, 2020) que satisface totalmente la demanda interna nacional (SAGARPA, 2017). El cultivo de aguacate es atacado por dos enfermedades muy frecuentes que afectan la calidad del fruto, la antracnosis ocasionada por hongos del género *Colletotrichum*, y la roña o sarna del fruto causada por el hongo *Sphaceloma perseeae* (Paull y Duarte, 2011). El manejo inadecuado del cultivo puede originar pérdidas por enfermedades fungosas hasta de 71% antes de la cosecha, que pueden alcanzar el 100% durante el almacenamiento del fruto (Dann *et al.*, 2013).

El aguacate variedad Fuerte es resultado de la hibridación de las razas Mexicana y Guatemalteca y se considera como la primera variedad comercial de excelencia en el mundo. A pesar de haber perdido popularidad ante la variedad Hass, se cultiva en ciertas regiones de México como en los estados de Morelos, Puebla y Oaxaca. Esta variedad es una fuente excelente para polinizar Hass y tolera temperaturas bajas (Crane *et al.*, 2013). En términos de producción, se tiene un registro de 14 municipios como productores de esta variedad de aguacate los cuales producen 5740 Mg anuales (SIAP, 2021).

De manera tradicional, técnicos expertos identifican las enfermedades a través de la inspección visual del tejido de la planta. Estos procedimientos son costosos y poco prácticos para su aplicación generalizada (Dhakal y Shakya, 2018). La disponibilidad y desarrollo de sistemas automatizados para identificar y diagnosticar enfermedades de las plantas ofrece un apoyo valioso a los agrónomos para efectuar diagnósticos, a través de la observación con dispositivos ópticos del tejido infectado de la planta (Ferentinos, 2018).

Estudios diversos reportan el uso de técnicas, como el reconocimiento de patrones, procesamiento de imágenes, aprendizaje automático y aprendizaje profundo para identificar enfermedades en plantas (Türkoğlu y Hanbay, 2019; Harpale *et al.*, 2020; Loey *et al.*, 2020). Estos enfoques contemporáneos

INTRODUCTION

Mexico is the leading producer of avocado (*Persea americana* Mill.) in the world, with an annual production of 2 393 000 Mg (SIAP, 2020) that fully satisfies domestic demand (SAGARPA, 2017). Avocado in cultivation is attacked by two very frequent diseases that affect fruit quality, anthracnose, caused by fungi of the *Colletotrichum* genus, and the avocado scab caused by the fungus *Sphaceloma perseeae* (Paull and Duarte, 2011). Improper crop management can cause losses due to fungal diseases of up to 71% preharvest, which can reach 100% during fruit storage (Dann *et al.*, 2013).

The Fuerte avocado variety is the result of the hybridization of the Mexican and Guatemalan races and is considered the first commercial variety of excellence in the world. Although it has lost popularity to the Hass variety, it is cultivated in certain regions of Mexico such as the states of Morelos, Puebla and Oaxaca. This variety is an excellent source for pollinating Hass and tolerates low temperatures (Crane *et al.*, 2013). In terms of production, 14 municipalities are registered as producers of this avocado variety, which produce 5740 Mg annually (SIAP, 2021).

Traditionally, expert technicians identify diseases through visual inspection of plant tissue. These procedures are costly and impractical for widespread application (Dhakal and Shakya, 2018). The availability and development of automated systems to identify and diagnose plant diseases offers valuable support to agronomists in making diagnoses, through observation with optical devices of infected plant tissue (Ferentinos, 2018).

Diverse studies report the use of techniques, such as pattern recognition, image processing, machine learning and deep learning to identify plant diseases (Türkoğlu and Hanbay, 2019; Harpale *et al.*, 2020; Loey *et al.*, 2020). These contemporary approaches facilitate disease identification from captured crop images. For this purpose, relevant features of the images are used to extract information from the plants of interest (Brahimi *et al.*, 2018).

Mohanty *et al.* (2016) implemented the use of deep learning algorithms to identify diseases of various crops from a public database (PlantVillage dataset) and in some crops achieved an overall

facilitan la identificación de enfermedades a partir de imágenes capturadas de los cultivos. Para ello, se utilizan características relevantes de las imágenes para extraer información de las plantas de interés (Brahimi *et al.*, 2018).

Mohanty *et al.* (2016) implementaron el uso de algoritmos de aprendizaje profundo para identificar enfermedades de varios cultivos a partir de una base de datos pública (PlantVillage dataset) en algunos cultivos alcanzaron una precisión global en predicción de 99%. Toda y Okura (2018) mostraron la importancia de las redes neuronales convolucionales para la detección automática de enfermedades con conjuntos de datos de acceso público con base en características de color y textura de plantas. Thangaraj *et al.* (2020) reportaron la aplicación de un clasificador de aprendizaje profundo para detectar enfermedades en aguacate con una precisión global de clasificación correcta de 96%.

El objetivo de este estudio fue implementar un modelo de aprendizaje profundo con una base de datos de imágenes digitales de frutos colectados en campo, a través de crear un clasificador de red neuronal convolucional (CNN), entrenarlo y validarlo para identificar frutos sanos de aguacate cv. Fuerte y frutos infectados con roña (*Sphaceloma perseae* Jenkins) o antracnosis (*Colletotrichum* spp.) provenientes de la zona productora de aguacate en el Estado de Morelos, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental y colecta del material vegetativo

Para crear la base de datos de imágenes digitales, se realizó una colecta de frutos de aguacate sanos y con las dos enfermedades de interés, en la zona oriente del estado de Morelos, en los municipios de Ocuituco (18° 51' 47.6" N 98° 46' 49.1" O) y Tetela del Volcán (18° 53' 36.3" N 98° 43' 47.7" O). Esta zona es la región productora de aguacate variedad Fuerte más importante de México y comparte condiciones geográficas y climatológicas similares con su centro de origen en Atlixco, Puebla.

En este estudio se seleccionó la variedad de aguacate Fuerte debido a que el fruto presenta una coloración verde durante toda su etapa de desarrollo, a diferencia de la variedad Hass que cambia del color verde a negro cuando madura. Esta característica de la variedad Fuerte contrasta con las enfermedades que se presentan en el fruto y facilita su reconocimiento con base en imágenes transformadas al espacio de color RGB, y un clasificador de red neuronal convolucional.

prediction accuracy of 99%. Toda and Okura (2018) showed the importance of convolutional neural networks for automatic disease detection with publicly available datasets based on color and texture characteristics of plants. Thangaraj *et al.* (2020) reported the application of a deep learning classifier to detect diseases in avocado with an overall correct classification accuracy of 96%.

The objective of this study was to implement a deep learning model with a database of digital images of fruits collected in the field, by creating a convolutional neural network (CNN) classifier, training and validating it to identify healthy fruits of avocado cv. Fuerte and fruits infected with scab (*Sphaceloma perseae* Jenkins) or anthracnose (*Colletotrichum* spp.) from the production area of avocado in the State of Morelos, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Experimental site and vegetative material collection

To create the digital image database, healthy avocado fruit with the two diseases of interest were collected in the eastern zone of the state of Morelos, in the municipalities of Ocuituco (18° 51' 47.6" N 98° 46' 49.1" W) and Tetela del Volcán (18° 53' 36.3" N 98° 43' 47.7" W). This area is the most important avocado producing region in Mexico and shares similar geographic and climatological conditions with its center of origin in Atlixco, Puebla.

In this study, the Fuerte avocado variety was selected because the fruit has a green color throughout its development stage, unlike the Hass variety, which changes from green to black when ripe. This characteristic of the Fuerte variety contrasts with the diseases present in the fruit and facilitates its recognition based on images transformed to RGB colour space and a convolutional neural network classifier.

Fruit collection at the Ocuituco site was made in commercial orchards, backyard orchards and orchards with low agricultural activity. Healthy fruit, and with anthracnose or scab, at physiological and commercial maturity were selected. Fruit collection at the Tetela del Volcán site was purchased at an arbitrary point of sale in the main square; 320 avocado fruits were collected, approximately 80 kg weight.

Capturing images of avocado fruits

Digital images of avocado fruits were obtained in a semi-professional PULUZ® brand studio box with integrated LED lighting in a Nikon® model D3400 digital camera. The images

La colecta de frutos en el sitio de Ocuituco se realizó en huertos comerciales, de traspatio y con actividad agrícola baja; se seleccionaron frutos sanos, con antracnosis y roña, en madurez fisiológica y comercial. La colecta de frutos en el sitio de Tetela del Volcán se llevó a cabo en un punto de venta arbitrario de la plaza principal; se colectaron 320 frutos de aguacate con un peso aproximado de 80 kg.

Captura de imágenes de los frutos de aguacate

Las imágenes digitales de los frutos de aguacate se obtuvieron en una caja de estudio semi profesional marca PULUZ® con iluminación LED integrada con una cámara digital Nikon® modelo D3400. Las imágenes se tomaron sobre el fruto en el plano horizontal, la cámara se colocó arriba en el orificio superior de la caja de estudio y se fijó por medio de un trípode. Condiciones similares de espacio y de la cámara se definieron para homogeneizar la calidad de las imágenes y su representación en el espacio de color RGB (Cuadro 1).

A cada fruto se le capturó al menos una imagen, y a ésta se le asoció una de las tres clases objetivo, S para frutos sano, R para roña o A para antracnosis. Cuando el fruto tenía más de una característica de interés (por ejemplo, dos enfermedades) se tomaron imágenes complementarias. La utilidad DigiCamControl se utilizó para controlar la cámara en forma remota desde la computadora para almacenamiento directo de las fotografías digitales; se obtuvieron 569 imágenes digitales primarias (Figura 1).

Preprocesamiento e incremento de imágenes

Las imágenes originales de 4496 x 3000 píxeles se redimensionaron a 300 x 300 píxeles de resolución para reducir requerimientos de memoria y de cálculo. El programa IrfanView® se utilizó para recortar las imágenes y transferirlas a un lote completo.

Después, las imágenes se homogeneizaron con un fondo blanco, con el editor de fotografías Photoshop®. IrfanView® se utilizó para aumentar el número de imágenes; se generaron imágenes transformadas en forma horizontal, vertical y rotadas 90 y 180°. Con este procedimiento, la base de datos se incrementó a 3983 imágenes, las cuales se utilizaron para entrenar y validar el desempeño del clasificador CNN. Las imágenes se etiquetaron con un nombre secuencial: Avocado 0001.jpg, Avocado 0002, ... Avocado 3983.jpg, como la última fotografía (Figura 2).

Las tres clases objetivo S, A y R se recodificaron con sus vectores unitarios respectivos (1,0,0), (0,1,0) y (0,0,1) para su tratamiento numérico.

Entrenamiento y validación del clasificador CNN

El clasificador CNN se implementó en la plataforma de modelación Keras y Tensorflow en lenguaje Python v. 3.7 y entorno

Cuadro 1. Condiciones de captura de imágenes digitales de los frutos de aguacate.

Table 1. Conditions for digital images capture of avocado fruits.

Características del espacio	Datos
Dimensiones de la caja de estudio	22 x 24 x 23 cm
Intensidad de luz	450 lm
Fondo	Blanco
Colocación del fruto	Al centro
Características de la cámara	Datos
Extensión de archivo	jpg
Dimensiones	4496 x 3000 px
Relación de aspecto	4:3
Apertura del diafragma	f / 3.8
Velocidad de obturación	1 / 100 s
Valor ISO	200
Distancia focal	24 mm
Compensación de exposición	0 paso
Uso de flash incorporado	No

were taken on the fruit in the horizontal plane, the camera was placed on top in the upper hole of the studio box and fixed by means of a tripod. Similar space and camera conditions were defined to homogenize the quality of the images and their representation in RGB colour space (Table 1).

At least one image was captured for each fruit, and it was associated to any of the three target classes, S for healthy fruit, R for scab, or A for anthracnose, as it was the case. When the fruit had more than one characteristic of interest (*e.g.*, two diseases), complementary images were taken. The DigiCamControl utility was used to control the camera remotely from the computer for direct storage of the digital photographs; 569 primary digital images were obtained (Figure 1).

Pre processing and additions to the image database

The original 4496 x 3000 pixels images were resized to 300 x 300 pixels resolution to reduce memory and computational requirements. The IrfanView® program was used to crop the images into a complete batch.

The images were then homogenized with a white background using Photoshop® photo editor. IrfanView® was used to increase the number of images; transformed images were generated horizontally, vertically and rotated 90 and 180°. With this procedure, the database was increased to 3983 images, which

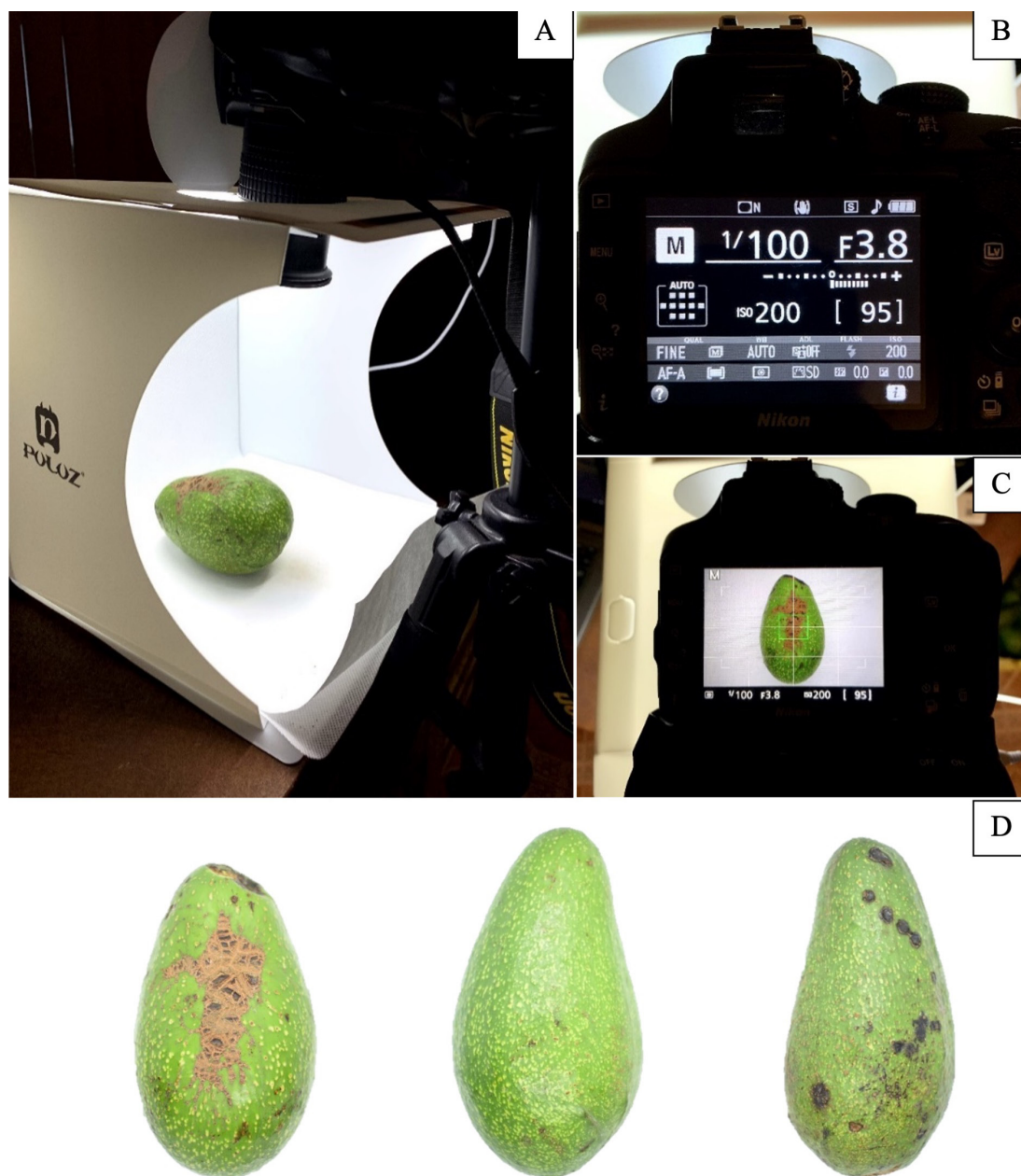


Figura 1. Condiciones de digitalización de los frutos de aguacate. A: fruto dentro de la caja de estudio, arriba de ésta se instaló la cámara fotográfica; B: metadatos de la cámara fotográfica; C: previsualización de la imagen; D: imágenes digitales de frutos.

Figure 1. Conditions of digitization of avocado fruits. A: fruit inside the study box, on top of which the camera was installed; B: camera metadata; C: image preview; D: digital images of fruits.

de desarrollo Jupyter Notebook® v. 6.0.1 (Chollet, 2018). El entrenamiento y validación del clasificador CNN se realizó con una computadora portátil con Windows 10, Intel® Core i3, velocidad de procesamiento 2.20 GHz y 20 GB en RAM. El conjunto de datos de entrada consistió en 3983 imágenes de 300 x 300 píxeles; como se indicó, a cada imagen se le asoció su clase objetivo (S, R, o A).

were used to train and validate the performance of the CNN classifier. The images were labelled with a sequential name: Avocado 0001.jpg, Avocado 0002, ... Avocado 3983.jpg, as the last photograph (Figure 2).

The three target classes S, A and R were recoded with their respective unit vectors (1,0,0), (0,1,0) and (0,0,1) for numerical processing.

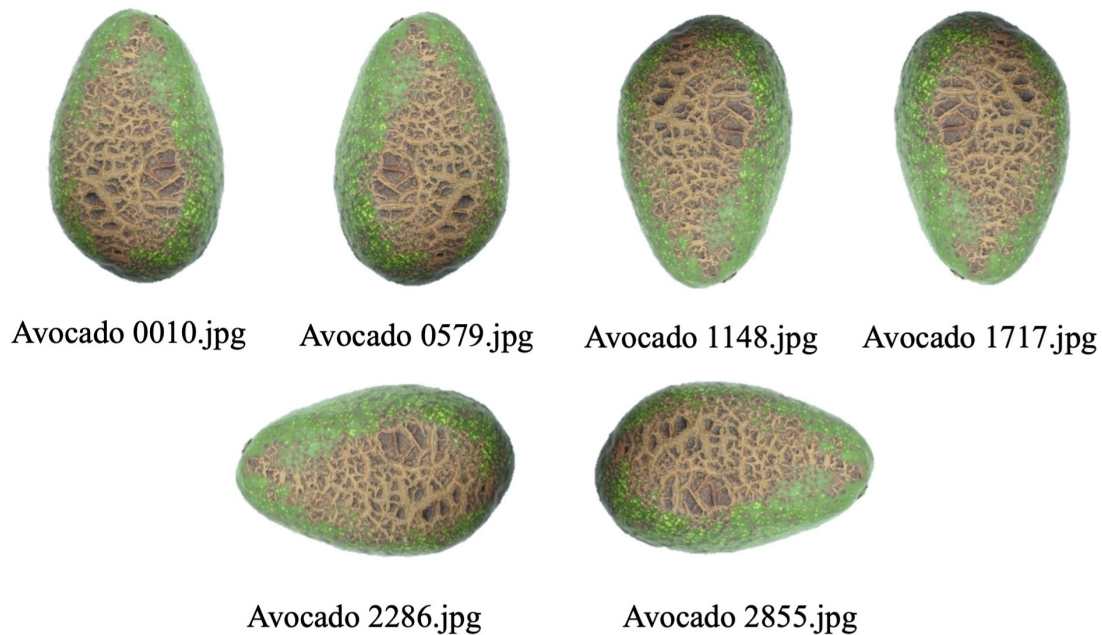


Figura 2. Imágenes transformadas en posiciones distintas del fruto de aguacate digitalizado y almacenadas con nombres diferentes.

Figure 2. Images transformed from the digitized avocado fruit, in distinct positions and stored under different names.

Arquitectura del clasificador CNN

La arquitectura básica del modelo CNN para resolver un problema de clasificación multiclase se configuró con los hiperparámetros (Figura 3): *sequential* para conectar las capas de neuronas ocultas; *conv2D* para realizar convoluciones y extraer características; *MaxPooling2D* para extraer los vectores de mayor ponderación y crear una submuestra de la imagen; *flatten* para convertir los arreglos bidimensionales a unidimensionales; y *dense* para conectar por completo las neuronas con las siguientes; *dropout* para desactivar un porcentaje específico de neuronas y reducir el sobreajuste del clasificador; y una capa de salida con tres neuronas para las clases objetivo S, R, y A.

En cada capa convolucional se utilizó la función de activación *ReLU* (Rectified linear unit), definida por:

$$\text{ReLU}(z) = \max(0, z) = \begin{cases} 0 & \text{para } x < 0 \\ x & \text{para } x \geq 0 \end{cases}$$

ReLU transforma los valores de entrada, anula los valores negativos y deja los positivos, tal y como entran. En el procesamiento de imágenes, los valores negativos no son relevantes; por lo tanto, el número de neuronas conectadas con la siguiente capa oculta se redujo.

CNN classifier training and validation

The CNN classifier was implemented on the Keras and Tensorflow modelling platform in Python v. 3.7 language and the Jupyter Notebook® v. 6.0.1 development environment (Chollet, 2018). The training and validation of the CNN classifier was performed with a notebook computer Windows 10, Intel® Core i3, 2.20 GHz processing speed and 20 GB RAM. The input dataset consisted of 3983 images of 300 x 300 pixels; as it was described, each image was associated with its target class (S, R, or A).

CNN classifier architecture

The basic architecture of the CNN model to solve a multiclass classification problem was configured with the hyperparameters (Figure 3): *sequential* to connect the hidden neuron layers; *conv2D* to perform convolutions and extract features; *MaxPooling2D* to extract the highest weighted vectors and create a subsample of the image; *flatten* to convert the two-dimensional arrays to one-dimensional; and *dense* to fully connect the neurons to the following neurons; *dropout* to disable a specific percentage of neurons reducing classifier overfitting; and an output layer with three neurons for the target classes S, R, and A.

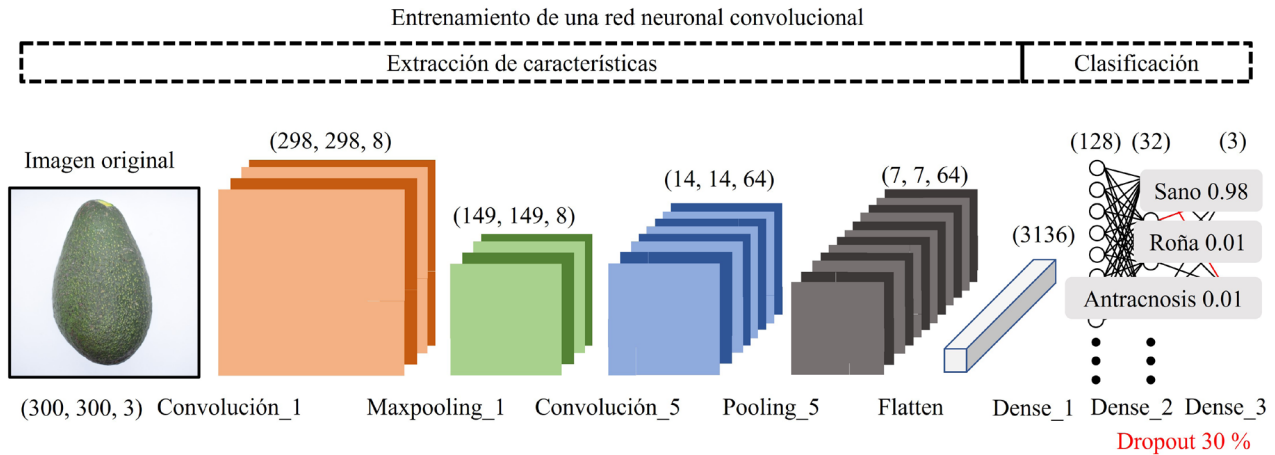


Figura 3. Arquitectura del clasificador de red neuronal convolucional (CNN). La imagen original representada como un arreglo pasa por varios filtros de convolución y *pooling* para capturar información relevante y reducir el tamaño del arreglo. La última capa de *pooling* se transforma en un vector que conecta a tres capas densas de neuronas para generar las respuestas. Los números entre paréntesis representan el ancho, largo y profundidad de los arreglos.

Figure 3. Convolutional neural network (CNN) classifier architecture. The original image represented as an array passes through several convolution and pooling filters to capture relevant information and reduce the array size. The last pooling layer is transformed into a vector connecting three dense layers of neurons to generate the responses. The numbers in parentheses represent the width, length and depth of the arrays.

Para la capa de salida se utilizó la función de activación *Softmax* que asigna una probabilidad de pertenencia a cada clase y se define como:

$$\text{Softmax}(x)_i = \frac{e^{x_i}}{\sum_{j=1}^K e^{x_j}}$$

donde x es un vector de entrada con valores reales (positivo, cero, o negativo); la función exponencial estándar e^{x_i} se aplica a cada elemento del vector de entrada y se divide por $\sum_{j=1}^K e^{x_j}$ para obtener valores en el intervalo $[0, 1]$. Este término de normalización asegura que los valores que entran a la función *Softmax* sumen 1 y que cada valor de probabilidad se encuentre entre 0 y 1; y K es el número de clases objetivo del clasificador.

Las funciones de pérdida *binary_crossentropy* y *categorical_crossentropy* y los optimizadores *adam* (adaptive moment estimation) y *adamax* se utilizaron para estimar los parámetros del clasificador CNN estos hiperparámetros se utilizan con frecuencia en problemas de clasificación multiclase.

Entrenamiento del clasificador CNN

Particiones aleatorias de la base de datos se realizaron; 80% (3186 imágenes) para el entrenamiento y 20% (797 imágenes) para la validación del clasificador CNN. El conjunto de validación consistió en 336 imágenes (clase S), 252 (clase R) y 209

The activation function (Rectified linear unit) was used in each convolutional layer, defined by:

$$\text{ReLU}(z) = \max(0, z) = \begin{cases} 0 & \text{para } x < 0 \\ x & \text{para } x \geq 0 \end{cases}$$

ReLU transforms the input values, cancels the negative values and leaves the positive values as they enter. In image processing, negative values are not relevant; therefore, the number of neurons connected to the next hidden layer was reduced.

For the output layer, the *Softmax* activation function was used, which assigns a probability of belonging to each class and is defined as follows:

$$\text{Softmax}(x)_i = \frac{e^{x_i}}{\sum_{j=1}^K e^{x_j}}$$

where x is an input vector with real values x_i (positive, zero, or negative); the standard exponential function e^{x_i} is applied to each element of the input vector and is divided by $\sum_{j=1}^K e^{x_j}$ to obtain values in the interval $[0, 1]$ This standardization term ensures that the values entering the *Softmax* function add up to 1; and that each probability value lies between 0 and 1; and K is the number of target classes of the classifier.

The loss functions *binary_crossentropy* and *categorical_crossentropy* and the optimizers *adam* (adaptive moment

(clase A). En el entrenamiento del modelo se utilizó un procesamiento por lotes de 128 muestras de imágenes y 25 iteraciones (epochs). También se consideraron 100 imágenes suplementarias, no incluidas en el entrenamiento y validación del modelo CNN, para evaluar su capacidad predictiva con entradas nuevas de datos. Los pesos del clasificador se inicializaron de manera aleatoria.

Métricas de desempeño del clasificador CNN

Para evaluar la capacidad predictiva del clasificador CNN se utilizaron métricas que se definen en términos de una matriz de confusión, la cual se describe para el caso de una respuesta binaria con cuatro valores: verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP), y falsos negativos (FN). Las métricas definidas en términos de la matriz de confusión fueron las siguientes:

La precisión (P) se define por:

$$P = \frac{VP}{VP + FP}$$

La exhaustividad (E) se calcula por:

$$E = \frac{VP}{VP + FN}$$

La métrica $F1_s$ es una combinación de P y E y se calcula como:

$$F1_s = 2 * \frac{P * E}{P + E}$$

Las métricas P , E y $F1_s$, permiten evaluar el desempeño del clasificador para cada clase objetivo. La precisión global de clasificación (PG) se calcula por:

$$PG = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entrenamiento y validación del modelo

El entrenamiento del modelo CNN tuvo un tiempo de ejecución promedio de tres horas. Durante el entrenamiento se analizaron las curvas de desempeño

(estimation) and *adamax* were used to estimate the parameters of the CNN classifier; these hyperparameters are frequently used in multiclass classification problems.

CNN classifier training

Random partitions of the database were performed; 80% (3186 images) for training and 20% (797 images) for validation of the CNN classifier. The validation set consisted of 336 (class S), 252 (class R) and 209 (class A) images. Batch processing of 128 image samples and 25 iterations (epochs) was used in the model training. Also, 100 supplementary images, not included in the training and validation of the CNN model, were considered to evaluate its predictive capability with new data inputs. The classifier weights were randomly initialized.

CNN classifier performance metrics

To evaluate the predictive ability of the CNN classifier, metrics were used that are defined in terms of a confusion matrix, which is described for the case of a binary response with four values: true positives (VP), true negatives (VN), false positives (FP) and false negatives (FN). The metrics defined in terms of the confusion matrix were as follows:

Precision (P) is defined by:

$$P = \frac{VP}{VP + FP}$$

Recall (E) is calculated by:

$$E = \frac{VP}{VP + FN}$$

The $F1_s$ metrics is a combination of P and E , it is calculated as:

$$F1_s = 2 * \frac{P * E}{P + E}$$

Metrics P , E and $F1_s$, allow to evaluate the performance of the classifier for each target class. The overall classification accuracy (PG) is calculated by:

$$PG = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

del modelo CNN en entrenamiento y validación (Figura 4). Estas curvas permiten dar seguimiento sistematizado a las tendencias de la evolución de precisión global de clasificación, y a la pérdida o error del modelo en función del número de iteraciones. El modelo CNN obtuvo una *PG* de 89% en entrenamiento y *PG* de 87% en validación después de 25 iteraciones con el optimizador *adam* y función de pérdida *binary_crossentropy* (Figura 4-A).

En cambio, el clasificador CNN alcanzó una *PG* de 0.70 en entrenamiento y validación con el optimizador *adamax* y función de pérdida *categorical_crossentropy* (Figura 4-C). De manera similar, CNN obtuvo una pérdida de 0.25 en entrenamiento y de 0.30 en validación con el optimizador *adam* y *binary_crossentropy* (Figura 4-B), y de 0.70 con el optimizador *adamax* y *categorical_crossentropy* (Figura 4-D).

La matriz de confusión muestra los resultados de validación (predicción) del clasificador CNN. La

RESULTS AND DISCUSSION

Model training and validation

The training of the CNN model had an average run time of three hours. During training, the performance curves of the CNN model during training and validation were analysed (Figure 4). These curves allow monitoring of the trends in the evolution of the overall classification accuracy, and the loss or error of the model as a function of the number of iterations. The CNN model obtained a *PG* of 89% in training and *PG* of 87% in validation after 25 iterations with the *adam* optimizer and *binary_crossentropy* loss function (Figure 4-A).

In contrast, the CNN classifier achieved a *PG* of 0.70 in training and validation with the *adamax* optimizer and *categorical_crossentropy* loss function (Figure 4-C). Similarly, CNN obtained a loss of 0.25

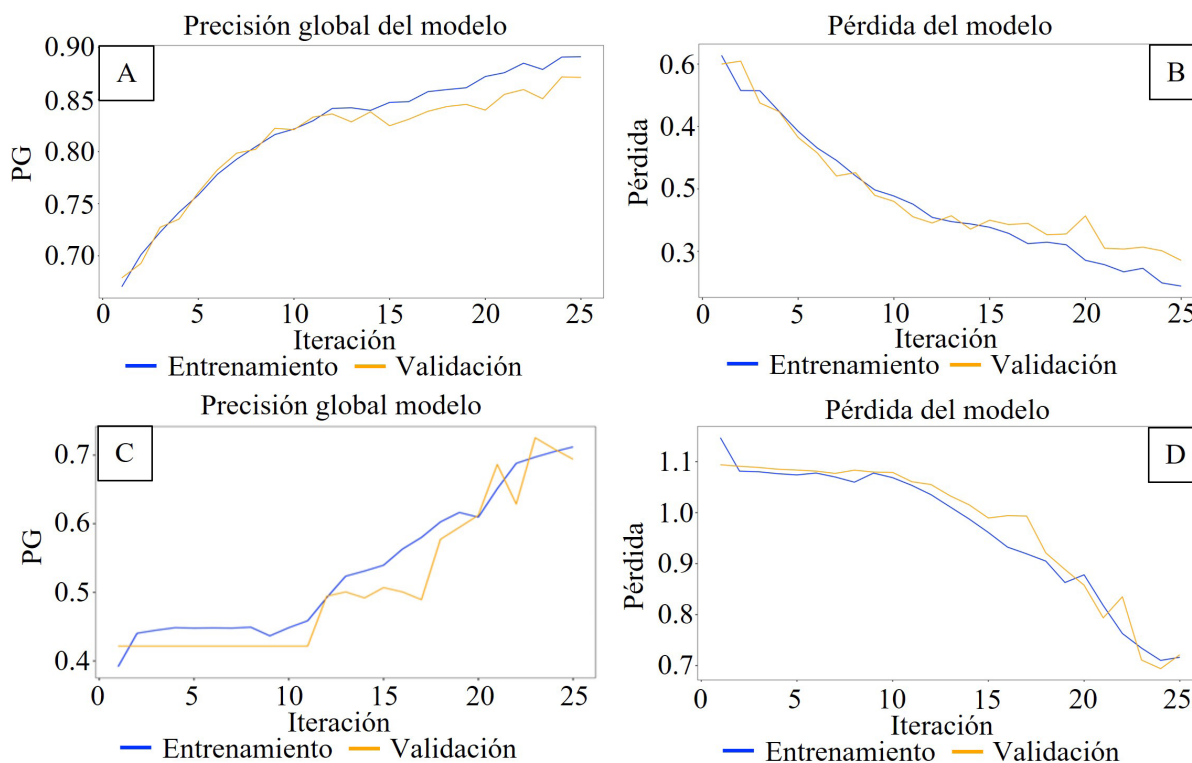


Figura 4. Comparación del desempeño del clasificador CNN en el entrenamiento y validación de la precisión global de clasificación correcta (*PG*) y la pérdida en función del número de iteraciones, con diferentes hiperparámetros. En A y B se utilizaron el optimizador *adam* y *binary_crossentropy*; en C y D, *adamax* y *categorical_crossentropy*.

Figure 4. Comparison of CNN classifier performance in training and validation of the overall classification accuracy (*PG*) and loss as a function of the number of iterations, with different hyperparameters. In A and B, the *adam* optimizer y *binary_crossentropy* was used; in C and D, *adamax* and *categorical_crossentropy*.

clase A obtuvo los errores de predicción mayores debido a que frutos con antracnosis se clasificaron como sanos. La mayor cantidad de *FP* y *FN* se presentaron en las clases S y A. Esto es, imágenes de frutos con A se clasificaron como S y *viceversa* (Figura 5).

La antracnosis presenta dos tipos de síntomas; el primero son lesiones protuberantes, pequeñas, de color negro, y el segundo son áreas grandes, dañadas en forma dispersa, resultado de la infección en el fruto (Trinidad *et al.*, 2017). En este estudio, la mayoría de las imágenes de frutos con antracnosis son del primer tipo, en etapas tempranas de la enfermedad; por ello, presentaron similitud con los frutos sanos. El total de muestras por clase (S: 336, R: 252, y A: 209) mostró un desbalance entre clases (Figura 5).

Las métricas de desempeño en predicción del modelo CNN *P*, *E*, *F1_s*, para cada clase objetivo (S, R y A) y *PG* se registraron. El clasificador CNN obtuvo *P* = 92% para identificar la clase R y *P* = 72% para la clase A. La clase R obtuvo un *F1_score* de 91%, lo que indica un buen desempeño de CNN para identificar la

in training and 0.30 in validation with the *adam* optimizer and *binary_crossentropy* (Figure 4-B), and 0.70 with the *adamax* optimizer and *categorical_crossentropy* (Figure 4-D).

The confusion matrix shows the validation (prediction) results of the CNN classifier. Class A had the highest prediction errors because fruit with anthracnose were classified as healthy. The highest number of *FP* and *FN* occurred in classes S and A. That is, images of fruits with A were classified as S and *vice versa* (Figure 5).

Anthracnose presents two types of symptoms; the first are protruding, small, black lesions, and the second are large, scattered damaged areas resulting from infection in the fruit (Trinidad *et al.*, 2017). In this study, most of the images of fruits with anthracnose are of the first type, in early stages of the disease; therefore, they presented similarity with healthy fruits. The total number of samples per class (S: 336, R: 252, and A: 209) showed an imbalance among classes (Figure 5).

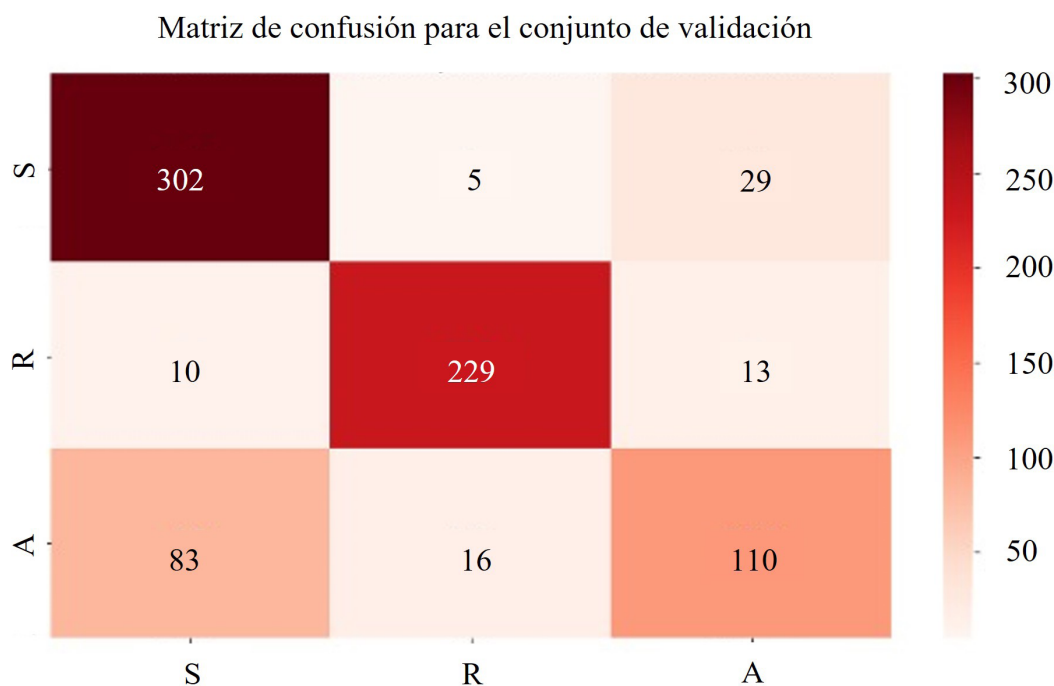


Figura 5. Matriz de confusión del desempeño en predicción del modelo CNN con el conjunto de validación. Clases objetivo A (antracnosis), R (roña) y S (sanos); filas representan clases observadas y columnas clases predichas. La escala de color aumenta en intensidad de color respecto al número de muestras clasificadas por clase objetivo.

Figure 5. Confusion matrix of the prediction performance of the CNN model with the validation set. Target classes A (anthracnose), R (scab) and S (healthy); rows represent observed classes and columns predicted classes. The colour scale increases in colour intensity in regard to the number of samples classified by target class.

roña. $PG = 80\%$ indica un desempeño aceptable para identificar las tres clases objetivo (Cuadro 2).

Cuando existe un desbalance entre clases en los datos de entrenamiento, los modelos sobre clasifican la clase mayoritaria (frutos sanos). Como resultado, los datos que pertenecen a la clase minoritaria A se clasifican erróneamente con mayor frecuencia que los pertenecientes a la clase S. El desbalance entre clases induce entonces un desempeño menor del clasificador. Además, la métrica de evaluación P resulta alta y sesga el desempeño del clasificador. Sin embargo, el uso de la métrica $F1_s$ es un estimador más conservador del desempeño del clasificador (Johnson y Khoshgoftaar, 2019); para el caso de la clase A, $F1_s$ fue 0.61.

El clasificador se evaluó en predicción con un conjunto prueba de 100 imágenes no utilizadas en el entrenamiento ni en validación del clasificador CNN. Los resultados se describen en una matriz de confusión (Figura 6) y con las métricas para evaluar desempeño (Cuadro 3).

En este caso el clasificador alcanzó una $PG = 87\%$ que muestra un buen desempeño en predicción; sin embargo, el modelo obtuvo $P = 57\%$ para la clase A, la cual refleja el efecto del desbalance entre clases para la clase A con menor número de muestras. El modelo mostró eficacia mayor para identificar la clase R, luego la clase S y por último la clase A. El valor de $F1_s = 0.66$ pondera la diferencia en el desempeño del clasificador CNN entre P y E .

Los resultados de la predicción del clasificador CNN se ilustran con ocho imágenes del conjunto de

The prediction performance metrics of the CNN model P , E , $F1_s$, for each target class (S, R and A) and PG were recorded. The CNN classifier obtained $P = 92\%$ for identifying the class R and $P = 72\%$ for the class A. The R class obtained a $F1_{score} = 91\%$, which indicates a good performance of CNN for identifying scab. $PG = 80\%$ indicates an acceptable performance for identifying the three target classes (Table 2).

When there is an imbalance between classes in the training data, the models overclassify the majority class (healthy fruit). As a result, data belonging to the minority class A are misclassified more frequently than those belonging to the class S. The imbalance among classes then induces lower classifier performance. In addition, the evaluation metric P shift to be high and biases the classifier performance. However, using the metric $F1_s$ is a more conservative estimator of classifier performance (Johnson and Khoshgoftaar, 2019); for the case of class A, $F1_s$ was 0.61.

The classifier was evaluated in prediction with a test set of 100 images not used in training nor in validation of the CNN classifier. Results are described in a confusion matrix (Figure 6) and with the metrics to evaluate performance (Table 3).

In this case the classifier achieved a $PG = 87\%$ which shows a good prediction performance. However, the model obtained $P = 57\%$ for class A, which reflects the effect of the imbalance between classes for class A with fewer samples. The model showed higher efficiency in identifying the R class, then the S class and finally the A class. The

Cuadro 2. Métricas de desempeño en predicción del modelo de red neuronal convolucional (CNN) con el conjunto de validación.
Table 2. Prediction performance metrics of the convolutional neural network (CNN) model on the validation set.

Clases	Métricas			
	P	E	$F1_s$	n
S	0.76	0.90	0.83	336
R	0.92	0.91	0.91	252
A	0.72	0.53	0.61	209
PG	0.80			

P es la precisión; E es la exhaustividad; $F1_s$ es la media armónica de P y E ; n es el número de imágenes; PG es la precisión global de clasificación correcta; clases S (sano), R (roña) y A (antracnosis). ♦ P , precision; E , recall; $F1_s$, the harmonic mean of P and E ; n , number of images; PG , the overall classification accuracy; classes S (healthy), R (scab) and A (anthracnose).

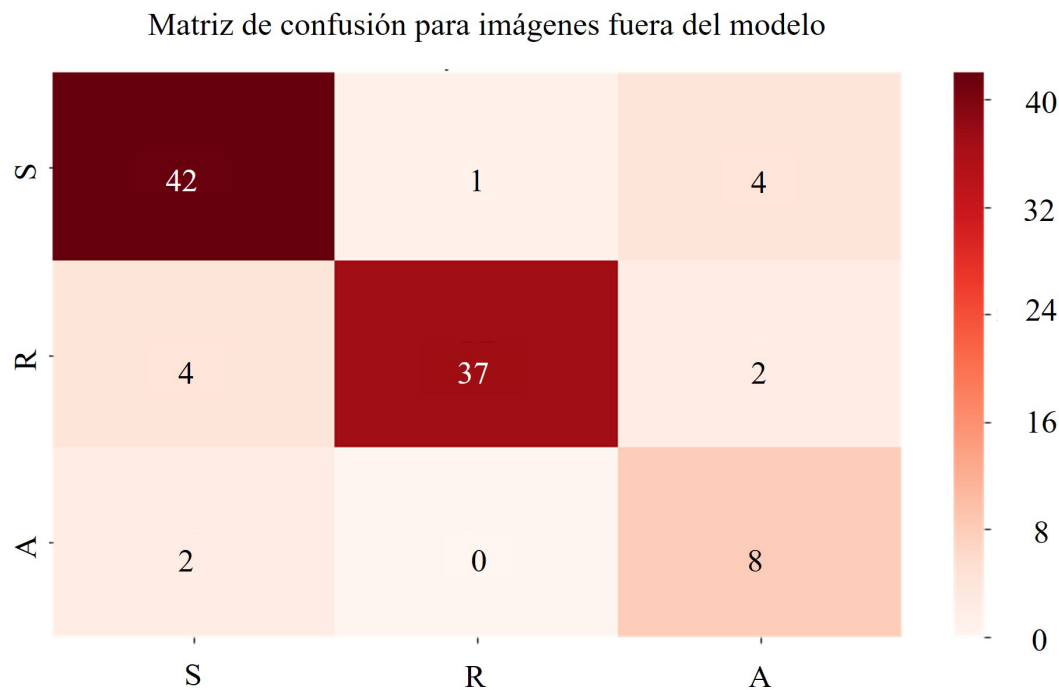


Figura 6. Matriz de confusión de predicción con 100 imágenes no vistas por el modelo; filas representan clases observadas y columnas clases predichas. Clases S, sano; R, roña; y A, antracnosis. La escala indica a mayor intensidad de color, mayor frecuencia de clasificación.

Figure 6. Prediction confusion matrix with 100 images not seen by the model; rows represent observed classes and columns represent predicted classes. Classes: S, healthy; R, scab; and A, anthracnose. The scale indicates the higher the colour intensity, the higher the frequency of classification.

Cuadro 3. Métricas de desempeño en predicción del modelo de red neuronal convolucional (CNN) obtenidas con el conjunto de prueba de 100 imágenes no incluidas en el modelo.

Table 3. Prediction performance metrics of the convolutional neural network (CNN) model, obtained with the test set of 100 images not included in the model.

Clases	Métricas			
	<i>P</i>	<i>E</i>	<i>F1_s</i>	<i>n</i>
S	0.84	0.89	0.86	47
R	0.97	0.86	0.91	43
A	0.57	0.8	0.66	10
<i>PG</i>	0.87			

P es la precisión; *E* es la exhaustividad; *F1_s* es la media armónica de *P* y *E*; *n* es el número de imágenes; *PG* es la precisión global. Las clases S (sano), R (roña) y A (antracnosis). ♦ *P*, precision; *E*, recall; *F1_s*, the harmonic mean of *P* and *E*; *n*, number of images; *PG*, the overall classification accuracy. The classes S (healthy), R (scab) and A (anthracnose).

validación y ocho imágenes del conjunto de prueba. En texto negro se describen imágenes con clasificación correcta y la probabilidad de pertenencia a cada clase objetivo, y en texto rojo imágenes mal clasificadas (Figura 7).

$F1_s = 0.66$ weights the difference in CNN classifier performance between P and E .

The prediction results of the CNN classifier are illustrated with eight images from the validation set and eight images from the test set. Images with

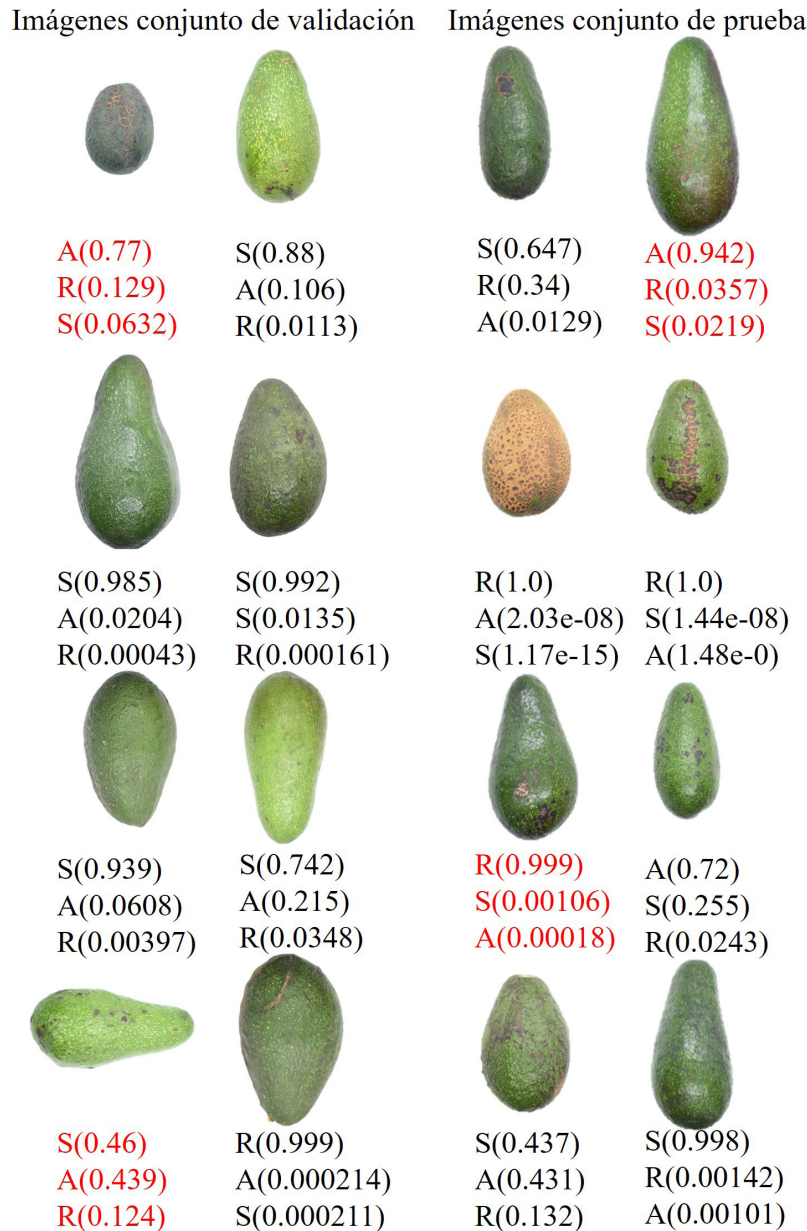


Figura 7. Ejemplos de resultados de la predicción de frutos de aguacate con roña (R), antracnosis (A) o frutos sanos (S) con el modelo de red neuronal convolucional (CNN) con imágenes del conjunto de validación y del conjunto de prueba. Texto en (rojo) indica predicción incorrecta y (negro) correcta. Valores entre paréntesis indican la probabilidad de pertenencia predicha para cada clase objetivo.

Figure 7. Examples of prediction results of avocado fruit with scab (R), anthracnose (A) or healthy fruit (S) with the convolutional neural network (CNN) model with images of the validation set and the test set. Text in (red) indicates incorrect and (black) correct prediction. Values in parentheses indicate the predicted belonging probability for each target class.

En artículos publicados en años recientes, relacionados con la detección y clasificación de enfermedades en plantas, se han obtenido intervalos de precisión de 78.8 a 99.5% a través de técnicas como aprendizaje por transferencia, las cuales son arquitecturas CNN pre entrenadas que se utilizan para la clasificación de imágenes (Qiao *et al.*, 2017; Moolayil, 2019; Saleem *et al.*, 2019). Las principales arquitecturas utilizadas son AlexNet, VGG16, VGG19, ResNet50, Inception V3 (Weiss *et al.*, 2016; Rosebrock, 2017; Ferentinos, 2018).

En este estudio, los resultados de la precisión global de clasificación obtenidos con el clasificador CNN implementado a partir de imágenes de frutos del aguacate, mostraron un desempeño aceptable. El desarrollo del código y la base de datos se encuentran en: <https://github.com/Camposfe1208/Avocado-fruit-diseases-classification>.

CONCLUSIONES

El modelo de red neuronal convolucional (CNN) alcanzó una precisión global de clasificación correcta de 80% en el conjunto de imágenes de validación y de 87% en el conjunto de imágenes de prueba para identificar frutos de aguacate variedad Fuerte sanos, y con la enfermedad de roña (*Sphaceloma perseae*) y antracnosis (*Colletotrichum* spp.).

El clasificador CNN entrenado obtuvo en el conjunto de prueba en predicción una media armónica entre precisión y exhaustividad (F1_s) de 91% para identificar frutos con roña; de 66% para identificar frutos con antracnosis y de 86% para identificar frutos sanos. Este estudio comprueba el uso potencial de inteligencia artificial a través de algoritmos de redes convolucionales para realizar la identificación de enfermedades en el fruto de aguacate a partir de imágenes digitales en la etapa de postcosecha.

LITERATURA CITADA

- Brahimi, M., M. Arsenovic, S. Laraba, S. Sladojevic, K. Boukhalifa, and A. Moussaoui. 2018. Deep learning for plant diseases: detection and saliency map visualization. In: Zhou, J., and F. Chen (eds). Human and Machine Learning: Visible, Explainable, Trustworthy and Transparent. Charm. Springer International Publishing. Cham, Switzerland. pp: 93-117.
- Chollet, F. 2018. Deep Learning with Python. New York. Manning Publications Co. 360 p.
- Crane, J. H., G. Douhan, B. A. Faber, M. L. Arpaia, G. S. Bender, C. F. Balerdi, and A. F. Barrientos-Priego. 2013. Cultivars

correct classification and the probability of belonging to each target class are described in black text, and misclassified images are described in red text (Figure 7).

In papers published in recent years, related to plant disease detection and classification, accuracy ranges from 78.8 to 99.5% have been obtained through techniques such as transfer learning, which are pre-trained CNN architectures used for image classification (Qiao *et al.*, 2017; Moolayil, 2019; Saleem *et al.*, 2019). The main architectures used are AlexNet, VGG16, VGG19, ResNet50, Inception V3 (Weiss *et al.*, 2016; Rosebrock, 2017; Ferentinos, 2018).

In this study, the overall accuracy results obtained with the CNN classifier implemented from avocado fruit images showed acceptable performance. The code development and database can be found at: <https://github.com/Camposfe1208/Avocado-fruit-diseases-classification>

CONCLUSIONS

The convolutional neural network (CNN) model achieved an overall classification accuracy of 80% in the validation image set and 87% in the test image set for identifying avocado cv. Fuerte fruits, healthy and with diseases, scab (*Sphaceloma perseae*) and anthracnose (*Colletotrichum* spp.).

The trained CNN classifier obtained in the prediction test set a harmonic mean between accuracy and recall (F1_s) of 91% for identifying fruits with scab; 66% for identifying fruits with anthracnose and 86% for identifying healthy fruits. This study affirms the potential use of artificial intelligence through convolutional network algorithms to identify avocado fruit diseases from digital images at the postharvest stage.

—End of the English version—

---*---

- and rootstocks. In: Schaffer, B., N. B. Wolstenholme, and A. W. Whitley (eds). The Avocado: Botany, Production and Uses. 2nd ed. CAB International. Wallingford, UK. pp: 200-233.
- Dann, E. K., R. C. Ploetz, L. M. Coates, and K. G. Pegg. 2013. Foliar, fruit and soilborne diseases. In: Schaffer, B., N. B. Wolstenholme, and A. W. Whitley (eds). The Avocado: Botany, Production and Uses. 2nd ed. CAB International. Wallingford, UK. pp: 380-422.
- Dhakal, A., and S. Shakya. 2018. Image-based plant disease detection with deep learning. International Journal of Computer Trends and Technology. 61: 26-29.
- Ferentinos, K. P. 2018. Deep learning models for plant disease detection and diagnosis. Computers and Electronics in Agriculture. 145: 311-318.
- Harpale, D., S. Jadhav, K. Lakhani, and K. Thyagarajane. 2020. Plant disease identification using image processing. International Research Journal of Engineering and Technology. 7: 3571-3573.
- Johnson, J. M., and T. M. Khoshgoftaar. 2019. Survey on deep learning with class imbalance. Journal of Big Data 6: 1-54.
- Loey, M., A. ElSawy, and M. Afify. 2020. Deep learning in plant diseases detection for agricultural crops: A Survey. Int. J. Serv. Sci. Manag. Eng. Tech. 11: 41-58.
- Mohanty, S. P., D. P. Hughes, and M. Salathé. 2016. Using deep learning for image-based plant disease detection. Frontiers in Plant Science 7: 1419. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01419>
- Moolayil, J. 2019. Learn Keras for Deep Neural Networks: a fast-track approach to modern deep learning with Python. A Press. Vancouver, Canada. 182 p.
- Paull, R. E., and O. Duarte. 2011. Avocado. In: Paull, R. E., and O. Duarte (eds). Tropical Fruits: Vol. 1. CAB International. Wallingford, UK. pp: 153-184.
- Qiao, Y., J. Shen, T. Xiao, Q. Yang, M. Wen, and C. Zhang. 2017. FPGA-accelerated deep convolutional neural networks for high throughput and energy efficiency. Concurrency and Computation: Practice and Experience 29: 1-20.
- Rosebrock, A. 2017. Deep Learning for Computer Vision with Python: Starter bundle. PyImageSearch. 330 p.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030: Aguacate mexicano. Ciudad de México, México. 16 p.
- Saleem, M. H., J. Potgieter, and K. M. Arif. 2019. Plant disease detection and classification by deep learning. Plants. 8: 1-22.
- SIAP (Servicio de Información Agrícola y Pesquera). 2020. Panorama Agroalimentario. Ciudad de México, México. pp: 26-27.
- SIAP (Servicio de Información Agrícola y Pesquera). 2021. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consulta: noviembre 2021).
- Thangaraj, R., D., Dinesh, S. Hariharan, S. Rajendar, D. Gokul, T.R. Hariskarthi. 2020. Automatic recognition of avocado fruit diseases using modified deep convolutional neural network. International Journal of Grid and Distributed Computing. 13: 1550-1559.
- Toda, Y., and F. Okura (2019) How convolutional neural networks diagnose plant disease. Plant Phenomics 2019: 9237136. <https://doi.org/10.34133/2019/9237136>
- Trinidad Á., E., F. J. Ascencio V., J. A. Ulloa, J. C. Ramírez R., J. A. Ragazzo S., M. Calderón S., y P. U. Bautista R. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 19: 3953-3964.
- Türkoğlu, M., and D. Hanbay. 2019. Plant disease and pest detection using deep learning-based features. The Turkish Journal of Electrical Engineering & Computer Sciences. 27: 1636-1651.
- Weiss, K., T. M. Khoshgoftaar, and D. Wang. 2016. A survey of transfer learning. Journal of Big Data, sin punto al final. 3: 1-40.

LA NIXTAMALIZACIÓN DEL MAÍZ, EJE DE LA CULTURA MESOAMERICANA, TUVO SU ANTECEDENTE EN EL COMBATE DE INSECTOS

LIME-COOKING OF MAIZE, THE AXIS IN THE MESOAMERICAN CULTURE, HAD A PRECEDENT IN THE FIGHT AGAINST INSECTS

Ángel Lagunes-Tejeda¹, J. Concepción Rodríguez-Macié^{1*}, Gonzalo Silva-Aguayo², Daniel Arturo Rodríguez-Lagunes³

¹Fitosanidad-Entomología y Acarología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (alagunes@colpos.mx), (concho@colpos.mx). ²Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile. (gosilva@udec.cl). ³Facultad de Ciencias Biológicas y Agrícolas, Universidad Veracruzana. Peñuela, Veracruz. (darola63@hotmail.com).

*Autor para correspondencia: J. Concepción Rodríguez-Macié (concho@colpos.mx)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1018-2229>

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo fundamental en la alimentación de los mexicanos. Además, tiene connotaciones divinas, místicas, tradicionales y poéticas. Sin duda, es una de las más importantes aportaciones de México a la gastronomía y nutrición del mundo. La creación de variedades del grano de maíz y sus derivados ha sido un proceso desarrollado por el ser humano durante milenios y solo se conoce de manera parcial su información etnobotánica y coevolutiva. Entre los procesos de la domesticación del maíz que son elusivos a la conclusión científica se encuentran, lugar de origen; parientes silvestres que sirvieron como bases para selección y domesticación; y el origen de la innovación conocida como nixtamalización del grano de maíz. Aunque existe consenso de que México y Mesoamérica son centro de origen y dispersión geográfica del maíz, los sitios específicos y sus momentos permanecen desconocidos. Respecto a los parientes silvestres, la hipótesis principal es que el teocintle (*Zea* spp.) fue la especie de planta que sirvió de base para seleccionarla y modificarla hasta obtener el maíz como se conoce en la actualidad. En relación con la invención o el descubrimiento de la nixtamalización, como eje de la creación y diversificación de productos alimenticios a partir del maíz, claves en el desarrollo cultural de Mesoamérica, esta reflexión apoya la hipótesis de que el uso de la cal para proteger los granos de maíz del ataque de plagas dio origen al proceso que se conoce como nixtamalización. Dicho proceso es la base para producir la masa para elaborar las tortillas mexicanas, las cuales representan el pilar nutricional más importante de la población en México, y son el fundamento de nuestra cultura del maíz.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is a crucial crop for the diets of the Mexican people. In addition, it has divine, mystic, traditional, and poetic connotations. It is, without a doubt, one of the most important contributions from Mexico to the cuisine and nutrition of the world. The creation of maize corn varieties and their derivatives has been a process developed by human beings for millennia. Ethnobotanical and coevolutionary information of maize is only partially known. Among the domestication processes that elude scientific conclusion are place of origin; wild relatives used as the bases for selection and domestication, and the origin of the innovation known as the "nixtamalization" (lime-cooking) of maize grains. Despite the consensus that Mexico and Mesoamerica are the origin and geographic spreading of maize, the specific places and moments remain unknown. Regarding wild relatives, the main hypothesis is that teosinte (*Zea* spp.) was the plant species acting as a basis for selection and modification until maize, as it is known to date, was obtained. Regarding the invention or the discovery of lime-cooking as the axis of creation and diversification of food products from maize, crucial in the cultural development of Mesoamerica, this elaboration supports the hypothesis that the use of lime to protect maize grains from the attack of pests got to become the lime-cooking process producing the *nixtamal*. This process is the basis to produce the dough used to make Mexican tortillas, which constitute the most important pillar for the nutrition of Mexican population, and they are the basis of our maize culture.

Key words: maize, *Zea mays* L., lime-cooking, nixtamal, fight against insects.

Recibido: junio, 2021. Aprobado: noviembre, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 711-718. 2021.

Palabras clave: maíz, *Zea mays* L., nixtamal, cal, combate de insectos.

INTRODUCCION

El inicio y desarrollo de la agricultura obligó al ser humano a incrementar su capacidad de observación y comprensión de los fenómenos naturales. La información que captaba de los ciclos naturales, disponibilidad de agua o tipos de suelos, entre otras, la utilizaba para tomar decisiones que incrementaban la probabilidad de asegurar la producción de los alimentos derivados de las plantas bajo cultivo. El aprendizaje ocurrió por observación, reflexión, prueba y error. Ese conocimiento se transmitió y se acumuló de manera verbal de generación en generación.

El maíz (*Zea mays* L.) es un ejemplo extraordinario de la interrelación de la humanidad con los recursos naturales. La domesticación de esta especie se inició hace más de seis mil años, a partir de los teocintles (*Zea* spp.) y como producto de este largo proceso hoy se cuenta con una amplia variedad de maíces (Muñoz, 2003). El maíz es el cultivo que más variación presenta en términos de forma de grano, textura, color, adaptación geográfica, valor nutritivo y sabor, por mencionar algunas (González-Jácome, 2018). La incorporación de este grano a la dieta jugó un papel importante para que poblaciones humanas nómadas se volvieran sedentarias. La domesticación del maíz representa una de las contribuciones más importantes para la humanidad (Kato *et al.*, 2009). Por su importancia económica, social y cultural, el maíz es el cultivo más representativo de México. El consumo promedio per cápita anual de maíz blanco es de 196.4 kg; se consume principalmente como tortillas, y representa 20.9% de la erogación económica total en alimentos, bebidas y tabaco que realizan las familias mexicanas (SAGARPA, 2017). Para la elaboración de las tortillas, el grano debe someterse a un proceso de nixtamalización cuyo origen no es claro, y de ahí la importancia de proveer una hipótesis plausible.

¿En qué localidad, cuándo y cómo se originó el maíz? son preguntas que pueden contestarse con precisión relativa. Al parecer el maíz se domesticó en varias regiones de México; de ahí centenas de grupos indígenas lo extendieron a Mesoamérica con éxito. Actualmente, se reconocen aproximadamente

INTRODUCTION

The beginning and development of agriculture forced humans to increase their observation and understanding of natural phenomena. They used the information they received from the natural cycles, water availability, or types of soils to make decisions that increased the probability of ensuring the production of foods derived from crops. The learning process occurred due to observation, thinking, trial, and error. That knowledge was transmitted verbally, from one generation to the next.

Maize (*Zea mays* L.) is an extraordinary example of the relationship between humanity and natural resources. The domestication of this species began over six thousand years ago, with the teosintes (*Zea* spp.), and as a product of this long process, today we have a wide variety of maize plants (Muñoz, 2003). Maize is the crop with the highest variation in features such as grain shape, texture, colour, geographic adaptation, nutritional value, and flavour, to mention only a few (González-Jácome, 2018). The incorporation of this grain into human diets played an essential part in human populations becoming sedentary. Maize domestication represents one of the most important contributions to humanity (Kato *et al.*, 2009).

Due to its economic, social, and cultural importance, maize is the crop that most represents Mexico. The average consumption per capita of white maize is 196.4 kg; it is consumed mainly as tortillas. It accounts for 20.9% of the total expenditure in foods, beverages, and tobacco of families in Mexico (SAGARPA, 2017). For the production of tortillas, the grain must undergo a lime-cooking process, which has an unclear origin, hence the importance of providing a plausible hypothesis.

Where, when, and how did maize originate? These are questions that can be answered with relative accuracy. Apparently, maize was domesticated in several regions in Mexico; from there, hundreds of indigenous groups spread it successfully throughout Mesoamerica. About 60 maize races are currently known, all adapted to a wide variety of agroecological conditions across Mexico (Muñoz, 2003). The time and places in which this took place cannot be pinpointed, and since there are some controversies, more time is needed to fully understand this (Kato *et al.*, 2009).

60 razas de maíz adaptadas a una amplia variedad de condiciones agroecológicas de México (Muñoz, 2003). El tiempo y los lugares en los cuales ocurrió este proceso no se pueden determinar con exactitud; y ya que existen algunas controversias, se requerirá más tiempo para su adecuada comprensión (Kato *et al.*, 2009).

Las evidencias arqueológicas y la presencia de parientes silvestres cercanos al maíz han convencido a la comunidad científica de que el teocintle es la planta que sirvió de base para que, después de miles de años de selección y mejoramiento por los habitantes de Mesoamérica, se cuente hoy en día con la planta de maíz como la conocemos. El maíz es intrínseco de la gastronomía mexicana y es un elemento fundamental de la identidad cultural de muchas comunidades (Carrillo, 2009).

La adición de cal tuvo y conserva un papel fundamental en el proceso de nixtamalización. Sin embargo, no está consignado de modo concluyente cómo nuestros ancestros llegaron a esta innovación que, de no haberse realizado, es probable que la cultura del maíz en Mesoamérica no fuera la consolidada y conocida hoy.

La disponibilidad permanente de granos de maíz para su aprovechamiento requirió de su almacenamiento. En consecuencia, este cereal estuvo expuesto al ataque de organismos que también lo utilizan como alimento. Tal es el caso de las plagas insectiles de granos como el gorgojo del maíz [*Sitophilus zeamais* (Motschulsky); Coleoptera: Curculionidae], el barrenador grande del grano [*Prostephanus truncatus* (Horn); Coleoptera: Bostrichidae] y la palomilla de los granos (*Sitotroga cerealella* L.; Lepidoptera: Gelechiidae). Aunque las especies de plagas que afectaban al maíz almacenado no eran las mismas en todas las regiones, su ecología y daños sobre el grano eran muy similares. En consecuencia, nuestros ancestros tuvieron la obligación de implementar medidas de combate para impedir que las plagas destruyeran la preciada cosecha. Estas medidas eran básicas y consistían en mezclar el grano de maíz con sustancias y materiales presentes en el entorno.

Por el año 1200 a. C. en China ya se empleaban insecticidas derivados de plantas para el tratamiento de semillas. Además, utilizaban cal, tiza, aserrín y cenizas de madera para el combate de plagas frecuentes en los granos almacenados. En el año 200 a. C. el romano Cato mencionó el uso de aceite, bandas

Archaeological evidence and the presence of close wild relatives of maize have convinced the scientific community that teosinte is the plant that served as a basis so that, after thousands of years of selection and improvement by the inhabitants of Mesoamerica, we now have the maize plant as we know it. Maize is intrinsic to Mexican cuisine, and it is a fundamental element in the cultural identity of many communities (Carrillo, 2009).

The addition of lime then had, and it continues to play a key role in the nixtamalization process. However, there are no conclusive records on how our ancestors reached this innovation which, had it not been performed, the culture of maize in Mesoamerica would not be the consolidated culture known today.

The permanent availability of maize grains for their use required some form of storage. Consequently, this cereal was exposed to the attack of organisms that also used it as feed. Such is the case of insect pests such as the maize weevil [*Sitophilus zeamais* (Motschulsky); Coleoptera: Curculionidae]; the large grain bore [*Prostephanus truncatus* (Horn); Coleoptera: Bostrichidae], and the grain moth (*Sitotroga cerealella* L.; Lepidoptera: Gelechiidae). Although the pest species that affected stored maize were not the same in all regions, their ecology and damage on the grain were very similar. Consequently, our ancestors were forced to take measures to stop pests from destroying the precious harvest. These measures were essential, and they consisted in mixing the maize grain with substances and materials from the surroundings.

Around 1200 B. C. in China, insecticides produced from plants were already being used to treat seeds. They also used lime, chalk, and sawdust against pests that were common in stored grains. In the year 200 B. C. Cato the Younger mentioned the use of oil, sticky strips, and ashes to fight pest insects (Banaszkiewicz, 2010).

The use of ashes, garlic, neem, salt, and castor seeds to protect stored grains has also been a common practice in some regions of India. Treating the floors of storage facilities with a mixture of chalk, hay, and oil provides protection against mice and weevils (Karthikeyan *et al.*, 2009). There is evidence that wood ash, sand, and plant dust were used in ancient civilizations to increase the time of storage, and they were even considered to have mystical powers. The ashes added to sorghum seeds, in a 1:4 ratio, were

pegajosas y cenizas para el combate de insectos plaga (Banaszkiewicz, 2010).

El uso de cenizas, ajo, neem, sal y semillas de higuera (o ricino) para proteger a los granos almacenados también ha sido una práctica común en algunas regiones de La India. El tratar el piso de los graneros con una mezcla de tiza, paja y aceite otorga protección contra ratones y gorgojos (Karthikeyan *et al.*, 2009). Evidencia existe de que las cenizas de madera, arena y polvo de plantas se usaron en las civilizaciones antiguas para incrementar el tiempo de almacenamiento e incluso se les asignaron poderes místicos. Las cenizas agregadas a las semillas de sorgo en la proporción de 1:4 se utilizaron para protegerlas con éxito relativo (Shobha *et al.*, 2006). Las civilizaciones mesoamericanas siguieron un camino similar.

La literatura menciona que en algún momento y casi seguramente por casualidad, se descubrió que la ceniza producida por la leña utilizada para cocer los alimentos era útil, debido a que cuando se mezclaba con agua se convertía en una lejía que ablandaba y destruía el pericarpio del grano. Más tarde, nuestros ancestros descubrieron que la cal, en presencia de agua, formaba una lechada que mejoraba las características de la masa de maíz (Villavicencio-Nieto *et al.*, 2010). Zizumbo y Colunga (2016) señalaron que las cenizas se utilizaban por poblaciones humanas en el periodo pre-cerámico para curtir pieles, curar heridas, aplicar tatuajes y momificaciones. Además, plantearon la posibilidad de que la aplicación de cenizas facilitaba el consumo de granos como el maíz y el frijol; por tanto, del tratamiento con cenizas se pudo derivar el tratamiento con cal para lograr la nixtamalización; aunque por supuesto no existe evidencia probada para soportar esta hipótesis.

Otra posibilidad de cómo se originó la adición de la cal a la cocción del maíz se basa en la literatura que señala que antes de utilizar sólo cal en el procedimiento específico de la nixtamalización, los antiguos pobladores de Centroamérica usaban ese mineral para proteger al maíz del ataque de los gorgojos (García-Lara *et al.*, 2007; Rodríguez, 2007). Esta circunstancia se ha constatado en el sureste de México desde 1980, con investigación del Colegio de Postgraduados sobre la actividad de polvos minerales y vegetales para combatir las infestaciones de gorgojo (*S. zeamais*) en el maíz almacenado (Lagunes, 1993).

En paralelo al combate de plagas, nuestros ancestros buscaron alternativas para un aprovechamiento

used to protect them in a relatively successful way (Shobha *et al.*, 2006). Mesoamerican civilizations went down a similar path.

Literature mentions that at some point, and almost surely by coincidence, the ashes produced by the wood burnt for cooking were discovered to be helpful, since mixing them with water turned them into a bleach that softened and destroyed the grain pericarp. Our ancestors later found that lime in the presence of water formed a sort of grout, which improved the characteristics of maize dough (the masa) (Villavicencio-Nieto *et al.*, 2010). Zizumbo and Colunga (2016) indicated that human populations used ashes in the pre-ceramic period to tan leather, heal wounds, apply tattoos and carry out mummifications. Additionally, they proposed the possibility that the use of ashes facilitated the consumption of grains such as maize and beans; therefore, the treatment with ashes could have led to the use of ash to obtain the lime-cooked nixtamal. Although, of course, there is no proven evidence to support this assumption.

Another possible origin of the use of lime when cooking maize is based on the literature stating that before using only lime in the specific procedure of lime-cooking, the ancient inhabitants of Central America used that mineral to protect maize from the attack of weevils (García-Lara *et al.*, 2007; Rodríguez, 2007). This circumstance has been verified in South-eastern Mexico since 1980, with research by the Colegio de Postgraduados on the activity of mineral and plant powders to fight the infestations of weevils (*Sitophilus zeamais*) in stored maize (Lagunes, 1993).

Alongside the fight against pests, our ancestors searched for alternatives for an extensive use of maize. Initially, there may have been different ways to use the grain without cooking it. The dry maize grain has the advantage that it can be stored and used until before the next harvest and even for longer. However, the firmness of the grain limits the possibility of direct consumption, and so the most likely procedure may have been grinding the grain to make a fine powder or boiling it to soften it. Those practices reduced the risk of famine, although there were limitations regarding flavour and availability of all the nutrients in maize grains.

The most important basis to obtain new knowledge is derived from trial and error. Therefore, we maintain the argument that it is plausible that maize grains protected with lime were placed, as such

integral del maíz. En los inicios es probable que hayan existido formas diferentes de aprovechar el grano sin someterlo a un proceso de cocción. El grano seco de maíz tiene la ventaja de poderse almacenar y utilizarlo hasta antes de obtener la cosecha siguiente, e incluso por más tiempo. Sin embargo, la dureza del grano limita la posibilidad de consumirlo directamente. De modo que lo más probable habría sido moler el grano para obtener polvo, o hervir para ablandarlo. Estas prácticas reducían el riesgo de hambruna, pero tenían limitaciones respecto al sabor y disponibilidad de todos los nutrientes que poseen los granos de maíz.

La base más importante para la obtención de conocimiento nuevo se derivaba de acciones de prueba y error. Por tanto, sostenemos que es probable que granos de maíz protegidos con cal se sometieron, tal cual sin lavarse, al proceso de cocción normal y la capacidad de observación de nuestros ancestros les permitió detectar que la adición de cal conllevaba ventajas nuevas. De esa manera se pudo obtener masa para consumirse semi cocida o tostada al fuego: se abrió el camino para la invención de la tortilla, los tamales y la gran variedad de alimentos con base en la masa de maíz.

El proceso de cocción de los granos de maíz en presencia de cal, se llama nixtamalización y favorece la biodisposición de calcio, aminoácidos y niacina (Iltis, 2000; Vargas 2007). En consecuencia, la nutrición de las personas experimentó un cambio radical positivo. Este proceso de nixtamalización se ha transmitido de generación en generación y se sigue utilizando como en los tiempos prehispánicos (Benz y Long, 2000; Staller *et al.*, 2006).

El proceso se ha mejorado y actualmente la nixtamalización se inicia con la adición de dos partes de una solución de cal entre 1 y 3% a una parte de maíz, seguido por una cocción que dura entre 50 y 90 minutos. Después, se deja el maíz remojando en el agua de cocción durante 14 a 18 h. El paso siguiente al remojo es la eliminación del agua de cocción, conocida como *nejayote* (del náhuatl *nexayotl*; a su vez de *nextli*, ceniza y *ayotl*, caldo). El maíz se lava dos o tres veces con agua y de esta manera se obtiene el llamado maíz nixtamalizado o nixtamal, que llega a tener hasta 45% de humedad (González-Jácome, 2018).

Una vez nixtamalizado, el maíz se muele en un metate o en un molino para producir la masa que se utiliza para formar, a mano o con máquina, discos

without washing, under the usual cooking process, and the capacity of observation of our ancestors helped them find that adding lime led to new advantages. In this way, they could produce dough to eat it semi-cooked or toasted over a fire: the path was paved to invent the tortilla, tamales, and the large variety of maize dough-based foods.

The lime-cooking process on the maize grains produces a mixture which is called nixtamal; it favours the bioavailability of calcium, amino acids, and niacin (Iltis, 2000; Vargas 2007). Consequently, people nutrition underwent a radical positive change. This nixtamal processing has been passed down from one generation to the next, and it is still being used in the same way as in pre Hispanic times (Benz and Long, 2000; Staller *et al.*, 2006).

The process has been improved and extended through continental America; “nixtamalization” currently begins with the addition of two parts of a 1-3% lime solution, to one part of maize grains; then the mixture is cooked for 50 to 90 minutes. The maize is left soaking in the cooking water for 14 to 18 hours. The step after soaking is the removal of the cooking water, known as *nejayote* (from the Nahuatl *nexayotl*; *nextli*, meaning ash and *ayotl*, broth). The maize is washed two or three times with water, producing what is called nixtamal, which reaches moistures levels of up to 45% (González-Jácome, 2018).

Once lime-cooked, maize is ground on a grinding stone (called *metate*) or on a mill to produce the dough; which is used to produce by hand or with a machine, the dough disk-shaped for tortillas. Those are placed on a hotplate until the final product, a ready-to-eat tortilla, is obtained. Consequently, the calcium from the lime plays a key role in the making of nixtamal from maize grains. During the cooking process, it helps to detach the pericarp, while leaving it to rest controls microbial activity. The process also improves the flavour, aroma, colour, shelf life, and nutritional value of the tortillas (Cruz-Huerta and Verdalet-Guzmán, 2007; Vargas, 2014).

Lime-cooking is one of the primary ways to process maize around the world. This originally Mesoamerican process is now generally used to process the maize grain. The process also increases the availability of niacin, which is a form of vitamin B3 found in maize (Méndez and Moreno, 2007). This is extremely important for people who consume

de masa para tortillas. Estos se cuecen en comal y al término de la cocción se obtiene el producto final, la tortilla lista para ser ingerida. En consecuencia, el calcio de la cal desempeña un papel fundamental durante la nixtamalización del grano de maíz. Durante la cocción, facilita la remoción del pericarpio y durante el reposo controla la actividad microbiana; además, mejora el sabor, aroma, color, vida de anaquel y el valor nutricional de las tortillas (Cruz-Huerta y Verdalet-Guzmán, 2007; Vargas, 2014).

La nixtamalización es una de las formas básicas de procesar el maíz en todo el mundo; de origen mesoamericano, se utiliza ahora para procesar el grano de maíz en forma generalizada. El proceso incrementa también la disponibilidad de niacina, que es una forma de vitamina B3 presente en el maíz (Méndez y Moreno, 2007). Lo cual es de suma importancia en personas que consumen maíz como cereal principal o exclusivo; porque sin el complemento de otras fuentes ricas en esta vitamina, existe el riesgo de una enfermedad llamada pelagra que provoca síntomas agudos de dermatitis, diarrea e incluso demencia (Hegyi *et al.*, 2004). Además, la nixtamalización elimina un gran porcentaje de aflatoxinas tóxicas para mamíferos (Paredes *et al.*, 2009).

Entonces, la adición fortuita de cal ocurrió durante muchos años, como práctica para combatir a los insectos que dañan al maíz durante el almacenamiento; y acabó convertida en parte de un proceso doméstico que ahora es comercial en escala mundial. Sánchez (2016) incluso señaló que era posible que utilizaran la cal obtenida durante la construcción de grandes ciudades como Teotihuacán, Chichen Itzá y Tenochtitlán entre muchas otras; con estas fuentes, se pudo dar origen a la nixtamalización como un proceso generalizado. Los antiguos pobladores de Mesoamérica observaron que la adición de polvos minerales disminuía el ataque de los insectos en el maíz almacenado. Así, no es difícil imaginar que al lavar el maíz para eliminar el polvo de la cal alguna cantidad de polvo quedara adherido en el grano; y que después de agregarse agua y completar la cocción, las personas descubrieran que el grano adquiriría mejores características. De esa “masa pasada por cenizas” (*nixtamal*) se produjo lo que hoy se conoce como nixtamalización. Por último, el procedimiento se fijó a la cultura mesoamericana por uso y costumbre, hasta llegar a ser permanente.

Las recetas o recomendaciones que se pueden consultar sobre cómo preparar el nixtamal indican

maize as a main or exclusive grain because without the complement of other sources of this vitamin, there is a risk of a disease called pellagra, which causes acute symptoms of dermatitis, diarrhoea, and even dementia (Hegyi *et al.*, 2004). In addition, lime-cooking eliminates a large percentage of aflatoxins, which toxic for mammals (Paredes *et al.*, 2009).

Therefore, the fortuitous addition of lime took place for many years as a practice against insects that affect the maize during storage, and it ended up becoming a part of a domestic process that is now globally commercial. Sánchez (2016) even indicated that they might have used the lime obtained during the construction of large cities such as Teotihuacan, Chichen-Itzá, Tenochtitlan, and many others. With these sources, they could have initiated the making of nixtamal as a generalized process. The ancient inhabitants of Mesoamerica observed that adding mineral powders reduced the attack of insects on stored maize. Thus, it is easy to imagine that, after washing the maize to eliminate the powdered lime, some traces of that powder remained on the grain, and after adding clean water, and finishing the cooking process, people discovered that the grain had acquired more desirable characteristics. Out of that “dough passed through ashes” (the *nixtamal*) came what we Latin Americans now know as “nixtamalization”. Finally, the procedure clung to the Mesoamerican culture via practices and customs until it became permanent.

The recipes or recommendations that can be consulted regarding how to prepare the nixtamal indicate that every kilogram of maize requires 10 to 13 g of lime and 2 L of water. This proportion is very close to the amount of lime added to the grain to protect it against pests during storage. In this way, the use of mineral and organic mixtures as pesticides for the protection of plants and consequent use to entirely different objectives are not unusual. Some organophosphate insecticides and carbamates have also had medicinal use against diseases in humans such as glaucoma, myasthenia gravis, bladder atony, paralytic ileus, Alzheimer's, and anthelmintic (Millard and Broomfield 1995; Casida and Quistad, 1998).

The conclusive argument of this reflection is that the lime used to protect stored maize grains from insects pests was the fortuitous precursor of lime-cooking. This mineral powder with insecticidal properties can also provide nutritional properties to

que por cada kilogramo de maíz se utilizan de 10 a 13 g de cal y 2 L de agua. Esta proporción es bastante cercana a la cantidad de cal que se suele añadir al grano para su protección contra plagas durante el almacenamiento. De este modo, el uso de mezclas minerales y orgánicas como plaguicidas para la protección vegetal y su uso consecuente, con objetivos completamente diferentes no es una situación rara. Algunos insecticidas organofosforados y carbamatos también han tenido utilidad medicinal contra enfermedades de seres humanos como glaucoma, miastenia grave, atonía vesical, íleo paralítico, Alzheimer y antihelmínticos (Millard y Broomfield, 1995; Casida y Quistad, 1998).

El argumento concluyente de esta reflexión es que la cal usada para proteger del ataque de insectos a los granos de maíz almacenado fue el precursor fortuito de la nixtamalización. Este polvo mineral con propiedades insecticidas tiene además la capacidad de aportar propiedades nutritivas especiales al maíz cuando éste se somete a un proceso de cocción. El procedimiento conocido como nixtamalización permitió la preparación masiva de tortillas, la forma predominante de consumo de este cereal, fundamental para consolidar y diversificar una cultura del maíz en los pueblos mesoamericanos.

LITERATURA CITADA

- Banaszkiewicz, T. 2010. Evolution of pesticide use. *In*: Influence of the Pesticide Dump on the Environment. A monograph. Series "Contemporary problems of management and environmental protection". Skibniewska, K. A. (ed). Univ. of Warmia and Mazuria and The Regional Fund for Environ. Protect. and Water Manage. Olsztyn, Poland. pp: 7-18.
- Benz, B. F., and A. Long. 2000. Early evolution of maize in the Tehuacán Valley, Mexico. *Curr. Anthropol.* 41: 459-465.
- Carrillo, T. C. 2009. El origen del maíz naturaleza y cultura en Mesoamérica. *Ciencias* 92: 4-13.
- Casida, J. E., and G. B. Quistad. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future. *Ann. Rev. Entomol.* 43:1-16.
- Cruz-Huerta, E., e I. Verdalet-Guzmán. 2007. La ciencia y el hombre. *XX*: 3.
- García-Lara S., C. Espinosa Carrillo, y D. J. Bergvinson. 2007. Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternativas para su manejo y control. CIMMYT. México, D. F. México. 55 p.
- González-Jácome, A. 2018. Maíz y alimentación. Historia breve de un largo viaje. *Rev. Geog. Agríc.* 60: 69-70.
- Hegyi, J., R. A. Schwartz, and V. Hegyi. 2004. Pellagra: dermatitis, dementia, and diarrhea. *Int. J. Dermatol.* 43: 1-5.
- Iltis, H. H. 2000. Homeostatic sexual translocation and the origin of maize (*Zea mays*, Poaceae): A new look at an old problem. *Econ. Bot.* 54: 7-42.
- maize when cooked. The procedure now generalized as "nixtamalization" helped prepare tortillas on a massive scale, making it the predominant way of consuming this cereal, crucial to consolidating and diversifying a maize culture in the Mesoamerican peoples.
- End of the English version—
- *—
- Karthikeyan, C., D. Veeraragavathatham, D. Karpagam, and A. Firdouse. 2009. Traditional storage knowledge. *Indian J. Tradit. Knowledge* 8: 564-568.
- Kato, T. A., C. Mapes, L. M. Mera, J. A. Serratos, y R. A. Bye. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 116 p.
- Lagunes T., A. 1993. Uso de extractos, polvos vegetales, y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y del frijol en la agricultura de subsistencia. Colegio de Postgraduados, USAID-CONACYT-BORUCONSA. Montecillo. Texcoco, México. 32 p.
- Méndez A., A., y E. Moreno M. 2007. Aflatoxinas en las tortillas de maíz. *Ciencia y Desarrollo.* 33: 14-19.
- Millard, C.B., and C. A. Broomfield. 1995. Anticholinesterases: Medical Applications of Neurochemical Principles. *J. Neurochem.* 64: 1909-1918.
- Muñoz O., A. 2003. Centli-maiz. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México. 210 p.
- Paredes L., O., F. L. Guevara, y P. L. Bello. 2009. La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias* 92: 60-70.
- Rodríguez H., C. 2007. Cal contra plagas. *In*: Agricultura Sostenible. Rodríguez- Hernández, C., M. L. I. de Bauer, C.G.S. Valdés-Lozano y S. Sánchez-Preciado (ed.). Soc. Mex. Agric. Sostenible. CP e ITA Tlaxcala. Montecillo, Texcoco, México. pp: 81-101.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Naturales, Pesca y Alimentación), 2017. Maíz grano blanco y amarillo mexicano. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. SAGARPA. Gobierno de México. México. 28 p.
- Sánchez, R. G. 2016. Historia usos y futuro del mayor invento mesoamericano: el maíz. *UAEM Nueva época. Culinaria* 12: 22-38.
- Shobha, N., G. Channal, and N. Channamm. 2006. Indigenous grain structures and methods of storage. *Indian J. Tradit. Knowledge* 5: 114-117.
- Staller J. E., R. H. Tykot, and B. F. Benz (eds) 2006. Histories of Maize: multidisciplinary approaches to the prehistory, linguistics, biogeography, domestication, and evolution of maize. Academic Press-Elsevier. London, UK. 675 p.
- Vargas, L. A. 2007. La historia completa del maíz y su nixtamalización. *Cuadernos de nutrición* 30: 97-102.
- Vargas L., A. 2014. Recursos para la alimentación aportados por México al mundo. *Rev. Mex. Arqueol.* 130: 36-45.

Villavicencio-Nieto, M. A., B. E. Pérez-Escandón, y A. J. Gordillo-Martínez. 2010. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica* 30: 193-238.

Zizumbo, V. D., y G. P. Colunga. 2016. El uso de las cenizas como posible precursor de la nixtamalización en el oeste de Mesoamérica. *Rev. Geog. Agríc.* 57: 7-18.

SUSTRATOS CON ASERRÍN DE CONÍFERAS Y LATIFOLIADAS PARA PRODUCIR PLANTA DE *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham.

SUBSTRATES WITH SAWDUST FROM CONIFERS AND BROADLEAF TREES TO PRODUCE PLANT OF *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham.

Manuel Aguilera-Rodríguez¹, Arnulfo Aldrete^{1*}, Libia Iris Trejo-Téllez², Víctor M. Ordaz-Chaparro²

¹Ciencias Forestales, ²Edafología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México.

*Autor para correspondencia: Arnulfo Aldrete (aaldrete@colpos.mx)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6995-8490>

RESUMEN

Desde el año 2003 en algunos viveros forestales del país se utilizan sustratos con aserrín fresco de pino y oyamel. Debido a la disponibilidad de aserrín de una variedad mayor de especies, este estudio planteó la hipótesis de que los sustratos con aserrín fresco de latifoliadas son aptos para producir planta de *Pinus patula* con calidad similar a la que se produce en sustratos con aserrín de especies de pino u oyamel. Para probarla, el objetivo fue evaluar el crecimiento de plantas de *P. patula* en charolas de poliestireno llenas con sustratos con 60% de aserrín fresco de las 11 principales especies forestales maderables (coníferas y latifoliadas) que se aprovechan en las regiones centro y sureste de México. El aserrín utilizado fue de las especies: *Abies religiosa*, *Hevea brasiliensis*, *Gmelina arborea*, *Mangifera indica*, *Pinus ayacahuite*, *Pinus montezumae*, *Pinus patula*, *Pinus teocote*, *Quercus laurina*, *Quercus rugosa* y *Tectona grandis*. Las charolas (77 cavidades de 170 cm³) se llenaron con mezcla de sustrato con aserrín (60%), corteza de pino compostada, perlita y vermiculita (20, 10 y 10%). A cada mezcla para rellenar charolas se adicionó fertilizante: Multicote® 18-6-12 y 12-24-12 (N-P₂O₅-K₂O) de 8 meses de liberación (4 g L⁻¹ de cada uno) y Micromax® (1 g L⁻¹). El diseño experimental fue completamente al azar e incluyó 11 tratamientos y cuatro repeticiones. A los siete meses se presentaron diferencias (p≤0.05) por tratamiento en diámetro, altura, pesos secos, índices de robustez y de calidad de Dickson, y en la concentración foliar de N, K, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu y B. Con todos los sustratos se obtuvieron índices de calidad de Dickson ≥0.47; diámetros ≥4 mm y alturas de 20 a 30 cm, excepto el de *M. indica*. Las concentraciones de N y P fueron ≥1.3 y 0.20%, excepto en las plantas de los sustratos *H. brasiliensis* y *M. indica*. Las concentraciones de K, Mg, Ca, Zn y B fueron inferiores a los valores recomendados en todos

ABSTRACT

Since 2003, some forest nurseries in the country have been using substrates with fresh sawdust from pine and fir. Due to the availability of sawdust from a greater variety of species, this study proposed the hypothesis that substrates with fresh sawdust from broadleaf trees are suitable for producing *Pinus patula* plants with a quality similar to that produced in substrates with sawdust from pine or fir species. To test it, the objective was to evaluate the growth of *P. patula* seedlings in polystyrene trays filled with substrates with 60% fresh sawdust of the 11 main timber forest species (conifers and broadleaf trees) that are used in central and south-eastern México. The sawdust used was of the species: *Abies religiosa*, *Hevea brasiliensis*, *Gmelina arborea*, *Mangifera indica*, *Pinus ayacahuite*, *Pinus montezumae*, *Pinus patula*, *Pinus teocote*, *Quercus laurina*, *Quercus rugosa* and *Tectona grandis*. The polystyrene trays (77 cavities, 170 cm³ each) were filled with a substrate mixture of sawdust (60%), composted pine bark, perlite and vermiculite (20, 10 and 10%). Fertilizers were added to each tray filling mixture: Multicote® 18-6-12 and 12-24-12 (N-P₂O₅-K₂O) 8 months of controlled-release (4 g L⁻¹ each) and Micromax® (1 g L⁻¹). The experimental design was completely randomized and included 11 treatments and four replicates. At seven months, there were differences (p≤0.05) by treatment in diameter, height, dry weights, sturdiness quotient and Dickson's quality indexes, and in the leaf concentration of N, K, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu and B. With all substrates, Dickson's quality indexes ≥0.47; diameters ≥4 mm and heights 20 to 30 cm were obtained, except with that of *M. indica*. N and P concentrations were ≥1.3 and 0.20%, except in plants grown in *H. brasiliensis* and *M. indica* substrates. Concentrations of K, Mg, Ca, Zn and B were lower than the recommended values in all treatments. The plant produced in the substrate with *P. ayacahuite* sawdust developed the best morphological and nutrient concentration variables, while the lowest values were observed in the plant grown in *M. indica* substrate. This is attributed respectively, to the lower and

Recibido: enero, 2021. Aprobado: noviembre, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 719-732. 2021.

los tratamientos. La planta producida en el sustrato con aserrín de *P. ayacahuite* desarrolló las mejores variables morfológicas y de concentración de nutrientes; mientras que los valores más bajos se observaron en la planta con sustrato de *M. indica*. Lo cual se atribuye respectivamente, al menor y al mayor contenido de sales y fenoles en el aserrín de esas dos especies.

Palabras clave: aserrín fresco, fenoles, fertilizantes de liberación controlada, *Pinus patula*.

INTRODUCCIÓN

Durante las tres décadas recientes se han desarrollado en México cuatro programas nacionales de reforestación con propósitos de restauración: Solidaridad Forestal, Programa Nacional de Reforestación, ProÁrbol y Programa Nacional Forestal. Con estos programas se logró incrementar la producción anual de planta, de 30 millones antes de 1993, a 300 millones en 2011 (SE, 2016). De 2012 a 2018 la producción anual promedio se mantuvo en 300 millones y para el período 2019-2020 se redujo a 22 millones (CONAFOR, 2020). La reducción en la producción de planta para restauración obedece a que durante el 2018 se instituyó el programa federal Sembrando Vida, con una meta de un millón de hectáreas de plantaciones agroforestales durante el período 2018-2024; para lo cual se estima se producirán mil millones de plantas durante ese período.

A partir de 1993 se comenzó a popularizar la producción de planta en contenedores (charolas) y durante 2016 se produjo en este sistema 93% de la planta y 7% en bolsas de polietileno y a raíz desnuda (CONAFOR, 2017). Durante la década de los noventa la producción en charolas se realizaba con sustratos elaborados con turba de musgo (TM) importada de Canadá y Europa, perlita y vermiculita (en mezclas de esos materiales en proporción 60, 20 y 20%). La nutrición de la planta se realizaba con dos tipos de fertilizantes: de liberación controlada (FLC) adicionados al sustrato; e hidrosolubles (FHS), adicionados al agua de riego después de la germinación de la semilla (Aguilera *et al.*, 2016).

Después de 2001, comenzó la sustitución parcial de la turba de musgo por otros insumos locales más económicos, como la corteza de pino compostada (CPC), aserrín de pino fresco (APF) y de oyamel (*Abies religiosa* Kunth Schltdl. et Cham.), fibra de coco y bagazos compostados de agaves, caña de azú-

higher content of salts and phenols in the sawdust of those two species.

Key words: fresh sawdust, phenols, controlled-release fertilizers, *Pinus patula*.

INTRODUCTION

During the latest three decades, four national reforestation programs have been developed in Mexico for restoration purposes: Solidaridad Forestal, Programa Nacional de Reforestación, ProÁrbol and Programa Nacional Forestal. With these programs it was possible to increase annual plant production from 30 million before 1993 to 300 million in 2011 (SE, 2016). From 2012 to 2018 the average annual production remained at 300 million and for 2019-2020 it was reduced to 22 million (CONAFOR, 2020). The reduction in plant production for restoration is due to the fact that starting at 2018 the federal program Sembrando Vida was established, with a goal of one million hectares of agroforestry plantations during the period 2018-2024; for which it is estimated that one billion plants shall be produced over that period. Since 1993, plant production in containers (trays) become popular and during 2016, 93% of the plant was produced in this system, the remaining 7% in polyethylene bags and bare root (CONAFOR, 2017). During the 1990s, production in trays was done with substrates prepared with peat moss (TM) imported from Canada and Europe, perlite and vermiculite (in mixtures of these materials in a 60-20-20% proportion). Plant nutrition was supplied with two types of fertilizers: controlled-release (FLC) fertilizers added to the substrate; and water soluble (FHS) fertilizers, added to the irrigation water after seed germination (Aguilera *et al.*, 2016).

After 2001, it began the partial substitution of peat moss for other cheaper local materials, such as composted pine bark (CPC), fresh sawdust from pine (APF) or fir (*Abies religiosa* Kunth Schltdl. et Cham.), coconut fibre and composted bagasse from agaves, sugarcane and coffee. Likewise, several nurseries began to use fertilization plans with FLC as the single source of nutrition (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016).

Within the local organic materials currently in use to make substrates, conifer sawdust is one of the

car y café; de igual manera, en varios viveros se empezaron a utilizar esquemas de fertilización con FLC como fuente única de nutrición (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016).

De los materiales orgánicos locales de uso actual para elaborar sustratos, el aserrín de coníferas es de los más promisorios por algunas de sus características. En primer lugar, es abundante, se estima que durante el 2018 se produjeron 995 989, 42 637 y 2 583 m³ de aserrín de especies de los géneros *Pinus*, *Abies* y de otras coníferas. Esas cantidades se determinaron con los datos de la producción de madera aserrada en 2018 (SEMARNAT, 2021) que cuantificó la producción anual en tablas, tablones y polines (51%), costeras y recortes (27%) y aserrín (22%) (Zavala y Hernández, 2000).

El aserrín tiene un costo bajo, en promedio 1 m³ cuesta \$100.00 MXN (4.2 USD), en tanto que los costos respectivos de CPC y TM son de \$1000.00 MXN (41.7 USD) y \$2500.00 MXN (104.2 USD) por m³; y posee propiedades físicas y químicas (granulometría, porosidad, pH y CE) con variaciones mínimas entre la producción de un año y otro. También tiene un contenido mínimo o nulo de semillas de malezas y esporas de microorganismos patógenos; es compatible con otros insumos para elaborar sustratos con propiedades físicas y químicas apropiadas para producir planta de calidad (Hernández-Zárate *et al.*, 2014; González *et al.*, 2018). Por tales razones, es un medio de crecimiento apropiado para enraizar estacas de pino de calidad genética alta (Escamilla *et al.*, 2020).

Las dos desventajas principales del aserrín fresco de coníferas son, una alta relación C/N y en algunos casos, el contenido alto de sustancias químicas que pueden ser fitotóxicas para las plantas (fenoles, terpenos, ácidos orgánicos y grasos, sales y minerales). Ambas características pueden provocar alteraciones nutricionales, enzimáticas, hormonales y metabólicas que afectan el crecimiento normal de las plantas (Rau *et al.*, 2006). En los viveros forestales donde se utilizan sustratos con aserrín como componente principal, estas desventajas se han superado por medio de la aplicación de dosis de fertilizantes de liberación controlada hasta 33% superiores a las utilizadas en sustratos con TM o CPC. Además del manejo apropiado del riego para lixiviar las sustancias fitotóxicas disueltas durante el ciclo de producción (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016; Bautista *et al.*, 2018).

most promising due to their characteristics. First, it is abundant; we estimated that 995 989, 42 637 and 2 583 m³ of sawdust from species of the genus *Pinus*, *Abies* and other conifers were produced during 2018. These quantities were determined using data on timber produced in 2018 (SEMARNAT, 2021) which was quantified as the annual production of boards, planks and poles (51%), and also by-products, shorts and offcuts (27%) and sawdust (22%) (Zavala and Hernández, 2000).

Sawdust has a lower cost, on average 1 m³ costs 4.2 USD (\$100.00 MXN), while the respective costs of CPC and TM are 41.7 USD (\$1000.00 MXN) and 104.2 USD (\$2500.00 MXN) per m³; and it has physical and chemical properties (granulometry, porosity, pH and CE) with minimal variations from one year to another. It also has minimal or no content of weed seeds and spores of pathogenic microorganisms; it is compatible with other materials to prepare substrates with appropriate physical and chemical properties to produce quality plant (Hernández-Zárate *et al.*, 2014; González *et al.*, 2018). For such reasons, it is an appropriate growing medium for rooting pine cuttings of high genetic quality (Escamilla *et al.*, 2020).

The two main disadvantages of fresh coniferous sawdust are a high C/N ratio and, in some cases, the high content of chemical substances that can be phytotoxic to plants (phenols, terpenes, organic and fatty acids, salts and minerals). Both characteristics can cause nutritional, enzymatic, hormonal and metabolic alterations that affect normal plant growth (Rau *et al.*, 2006). In forest nurseries where substrates with sawdust as the main component are used, aforementioned disadvantages have been overcome by applying controlled-release fertilizer doses up to 33% higher than those used in substrates with TM or CPC; in addition to proper irrigation management to leach dissolved phytotoxic substances during the production cycle (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016; Bautista *et al.*, 2018).

Along with the promotion of restoration and agroforestry plantations, the establishment of forest plantations for commercial purposes has also increased. Until 2020, the establishment of 233 071 ha was reported, of which 77% corresponded to the genera *Eucalyptus*, *Cedrela*, *Pinus*, *Tectona*, and *Gmelina* (CONAFOR, 2020). Regarding sawdust from broadleaf tree species, it was estimated, with the

A la par del fomento a plantaciones de restauración y agroforestales, también ha incrementado el establecimiento de plantaciones forestales con fines comerciales. Hasta 2020 se documentó el establecimiento de 233 071 ha, de las cuales 77% correspondieron a los géneros *Eucalyptus*, *Cedrela*, *Pinus*, *Tectona*, y *Gmelina* (CONAFOR, 2020). Respecto al aserrín de especies latifoliadas se estimó, con el mismo procedimiento usado para cálculo de subproductos de especies de coníferas, una producción de 144 406 m³ durante 2018 (SEMARNAT, 2021). Aunque a la fecha no existen reportes técnicos en México sobre el uso del aserrín de estas especies en viveros forestales; como los ya reportados en otros países para *Platanus occidentalis* L. (Rau *et al.*, 2006) y *Gmelina arborea* Roxb. (Richmond, 2010).

En este contexto, con aserrín obtenido de 11 de las principales especies forestales maderables que se aprovechan en las regiones centro y sureste de México, entre ellas seis latifoliadas (*Hebea brasiliensis* Muell. Agr., *Gmelina arborea* Roxb., *Mangifera indica* L., *Quercus laurina* Humb. et Bonpl., *Q. rugosa* Neé., *Tectona grandis* L. f.); cuatro especies del género *Pinus* (*P. ayacahuite* Ehren., *P. montezumae* Lamb., *P. patula* Schiede ex Schltdl. et Cham., *P. teocote* Endl.) y *Abies religiosa* Kunth Schltdl. et Cham.; este estudio planteó la hipótesis de que los sustratos con aserrín fresco de latifoliadas son aptos para producir planta de *P. patula* con calidad similar a la que se produce en sustratos con aserrín de especies de pino u oyamel.

El objetivo fue evaluar el crecimiento de plantas de *P. patula* en charolas de poliestireno llenas con sustratos con 60% de aserrín fresco de las 11 principales especies forestales maderables (coníferas y latifoliadas) que se aprovechan en las regiones centro y sureste de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

La planta se produjo en un vivero forestal particular, denominado GUMAIR, localizado en las coordenadas geográficas 20° 09' 08" N y 98° 13' 12" O, en el municipio de Acaxochitlán, Hidalgo., en altitud de 2400 m. El clima en la zona es templado subhúmedo con lluvias en verano, con temperatura media mensual de 15.1 °C, precipitación media anual de 916 mm y período de lluvias de junio a octubre (CONAGUA, 2020). El vivero se

same procedure we used to calculate by-products from coniferous species, a production of 144 406 m³ during 2018 (SEMARNAT, 2021). Although to date there are no technical reports in Mexico on the use of sawdust from broadleaf tree species in forest nurseries; such as those figures already reported in other countries for *Platanus occidentalis* L. (Rau *et al.*, 2006) and *Gmelina arborea* Roxb. (Richmond, 2010).

Within this context, with sawdust obtained from 11 of the main timber forest species harvested in central and south-eastern Mexico, including six broadleaf tree species (*Hebea brasiliensis* Muell. Agr., *Gmelina arborea* Roxb., *Mangifera indica* L., *Quercus laurina* Humb. et Bonpl., *Q. rugosa* Neé., *Tectona grandis* L. f.); four species of the *Pinus* genus (*P. ayacahuite* Ehren., *P. montezumae* Lamb., *P. patula* Schiede ex Schltdl. et Cham., *P. teocote* Endl.) and *Abies religiosa* Kunth Schltdl. et Cham.; this study proposed the hypothesis that substrates with fresh sawdust from broadleaf trees are suitable for producing *P. patula* plants with similar quality to those produced in substrates with sawdust of pine or fir species.

The objective was to evaluate the growth of *P. patula* seedlings grown in polystyrene trays filled in with substrates with 60% fresh sawdust from the 11 main timber forest species (conifers and broadleaf trees) that are harvested in central and south-eastern Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Study site location

The plant was produced in a private forest nursery called GUMAIR, located at the geographical coordinates 20° 09' 08" N and 98° 13' 12" W, in the municipality of Acaxochitlán, Hidalgo, at an altitude of 2400 m. The climate in the area is sub-humid temperate with rainfall in summer; mean monthly temperature of 15.1 °C; mean annual precipitation of 916 mm; and a rainy season from June to October (CONAGUA, 2020). The nursery was chosen because of expertise in the production of *P. patula* seedlings and other conifer species, grown with pine and fir sawdust substrates since 2012. The production area has a 5m-high metal structure to support a 50% black shade netting cover, 70 cm-high metal tables for holding trays, micro-sprinkler irrigation, and a floor with a permeable anti-weed netting cover (Ground cover®).

eligió por su experiencia en la producción de planta de *P. patula* y de otras especies de coníferas con sustratos de aserrín de pino y de oyamel desde 2012. El área de producción cuenta con estructura metálica de 5 m de alto para soportar una cubierta de malla sombra negra al 50%, mesas metálicas porta charolas de 70 cm de alto, riego por microaspersión y piso con cubierta de malla permeable anti hierbas (Ground cover®).

Insumos utilizados

Charolas

Para producir la planta se usaron charolas de poliestireno expandido de 35.0×60.0×15.2 cm, con 77 cavidades de forma cilíndrica (366 cavidades m⁻²), con diámetro superior y longitud de 4.3 y 15.2 mm y 170 cm³ de capacidad (Aislantes y Empaques, S. A. de C. V., México). Las cavidades se impregnaron por inmersión de las charolas en una solución con 6.7% de hidróxido de cobre comercial, elaborada con 4 L de sellador vinílico 5×1 (DOAL®), 10 L de agua potable y 1 kg de hidróxido de cobre con una pureza de 77% (Hidromet®). Esta solución se utiliza de manera cotidiana en el vivero para propiciar la poda de las raíces laterales de las plantas, así como para prevenir que se incrusten en las paredes de las cavidades de las charolas (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016).

Sustratos

La mezcla estándar de uso común en el vivero fue la que se utilizó para el experimento; está compuesta por aserrín fresco (recién producido), corteza de pino compostada, perlita y vermiculita (60, 20, 10 y 10%), con granulometría ≤10mm. Con estas proporciones se elaboraron 11 mezclas con aserrín fresco de las especies: 1. *A. religiosa*, 2. *H. brasiliensis*, 3. *G. arborea*, 4. *M. indica*, 5. *P. ayacahuite*, 6. *P. montezumae*, 7. *P. patula*, 8. *P. teocote*, 9. *Q. laurina*, 10. *Q. rugosa* y 11. *T. grandis*.

Fertilizantes

A cada litro de sustrato se adicionaron estos productos, en sus dosis usuales, 4 g de FLC Multicote® 18-6-12 (NP₂O₅-K₂O) + 2Mg + ME y 4 g L⁻¹ de Multicote® 12-24-12 + 2MgO + 0.2B, ambos de 8 meses de liberación a temperatura constante de 21 °C (Haifa Chemicals Ltd., Haifa, Israel); 1 g de fertilizante de liberación lenta Micromax®, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn (6.00, 3.00, 12.00, 0.10, 1.00, 17.00, 2.50, 0.05, 1.00%) (eveRRIS ILC Fertilizer Company); y 0.1 g de biofungicida Bactiva® (Tecnologías Naturales Internacional S. A. de C. V.).

Inputs

Trays

To produce the plant, expanded polystyrene trays of 35.0×60.0×15.2 cm were used, with 77 cylindrical cavities (366 cavities m⁻²), 4.3 and 15.2 mm (upper diameter×length) and 170 cm³ capacity (Aislantes y Empaques, S. A. de C. V., Mexico). The cavities were impregnated by immersing the trays in a 6.7% solution of commercial copper hydroxide, made with 4 L of 5×1 vinyl sealant (DOAL®), 10 L of tap water and 1 kg of copper hydroxide with a purity percentage of 77% (Hidromet®). This solution is used on a daily basis in the nursery to promote the pruning of the lateral roots of the plants, as well as to prevent them from becoming inserted through the walls of cavities (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016).

Substrates

The standard mixture commonly used in the nursery was the one used for the experiment; it is composed of fresh sawdust (recently produced), composted pine bark, perlite and vermiculite (60, 20, 10 and 10%), with ≤10mm granulometry. With these proportions, 11 mixtures were prepared with fresh sawdust of the species: 1. *A. religiosa*, 2. *H. brasiliensis*, 3. *G. arborea*, 4. *M. indica*, 5. *P. ayacahuite*, 6. *P. montezumae*, 7. *P. patula*, 8. *P. teocote*, 9. *Q. laurina*, 10. *Q. rugosa* and 11. *T. grandis*.

Fertilizers

These products were added to each litre of substrate, at their usual doses, 4 g FLC Multicote® 18-6-12 (NP₂O₅-K₂O) + 2Mg + ME and 4 g L⁻¹ of Multicote® 12-24-12 + 2MgO + 0.2B, both of 8 months controlled-release at a constant temperature of 21 °C (Haifa Chemicals Ltd, Haifa, Israel); 1 g Micromax® slow-release fertilizer, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn (6.00, 3.00, 12.00, 0.10, 1.00, 17.00, 2.50, 0.05, 1.00%) (eveRRIS ILC Fertilizer Company); and 0.1 g Bactiva® biofungicide (Tecnologías Naturales Internacional S. A. de C. V.).

Production management

The plant was produced during a period of seven months, from the first week of May to the first week of December 2018; seed collected at the Ejido Llano Grande, Chignahuapan, Puebla, was used. Before sowing, soaking was applied for 24 h, with change of water every 6 h; disinfection in a solution with 10% commercial hydrogen peroxide for 30 min and impregnation

Manejo de la producción

La planta se produjo durante un periodo de siete meses, de la primera semana de mayo a la primera de diciembre 2018; se utilizó semilla recolectada en el Ejido Llano Grande, Chignahuapan, Puebla. Antes de su siembra se aplicó remojo durante 24 h, con cambio de agua cada 6 h; desinfección en una solución con 10% de agua oxigenada comercial durante 30 min e impregnación con 1.0 g kg⁻¹ de biofungicida Bactiva®. Dos semillas por cavidad se sembraron y el conjunto de charolas se colocó en forma aleatoria sobre una de las mesas al centro del área de producción para prevenir el efecto de orilla. Durante mayo y junio la planta estuvo protegida con malla sombra, y de julio a noviembre a sol pleno. Después de la etapa de germinación, se aplicó un riego por semana con aproximadamente 5% más cantidad de agua de la requerida para saturar el sustrato, con el propósito de lixiviar las sales y sustancias fitotóxicas disueltas en el sustrato.

Variables evaluadas

Características físicas y químicas de los sustratos

Las características físicas y químicas de los 11 sustratos sin fertilizante se determinaron en los laboratorios de Física de Suelos y de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. El pH y la CE se midieron con medidores portátiles de la marca Hanna® Instruments, en los extractos 1:1 en volumen (sustrato:agua destilada, durante 30 min). La porosidad total (PT), la porosidad de aireación (PA) y la porosidad de retención de agua (PRA) se determinaron conforme al procedimiento descrito por Landis *et al.* (1990). La densidad aparente (DA) se obtuvo al dividir el peso seco (78 h a 70 °C) (g) entre el volumen total del recipiente.

La concentración de nitrógeno (%N) se determinó por el método semi micro-Kjeldahl (Bremner, 1965), con ácido sulfúrico-salicílico para la digestión. La concentración de carbono orgánico (%C.O.) y la relación carbono nitrógeno (C/N) se determinaron conforme a los procedimientos descritos en la Norma Mexicana NMX-AA-67-1985. El contenido de fenoles totales (FT) se realizó por medio del método propuesto por Makkar (2003). Los valores de cada característica (física y química) se obtuvieron al promediar los resultados obtenidos de tres repeticiones de cada sustrato.

Variables morfológicas de las plantas

La planta se evaluó a los siete meses de edad. De la parte central de cada charola (sin considerar las plantas de las filas periféricas) se extrajeron 15 plantas en forma sistemática; en total, 60 plantas por tratamiento. Los cepellones se lavaron por separado,

with 1.0 g kg⁻¹ of Bactiva® biofungicide. Two seeds per cavity were sown and the set of trays was randomly placed on one of the tables in the centre of the production area to prevent the edge effect. During May and June, plants were protected with shading, and from July to November they were placed under full sun. After the germination stage, one irrigation per week was applied with approximately 5% more water than that required to saturate the substrate, in order to leach the salts and phytotoxic substances dissolved in the substrate.

Evaluated variables

Physical and chemical characteristics of substrates

The physical and chemical characteristics of the 11 substrates without fertilizer were determined laboratories of Soil Physics and Phytochemistry at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, State of Mexico. The pH and CE were measured with Hanna® Instruments portable meters, in extracts 1:1 by volume (substrate:distilled water, for 30 min). Total porosity (PT), aeration porosity (PA) and water retention porosity (PRA) were determined according to the procedure described by Landis *et al.* (1990). Bulk density (DA) was obtained by dividing the dry weight (g) (after 78 h at 70 °C) by the total volume of the container.

Nitrogen concentration (%N) was determined by the semi micro-Kjeldahl method (Bremner, 1965), with sulfuric-salicylic acid for digestion. The organic carbon concentration (%C.O.) and the carbon-nitrogen ratio (C/N) were determined according to the procedures described in the Mexican Standard NMX-AA-67-1985. Total phenol content (FT) was determined using the method proposed by Makkar (2003). The values for each characteristic (physical and chemical) were obtained by averaging the results obtained from three replicates of each substrate.

Plant morphological variables

Plants were evaluated at seven months of age. From the central section of each tray (without considering the plants in the peripheral rows), 15 plants were systematically extracted; in total, 60 plants per treatment. Root balls were washed separately with tap water to free the roots. In each plant, the height of the aerial part (A) and the diameter of the root collar (D) were measured, then sectioned and placed separately in brown paper bags and dried in an electric oven at 70 °C, for 72 h. After drying, the dry weight of the aerial part (PSA) and root (PSR) was recorded. With the above described values, the qualitative morphological variables were calculated: aerial dry weight to root dry weight ratio (PSA/PSR); sturdiness quotient IR (A/D) and Dickson's quality index ICD = [PST / (IR + PSA/PSR)].

con agua potable para dejar libres las raíces. En cada planta se midió la altura de la parte aérea (A) y el diámetro del cuello de la raíz (D), luego se seccionaron y se colocaron por separado en bolsas de papel de estraza y se secaron en horno eléctrico a 70 °C, durante 72 h. Después del secado se registró el peso seco de la parte aérea (PSA) y de la raíz (PSR). Con los valores anteriores se calcularon las variables morfológicas cualitativas: relación peso seco aéreo entre peso seco de la raíz (PSA/PSR); índice de robustez IR (A/D) e índice de calidad de Dickson ICD = $[PST / (IR + PSA/PSR)]$.

Concentración nutrimental en el follaje de las plantas

El análisis nutrimental del follaje de las plantas se realizó en el Laboratorio de Nutrición Vegetal “Salvador Alcalde Blanco” del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El follaje seco de las 60 plantas evaluadas de cada tratamiento se trituro y se pulverizó en un molino de martillos con criba de 1.0 mm de diámetro; de cada molienda se analizaron tres muestras. El N se determinó por el método semi micro-Kjeldahl (Bremner, 1965), con ácido sulfúrico-salicílico para la digestión. La determinación de las concentraciones de P, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu y B se realizó en el extracto resultante de la digestión húmeda de material vegetal seco, con ácido sulfúrico, ácido perclórico y peróxido de hidrógeno (1.3:0.7:1.0, v:v:v) (Alcántar y Sandoval, 1999). Los extractos se llevaron a lectura en un equipo de espectrometría de emisión e inducción por plasma (Agilent 725 Series ICP-OES).

De manera complementaria, y con los mismos procedimientos antes descritos se determinó la concentración de nutrientes en el follaje de 20 plantas sanas y vigorosas de regeneración natural de *P. patula* con diámetro >4 mm y alturas de 20 a 30 cm, para comparar con los valores de la planta producida en los 11 sustratos, así como con los valores nutricionales recomendados para planta de coníferas producidas en charolas (VNRC) (Landis, 1985). La planta se recolectó en el área de corta total 2017 del Ejido Llano Grande, Chignahuapan, Puebla.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, con 11 tratamientos y cuatro repeticiones (charolas) para cada uno. El análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) para comparar las variables morfológicas e índices de calidad se realizaron con InfoStat versión 2008[®] (Di Rienzo *et al.*, 2008). Los valores promedio de la concentración de nutrientes en el follaje de las plantas por tratamiento también se analizaron con el mismo programa estadístico.

Nutrient concentration in plant foliage

The nutritional analysis of plant foliage was performed at Laboratorio de Nutrición “Salvador Alcalde Blanco” facilities at Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. The dry foliage of the 60 plants evaluated from each treatment was ground and pulverized in a hammer mill with a 1.0 mm diameter screen; three samples were analysed from each grinding. N was determined by the semi micro-Kjeldahl method (Bremner, 1965), with sulfuric-salicylic acid for digestion. The determination of P, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu and B concentrations was performed on the extract resulting from the wet digestion of dried plant material, with sulfuric acid, perchloric acid and hydrogen peroxide (1.3:0.7:1.0, v:v:v) (Alcántar and Sandoval, 1999). The extracts were read in an emission and plasma induction spectrometry equipment (Agilent 725 Series ICP-OES).

As a complement, and with the same procedures described above, nutrient concentrations in the foliage of 20 healthy and vigorous plants of natural regeneration of *P. patula* with diameter >4 mm and heights of 20 to 30 cm were determined to compare with the values of the plant produced with the 11 substrates. As well as with the nutritional values recommended for coniferous plants produced in trays (VNRC) (Landis, 1985). Plants from forest regeneration were collected in the 2017 clearcutting area of Ejido Llano Grande, Chignahuapan, Puebla.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized, with 11 treatments and four replicates (trays) for each. The analysis of variance and Tukey's mean comparison test ($p \leq 0.05$) to compare morphological variables and quality indices were performed with InfoStat version 2008[®] (Di Rienzo *et al.*, 2008). The average values of nutrient concentration in the foliage of plants per treatment were also analysed with the same statistics software.

RESULTS AND DISCUSSION

Physical and chemical characteristics of substrates

Porosity (PT, PA, PRA) and DA values showed minimal variations among substrates, attributable to the fact that the sawdust for every proved tree was obtained from sawmills operating with band saws with thickness less than 2 mm. Only PA and CE were within the recommended values for substrates to produce forest species in trays (VRSC) (Landis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características físicas y químicas de los sustratos

Los valores de porosidad (PT, PA, PRA) y DA presentaron variaciones mínimas entre sustratos, atribuibles a que todas las porciones de aserrín se obtuvieron de aserraderos que operan con sierras cintas con grosor menor a 2 mm. Solo la PA y la CE estuvieron dentro de los valores recomendados en sustratos para producir especies forestales en charolas (VRSC) (Landis *et al.*, 1990; Prieto *et al.*, 2012; SE, 2016). En todos los sustratos los valores de PT y PRA fueron superiores de 4 a 10% respecto a los valores recomendados; aunque esta situación en apariencia no afectó el crecimiento normal de las plantas. Esto pudo deberse a que durante la etapa de vivero la porosidad y la retención de agua en general se reducen al compactarse el sustrato, por efecto de los riegos y del crecimiento de la raíz. Ocho de los 11 sustratos presentaron valores de pH ligeramente inferiores en 0.1 a 0.4 unidades, respecto a los valores recomendados. Esta condición se considera no dañina para el crecimiento de la planta, ya que el pH del agua retenida por los sustratos se eleva con el agua de riego y el agua de lluvia durante el período de producción.

Los sustratos con aserrín de latifoliadas presentaron valores de CE y FT más altos que los sustratos con aserrín de coníferas; en cambio, los sustratos con aserrín de coníferas mostraron valores más altos en la relación C/N que los sustratos con aserrín de latifoliadas. El sustrato T4 (*M. indica*) alcanzó los valores más altos en CE y FT, mientras que el sustrato T5 (*P. ayacahuite*) permaneció en los valores más bajos (Cuadro 1).

Efecto de los sustratos en el crecimiento de las plantas

En diez de los 11 tratamientos se produjo planta con diámetro ≥ 4 mm y alturas de 20 a 30 cm, conforme con la Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales (SE, 2016); sólo la planta del T4 (*M. indica*) resultó con diámetro y altura menores que lo recomendado (Figura 1).

El tipo de aserrín afectó ($p \leq 0.05$) todas las variables evaluadas. Las plantas de los 11 tratamientos desarrollaron unos IR e ICD que indican alta calidad, pero tuvieron una PSA/PSR mayor a la máxima reco-

et al., 1990; Prieto *et al.*, 2012; SE, 2016). In all substrates, PT and PRA values were 4 to 10% higher than the recommended values; although this situation apparently did not affect normal plant growth. This could be due to during the nursery stage, porosity and water retention are generally reduced as the substrate becomes compacted, by the effect of irrigation and root growth. Eight out of the 11 tested substrates showed pH values slightly lower than those recommended by 0.1 to 0.4 units. This condition is considered not harmful to plant growth, since the pH of the water retained by the substrates rises with irrigation water and rainfed during the production period.

Substrates with broadleaf trees sawdust showed higher CE and FT values than substrates with coniferous sawdust; whereas those substrates with coniferous sawdust exhibited higher values in the C/N ratio than substrates with broadleaf trees sawdust. Substrate T4 (*M. indica*) reached the highest values in CE and FT, while substrate T5 (*P. ayacahuite*) remained at the lowest values (Table 1).

Effect of substrates on plant growth

Ten out of the 11 treatments produced plants with ≥ 4 mm diameter and 20 to 30 cm heights, according to the Mexican Standard for the certification of forest nursery operation (SE, 2016); only the T4 plant (*M. indica*) had lower diameter and height than those recommended (Figure 1).

The type of sawdust affected ($p \leq 0.05$) all the variables evaluated. The plants of the 11 treatments developed IR and ICD indicating high quality but had a PSA/PSR higher than the maximum recommended for fast-growing conifers produced in trays (Prieto and Sáenz, 2011). Plants grown on T5 (*P. ayacahuite*) developed the highest dimensions and dry weights. Whereas plants in the T4 (*M. indica*) had the lowest, although it reached appropriate values in IR, PSA/PSR and ICD (Table 2).

The value of the PSA/PSR index was higher than that recommended by Prieto and Sáenz (2011), which can be attributed to the fact that the methodology developed by those authors included plants without and with root pruning. Plants produced with root pruning generally develop shorter and thinner lateral roots, with lower root dry weight than the plants without pruning (Aguilera *et al.*, 2021). In three

Cuadro 1. Características físicas y químicas de mezclas de sustratos elaboradas con aserrín (60% en la mezcla) de 11 especies forestales maderables.**Table 1. Physical and chemical characteristics of substrate mixtures made with fresh sawdust (60% in the mixture) of 11 timber forest species.**

Especie	PT	PA (%)	PRA	DA (g cm ⁻³)	pH (1:1)	CE (dS m ⁻¹)	C/N	FT (mg g ⁻¹)
1. <i>A. religiosa</i>	90	26	64	0.15	5.4	0.18	362	17.9
2. <i>G. arborea</i>	86	22	64	0.15	5.3	0.32	280	22.6
3. <i>H. brasiliensis</i>	87	23	64	0.17	4.5	0.44	234	24.5
4. <i>M. indica</i>	86	27	59	0.19	4.3	0.56	259	31.1
5. <i>P. ayacahuite</i>	89	26	63	0.15	5.3	0.15	398	16.7
6. <i>P. montezumae</i>	90	25	65	0.17	5.6	0.10	364	17.3
7. <i>P. patula</i>	85	23	62	0.17	5.6	0.10	379	16.1
8. <i>P. teocote</i>	90	24	66	0.16	5.5	0.11	386	18.4
9. <i>Q. laurina</i>	88	23	65	0.17	5.2	0.28	297	22.7
10. <i>Q. rugosa</i>	86	21	65	0.18	5.1	0.33	283	23.6
11. <i>T. grandis</i>	88	24	64	0.16	5.4	0.29	202	23.8
VRSC	60-80	20-35	25-55		5.5-6.5	<1.0	50-70	

PT: porosidad total; PA: porosidad de aireación; PRA: porosidad de retención de agua; DA: densidad aparente; FT: concentración de fenoles totales; VRSC: valores recomendados en sustratos para producir especies forestales en charolas (Landis *et al.*, 1990; Prieto *et al.*, 2012; SE, 2016). ♦ PT: total porosity; PA: aeration porosity; PRA: water retention porosity; DA: bulk density; FT: total phenol concentration; VRSC: recommended values in substrates for producing forest species in trays (Landis *et al.*, 1990; Prieto *et al.*, 2012; SE, 2016).



Figura 1. Planta de *Pinus patula* de siete meses de edad con diámetros y alturas promedio por tratamiento, de izquierda a derecha: T1 *A. religiosa*, T2 *H. brasiliensis*, T3 *G. arborea*, T4 *M. indica*, T5 *P. ayacahuite*, T6 *P. montezumae*, T7 *P. patula*, T8 *P. teocote*, T9 *Q. laurina*, T10 *Q. rugosa* y T11 *T. grandis*.

Figure 1. Seven-month-old *Pinus patula* plants with average diameters and heights by treatment, from left to right: T1 *A. religiosa*, T2 *H. brasiliensis*, T3 *G. arborea*, T4 *M. indica*, T5 *P. ayacahuite*, T6 *P. montezumae*, T7 *P. patula*, T8 *P. teocote*, T9 *Q. laurina*, T10 *Q. rugosa* and T11 *T. grandis*.

mendada para coníferas de crecimiento rápido producidas en charolas (Prieto y Sáenz, 2011). La planta del T5 (*P. ayacahuite*) desarrolló las dimensiones y pesos secos más altos, mientras que la planta del T4 (*M. indica*) tuvo los más bajos, aunque alcanzó valores apropiados en IR, PSA/PSR e ICD (Cuadro 2).

El valor del índice PSA/PSR resultó superior al recomendado por Prieto y Sáenz (2011), lo cual puede atribuirse a que la metodología desarrollada por dichos autores incluyó planta sin y con poda radical. La planta producida con poda radical en general desarrolla raíces laterales más cortas y delgadas, con peso seco de raíz menor que la planta sin poda (Aguilera *et al.*, 2021). En tres estudios de producción de planta de pinos con crecimiento rápido (*Pinus pseudostrobus* Lindl., Aguilera *et al.*, 2016; *P. greggii* Engelm. ex Parl., Bautista *et al.*, 2018; y *P. cooperi* Blanco, González *et al.*, 2018), en los cuales se utilizó el mismo tipo de charolas impregnadas con hidróxido de cobre, se logró la producción de planta de calidad con base en D, A, IR e ICD y con valores de 2.5 a 4.0 para el PSA/PSR, similares a los de este estudio.

Con excepción del T4 (*M. indica*), la dosis de 8 g L⁻¹ de FLC resultó suficiente para producir planta con características morfológicas apropiadas. Resultados

studies of plant production of fast-growing pines (*Pinus pseudostrobus* Lindl., Aguilera *et al.*, 2016; *P. greggii* Engelm. ex Parl., Bautista *et al.*, 2018; and *P. cooperi* Blanco, Gonzalez *et al.*, 2018), in which the same type of trays impregnated with copper hydroxide were used, the production of quality plant was achieved regarding D, A, IR and ICD and with values from 2.5 to 4.0 for the PSA/PSR, similar to those observed in this study.

Except T4 (*M. indica*), the 8 g L⁻¹ dose of FLC was sufficient to produce plants with appropriate morphological characteristics. Similar results, in morphological characteristics, were reported in two studies of pine plant production in trays where non-composted pine sawdust and 8 g L⁻¹ of FLC were used: *P. greggii* var. *australis*, in substrate with sawdust, perlite and vermiculite (60, 20, 20%) with Osmocote® Plus (Castro-Garibay *et al.*, 2018) and *P. cooperi* on substrate with sawdust, peat moss and bark (50, 30, 20%) with Multicote® (González *et al.*, 2018).

Substrates with CE and FT values greater than 0.44 dS m⁻¹ and 24.5 mg g⁻¹ (Table 1) can be considered as not suitable for producing pine plant with adequate sizes; with the exception of applying

Cuadro 2. Valores promedio de las variables morfológicas de planta de *Pinus patula* de siete meses de edad, producida en sustratos con aserrín de 11 especies forestales maderables.

Table 2. Average values of morphological variables of seven-month-old *Pinus patula* plants, produced in substrates with sawdust of 11 timber forest species.

Tratamiento	D (mm)	A (cm)	PSA (g)	PSR (g)	PSA /PSR	IR	ICD
1. <i>A. religiosa</i>	4.53ab	25.03bc	3.61abc	1.15a	3.27bc	5.58bcd	0.55a
2. <i>H. brasiliensis</i>	4.54ab	23.53c	3.40bc	1.08ab	3.14c	5.23de	0.55a
3. <i>G. arborea</i>	4.68a	24.25bc	3.62abc	1.05abc	3.44abc	5.23de	0.54a
4. <i>M. indica</i>	3.89c	18.73d	2.67d	1.08ab	2.52d	4.89e	0.52ab
5. <i>P. ayacahuite</i>	4.59ab	28.28a	3.80a	1.08ab	3.65a	6.23a	0.50ab
6. <i>P. montezumae</i>	4.57ab	26.75ab	3.65abc	1.03abc	3.59ab	5.90abc	0.50ab
7. <i>P. patula</i>	4.57ab	24.90bc	3.76ab	1.05abc	3.60ab	5.48cd	0.53ab
8. <i>P. teocote</i>	4.67a	26.15abc	3.84a	1.05abc	3.73a	5.65bcd	0.53ab
9. <i>Q. laurina</i>	4.39b	26.10abc	3.53abc	0.95bc	3.71a	6.01ab	0.47b
10. <i>Q. rugosa</i>	4.43ab	27.13ab	3.63abc	0.98bc	3.74a	6.20a	0.48b
11. <i>T. grandis</i>	4.59ab	24.45bc	3.37c	0.90c	3.72a	5.37d	0.48b
<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
VRC	≥4	20-30			1.5-2.0	≤7.5	≥0.5

D: diámetro; A: altura; PSA: peso seco aéreo; PSR: peso seco radical; IR: índice de robustez; ICD: índice de calidad de Dickson; VRC: valores recomendados para coníferas de rápido crecimiento producidas en charolas (Prieto *et al.*, 2011). Letras diferentes en una columna indican diferencias ($p \leq 0.05$). ♦ D: diameter; A: height; PSA: aerial dry weight; PSR: root dry weight; IR: sturdiness quotient; ICD: Dickson quality index; VRC: recommended values for fast-growing conifers produced in trays (Prieto and Sáenz, 2011). Different letters in a column indicate differences ($p \leq 0.05$).

similares, en características morfológicas, se informaron en dos estudios de producción de planta de pino en charolas donde se utilizó aserrín de pino sin compostar y 8 g L⁻¹ de FLC: *P. greggii* var. *australis*, en sustrato con aserrín, perlita y vermiculita (60, 20, 20%) con Osmocote® Plus (Castro-Garibay *et al.*, 2018) y *P. cooperi* en sustrato con aserrín, turba y corteza (50, 30, 20%) con Multicote® (González *et al.*, 2018).

Los sustratos con valores de CE y FT mayores que 0.44 dS m⁻¹ y 24.5 mg g⁻¹ (Cuadro 1) se pueden considerar como no apropiados para producir planta de pino con tallas adecuadas; con la excepción de que se les apliquen tratamientos para lixiviar el exceso de sales y fenoles. Rau *et al.* (2006) evaluaron el crecimiento de raíces de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en lixiviados de sustratos elaborados a partir de trozas de madera molida con corteza de *Pinus taeda* L.; en ambas especies producidas, el crecimiento radical incrementó después de aplicar lavados al sustrato para reducir la cantidad de sustancias fitotóxicas.

Efecto de los sustratos en la concentración foliar de nutrientes

En todos los tratamientos se presentaron diferencias ($p \leq 0.05$) en la concentración de nutrientes en el follaje de las plantas, excepto para P y Ca. En ningún tratamiento se presentó un patrón homogéneo de asimilación máxima o mínima en todos los nutrientes determinados. Las concentraciones de N, P, Mn y Cu resultaron acordes con las recomendadas por Landis (1985) para coníferas producidas en charolas (VNRC) y también con la concentración de nutrientes en la planta de *P. patula* de regeneración natural (CNPp), excepto en las plantas del T2 (*H. brasiliensis*) y del T4 (*M. indica*) que presentaron niveles más bajos en N y P que presentaron los valores más altos de CE y FT.

Los nutrientes K, Mg, Ca, Zn y B presentaron valores inferiores a VNCR y CNPp en todos los tratamientos. En los 11 tratamientos la concentración de Fe resultó acorde con VNCR, pero inferior a CNPp, lo cual es atribuible al origen volcánico del suelo donde se recolectaron las plantas. En promedio, la planta del T1 (*A. religiosa*) asimiló la cantidad mayor de macro y micronutrientes, en tanto que la planta del T4 (*M. indica*) tuvo las menores concentraciones foliares (Cuadro 3).

treatments to leach excess salts and phenols. Rau *et al.* (2006) evaluated root growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings grown in leachates from substrates made from ground wood logs with bark of *Pinus taeda* L.; in both species produced, root growth increased after applying washes to the substrate to reduce the amount of phytotoxic substances.

Effect of substrates on foliar nutrient concentration.

There were differences ($p \leq 0.05$) in the concentration of nutrients in plant foliage in all treatments, except for P and Ca. No treatment showed a homogeneous pattern of maximum or minimum assimilation in all the nutrients determined. The concentrations of N, P, Mn and Cu were according to those recommended by Landis (1985) for conifers produced in trays (VNRC) and to the concentration of nutrients in the plant of *P. patula* from natural regeneration (CNPp), except the plants grown in T2 (*H. brasiliensis*) and T4 (*M. indica*), which presented lower levels of N and P, and the highest values of CE and FT.

The nutrients K, Mg, Ca, Zn and B presented lower values than VNCR and CNPp in all treatments. In the 11 treatments, Fe concentration was according to VNCR, but lower than CNPp, which is attributable to the volcanic origin of the soil where the plants were collected. On average, plants on T1 (*A. religiosa*) assimilated the highest amount of macro and micronutrients, whereas the plant on T4 (*M. indica*) had the lowest foliar concentrations (Table 3).

With the exception of treatments T2 (*H. brasiliensis*) and T4 (*M. indica*), the fertilizer doses used in the other treatments can be considered sufficient to produce plants with appropriate dimensions, although insufficient to achieve macro and micronutrient concentrations according to VNRC or similar to the CNPp.

Three studies by Castro-Garibay *et al.* (2018), González *et al.* (2018) and González-Orozco *et al.* (2018) produced plants of *P. greggii* var. *australis*, *P. cooperi* Blanco and *P. engelmannii* with different substrates and fertilizers. In those treatments where the same dose of Multicote® and substrates with 60 and 50% fresh pine sawdust were used, it was reported

Cuadro 3. Concentración promedio de nutrientes en el follaje de *Pinus patula* de siete meses de edad, producido en sustratos con aserrín fresco de 11 especies forestales maderables.**Table 3. Average nutrient concentration in the foliage of seven-month-old *Pinus patula* seedlings grown on substrates with fresh sawdust of 11 timber forest species.**

Tr	Especie	N	P	K	Mg	Ca	Fe	Mn	Zn	Cu	B
		(%)					(ppm)				
1	<i>A. religiosa</i>	1.45a	0.20	0.57ab	0.09a	0.24	68b	328a	24cd	12ab	21a
2	<i>H. brasiliensis</i>	1.14bc	0.19	0.52bc	0.08ab	0.20	65b	262d	28bc	10ab	19ab
3	<i>G. arborea</i>	1.41a	0.20	0.57ab	0.08ab	0.22	58b	268c	27cd	8b	19ab
4	<i>M. indica</i>	1.05c	0.18	0.53bc	0.08ab	0.23	68b	158d	34a	11ab	19ab
5	<i>P. ayacahuite</i>	1.47a	0.21	0.47d	0.08ab	0.23	66b	314ab	21e	11ab	18ab
6	<i>P. montezumae</i>	1.48a	0.24	0.48cd	0.08ab	0.26	62b	314ab	25bcd	10ab	17b
7	<i>P. patula</i>	1.44a	0.20	0.41e	0.08ab	0.22	68b	326a	24cd	11ab	18ab
8	<i>P. teocote</i>	1.41a	0.20	0.44de	0.07b	0.23	68b	317ab	22e	11ab	19ab
9	<i>Q. laurina</i>	1.53a	0.21	0.45d	0.08ab	0.20	72b	309b	33a	12ab	19ab
10	<i>Q. rugosa</i>	1.49a	0.20	0.44de	0.07b	0.21	59b	266c	29b	8b	19ab
11	<i>T. grandis</i>	1.47a	0.23	0.46d	0.08ab	0.25	99a	305b	25bcd	14a	19ab
	<i>p</i>	<0.001	<0.144	<0.001	<0.013	<0.456	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	VNRC	1.3-3.5	0.20-0.60	0.70-2.50	0.10-0.30	0.30-1.00	60-200	100-250	30-150	4-20	20-100
	CNPp	1.44	0.22	0.51	0.13	0.33	259	109	34	6	22

Tr: Tratamiento; VNRC: valores nutricionales recomendados en el follaje para coníferas producidas en charolas (Landis, 1985); CNPp: concentración de nutrientes en follaje de plantas de *Pinus patula* de regeneración natural con diámetro >4 mm y alturas de 20 a 30 cm. Letras diferentes en una columna indican diferencias ($p \leq 0.05$). ♦ Tr: Treatment; VNRC: recommended nutritional values in foliage for conifers produced in trays (Landis, 1985); CNPp: nutrient concentration in foliage of *Pinus patula* plants from natural regeneration with >4 mm diameter and 20 to 30 cm heights. Different letters in a column indicate differences ($p \leq 0.05$).

Con excepción de los tratamientos T2 (*H. brasiliensis*) y T4 (*M. indica*), en los demás tratamientos las dosis de fertilizantes utilizados se pueden considerar como suficientes para producir plantas con dimensiones apropiadas, aunque insuficiente para lograr una concentración de macro y micronutrientes acorde con los VNRC o similares al CNPp.

En tres estudios realizados por Castro-Garibay *et al.* (2018), González *et al.* (2018) y González-Orozco *et al.* (2018) se produjeron plantas de *P. greggii* var. *australis*, *P. cooperi* Blanco y *P. engelmannii* con diferentes sustratos y fertilizantes. En los tratamientos donde se utilizó la misma dosis de Multicote® y sustratos con 60 y 50% de aserrín de pino fresco, se documentó la producción de planta con alturas, diámetros e ICD apropiados; así como concentraciones de N, P, K más bajas que las recomendadas para dichas especies, 0.96, 0.20, 0.42%; 1.1, 0.2, 0.9%; y 1.40, 0.28, 1.2%. En los dos primeros casos las concentraciones de nutrientes resultaron menores que las del tercer caso; lo cual se atribuyó a que la determinación de nutrientes se hizo con muestras de follaje de la parte media de los tallos. En este estudio, en cambio, la

plant production with appropriate heights, diameters and ICD; as well as lower N, P, K concentrations than those recommended for those three species, 0.96, 0.20, 0.42%; 1.1, 0.2, 0.9%; and 1.40, 0.28, 1.2%. In the first two cases, nutrient concentrations were lower than in the third case; this was attributed to the fact that nutrient determinations were made with foliage samples from the middle part of the stems. Whereas in this study the determination was done with all the foliage of the plants evaluated in each treatment.

CONCLUSIONS

Substrates with fresh sawdust from broadleaf trees were useful for producing *Pinus patula* plants with morphological characteristics indicating good quality; similar to substrates with coniferous sawdust. But the substrate with sawdust from *Mangifera indica* was not.

The content of phenols and salts present in the substrates negatively affected the height growth and root dry weight of the plants, as well as the foliar

determinación se hizo con todo el follaje de las plantas evaluadas de cada tratamiento.

CONCLUSIONES

Los sustratos con aserrín fresco de latifoliadas resultaron útiles para producir planta de *Pinus patula* con características morfológicas de buena calidad, al igual que los sustratos con aserrín de coníferas. No así el sustrato con aserrín de *Mangifera indica*.

El contenido de fenoles y de sales presentes en los sustratos afectó en forma negativa el crecimiento en altura y el peso seco radical de las plantas, así como la concentración foliar de nutrientes; a menor cantidad de fenoles y sales, mayor desarrollo y concentración de nutrientes.

Las dosis de los fertilizantes utilizadas resultaron insuficientes para asegurar que las plantas producidos alcanzaran las concentraciones foliares de K, Mg, Ca, Zn y B, recomendadas para coníferas. También respecto a aquellas concentraciones que se presentan en plantas con alturas de 20 a 30 cm, vigorosas, en la regeneración natural de *P. patula*.

LITERATURA CITADA

- Aguilera-Rodríguez, M., A. Aldrete, T. Martínez-Trinidad, y V. M. Ordaz-Chaparro. 2016. Producción de *Pinus montezumae* Lamb. con diferentes sustratos y fertilizantes de liberación controlada. *Agrociencia* 50(1): 107-118.
- Aguilera R., M., A. Aldrete, T. Martínez T., y V. M. Ordaz C. 2016. Producción de *Pinus pseudostrobus* Lindl. con sustratos de aserrín y fertilizantes de liberación controlada. *Rev. Mex. Cienc. For.* 7(34): 7-19. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v7i34.79>
- Aguilera-Rodríguez, M., A. Aldrete, J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, M. A. López-López, y V. M. Ordaz-Chaparro. 2021. Morfología y crecimiento potencial de raíz de *Pinus patula* producido en charolas con poda radical. *Agrociencia* 55(1): 81-97. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i1.2349>
- Alcántar G., G., y M. Sandoval V. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de Muestreo, Preparación, Análisis e Interpretación. Pub. Esp. 10. Soc. Mex. de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, México. 155 p.
- 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. Cienc. For.* 9: 213-223. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i49.171>
- Bremner, J. M. 1965. Total Nitrogen. In: Norman, A.G. (ed.) *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties* No. 9.2. Am. Soc. of Agronomy. Madison, WI, USA, pp. 1149-1178. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c32>
- Castro-Garibay, S. L., A. Aldrete, J. López-Upton, y V. M. Ordaz-Chaparro. 2018. Efecto del envase, sustrato y fertilización en el crecimiento de *Pinus greggii* var. *australis* en vivero. *Agrociencia* 52(1): 115-127.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2017. Objetivo específico 1 del monitoreo y evaluación complementaria de los apoyos de reforestación y suelos 2016. Documento técnico. Guadalajara, Jal., México. pp: 178-187.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2020. El sector forestal mexicano en cifras. Documento técnico. Guadalajara, Jal., México. pp: 91-96.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2020. Información climatológica por estado. <https://smn.conagua.gob.mx/tools/resources/normales5110/normal13094.txt> (Consultado: mayo 2020).
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. González, M. Tablada, y C.W. Robledo. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA. Univ. Nal. Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/> (Consultado: febrero 2020).
- Escamilla H., N., A. Aldrete, J. J. Vargas H., Á. Villegas M., y M. Á. López L. Propagación vegetativa de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. 2020 en diferentes sustratos. *Rev. Fitotec. Mex.* 43: 215-221. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.2.215>
- González O., M. M., J. Á. Prieto R., A. Aldrete, J. C. Hernández D., J. A. Chávez S., y R. Rodríguez L. 2018. Sustratos a base de aserrín crudo con fertilización y la calidad de planta de *Pinus cooperi* Blanco en vivero. *Rev. Mex. Cienc. For.* 9(48): 203-226. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v8i48.125>
- González-Orozco., M. M., J. A. Prieto-Ruiz, A. Aldrete, J. C. Hernández-Díaz, J. A. Chávez-Simental, y R. Rodríguez-Laguna. 2018. Nursery production of *Pinus engelmannii* Carr. with substrates based on fresh sawdust. *Forests* 9(11): 678. <https://doi.org/10.3390/f9110678>
- Hernández-Zárate, L., A. Aldrete, V. M. Ordaz-Chaparro, J. López-Upton, y M. A. López-López. 2014. Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. en vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. *Agrociencia* 48(6): 627-637.

—End of the English version—

---*---

- Landis, T. D. 1985. Mineral nutrition as an index of seedling. In: Duryea, M. L. (ed.) 1985. Evaluating Seedling Quality: Principles, procedures, and predictive abilities of major tests. Oregon State University, Corvallis. OR. USDA, Forest Service. USA. pp: 29-48.
- Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. Mc Donald, and J. P. Barnett. 1990. The Container Tree Nursery Manual. Vol. 2. Containers and growing media. Agricultural Handbook 674. USDA, Forest Service. Washington, DC. 88 p.
- Makkar, H. P. S. 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 102 p. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7>
- Prieto R., J. Á., y J. T. Sáenz R. 2011. Indicadores de calidad de planta en viveros forestales de la Sierra Madre Occidental. Libro Técnico Núm. 3. C. E. Valle del Guadiana. CIRNOC. Inst. Nal. Invest. For. Agric. Pecuarias. Durango, Dgo., México. 210 p.
- Prieto R., J. Á., J. L. García R., J. C. Monárrez G., y R. E. Madrid A. 2012. Producción de Planta del Género *Pinus*. Folleto Técnico Núm. 50. CIRNOC. INIFAP. Durango, Dgo., México. 52 p.
- Rau, B. J., J. F. Browder, B. E. Jackson, and R. D. Wright. 2006. Wood substrates derived from a variety of tree species affect plant growth. SNA Res. 51: 43-45.
- Richmond, F. 2010. Evaluación de distintas materias primas para la producción de almácigo de tomate. Agron. Costarricense 34(1): 85-91.
- SE (Secretaría de Economía). 2016. Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016. Certificación de la operación de viveros forestales. Diario Oficial de la Federación. 17 de febrero de 2016. México, D. F. pp: 17-28.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2021. Anuario Estadístico de la Producción Forestal 2018. México, D. F. pp: 69-118.
- Zavala Z., D., y R. Hernández C. 2000. Análisis del rendimiento y utilidad del proceso de aserrío de trocería de pino. MyB 6(2): 41-155. <https://doi.org/10.21829/myb.2000.621374>

PREDICCIÓN DEL PRECIO DE MAÍZ EN MÉXICO

PRICE FORECAST FOR MAIZE IN MEXICO

María del Rosario **López-García**¹, Miguel Ángel **Martínez-Damián**^{2*}, José Jaime **Arana-Coronado**²

¹División de Ciencias Económico-Administrativas, Universidad Autónoma Chapingo, 56230. Chapingo, Estado de México. ²Economía, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, 56230. Montecillo, México.

***Autor para correspondencia:** Miguel Ángel Martínez Damián (angel01@colpos.mx)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1215-7406>

RESUMEN

El maíz (*Zea mays*) es el cereal más importante en México porque es una parte esencial en la dieta de los mexicanos y tiene importancia económica en producción pecuaria e industrial. Los productores se enfrentan a la volatilidad en los precios del grano y a la falta de información porque en México no existe una señal del comportamiento de los precios futuros de maíz blanco. Bajo la hipótesis de que los precios de Estados Unidos tienen influencia sobre los precios de maíz en México, el objetivo de esta investigación fue construir estimadores de predicción del precio de maíz blanco con series de precios del Estado de México y Sinaloa. Los datos fueron del periodo de 2000 a 2018 y se usó la metodología Box-Jenkins con los modelos, autorregresivo integrado de media móvil (ARIMA), vectores autorregresivos (VAR) y vectores de corrección de error (VEC) con los datos mexicanos y con series de precios de futuros de maíz y precios de maíz en físico de Estados Unidos. Los modelos multivariados proporcionaron pronósticos más cercanos a los valores observados debido a la influencia de los precios de Estados Unidos sobre los precios de México. La capacidad predictiva de los modelos se evaluó con el error porcentual medio absoluto (MAPE) y el coeficiente U de Theil. El modelo VAR proporcionó predicciones del precio en Sinaloa con MAPE y U de Theil menores; en cambio con la serie del Estado de México el modelo ARIMA tuvo pronósticos con valores menores de error porcentual absoluto medio y U de Theil. Entonces, existe influencia de los precios de Estados Unidos sobre los precios de Sinaloa; pero el uso de modelos multivariados no es determinante para obtener pronósticos más cercanos a los valores observados.

Palabras clave: importaciones de maíz, modelos predictores, ARIMA, VAR, VEC, coeficiente de Theil.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays*) is the most important grain in Mexico because it is an essential part of the Mexican diet and it has economic importance in both livestock and industrial production. Farmers face volatility in grain prices and lack of information because there is no predictive signal of futures price for white maize in Mexico. Under the hypothesis that United States prices have an influence on maize prices in Mexico, the objective of this research was to build white-maize price forecasting estimators with price series from the State of Mexico and Sinaloa. Data were from the period 2000 to 2018 and the Box-Jenkins methodology with the Autoregressive Integrated Moving Average (ARIMA), Vector Autoregression (VAR) and Vector Error correction (VEC) models were used on the Mexican data, and the series of maize futures prices and US physical maize prices. Multivariate models provided forecasts closer to the observed values due to the influence of US prices on Mexican prices. The predictive capacity of the models was evaluated with the mean absolute percentage error (MAPE) and Theil's U coefficient. The VAR model provided price predictions in Sinaloa with lower MAPE and Theil's U; whereas with the series of the State of Mexico, the ARIMA model rendered forecasts with lower values of mean absolute percentage error and Theil's U. Thus, there is influence of US prices on Sinaloa prices; but the use of multivariate models is not decisive to obtain closer forecasts to the observed values.

Key words: maize imports, predictive models, ARIMA, VAR, VEC, Theil coefficient.

INTRODUCTION

Maize (Corn) had an 89% national share in grain production in 2018 (SIAP, 2019). In 2015, 85.9% of the national corn production corresponded to white corn, 13.6% to

INTRODUCCIÓN

El maíz tuvo el 89% de participación nacional en la producción de granos en 2018 (SIAP, 2019). En 2015, el 85.9% de la producción nacional de maíz correspondió a maíz blanco, 13.6% a maíz amarillo y el restante 0.5% a otros tipos de maíz (FIRA, 2016). Como producto agrícola está sujeto a factores inherentes al proceso productivo que causan volatilidad en sus precios y los productores se enfrentan a la falta de información sobre el comportamiento de los mercados. Uno de estos factores es la estacionalidad de la producción que, en el caso del maíz blanco en México, se relaciona con los periodos de cosechas de las tres principales entidades productoras del país, las cuales cosechan la producción por estado en meses distintos. Sinaloa entre mayo y julio, Jalisco, entre noviembre y febrero y el Estado de México, entre noviembre y enero. Otro factor que influye en el precio son las condiciones climáticas, como las sequías, las cuales provocan disponibilidad baja del producto y volatilidad en los precios (FIRA, 2015).

En 2017, la producción mundial de maíz se concentró en cuatro países: Estados Unidos, Brasil, Argentina y Ucrania. Asimismo, China, la Unión Europea e Indonesia han incrementado su participación en el mercado internacional. Por otra parte, Estados Unidos tiene el nivel más alto en la utilización de maíz en el mundo, 312.4 millones de toneladas (Megagramos, Mg), destinado a consumo forrajero, industrial (producción de etanol), semilla y consumo humano. El consumo total nacional de maíz en México es de 43.7 millones Mg, 56.7% de maíz blanco (24.8 millones Mg) y 43.35% de maíz amarillo (18.9 millones Mg). La producción de maíz amarillo en México no es suficiente para satisfacer la demanda, en 2018 se importaron 17.0 millones Mg, el 93.5% del consumo; en tanto que se exportaron 822 mil Mg de maíz blanco. Estados Unidos ha sido el principal proveedor de maíz grano de nuestro país. Entre 2009 y 2018 el 96.4% de las importaciones de maíz provinieron de esa nación (FIRA, 2019). Los principales socios comerciales de México en la adquisición de este grano son Estados Unidos, Brasil y Argentina (SIAP, 2019).

En México, el maíz blanco y amarillo son requerimientos de industrias diferentes. El maíz blanco tiene como destino principal la industria alimentaria y el

yellow corn, and the remaining 0.5% to other types of corn (FIRA, 2016). As an agricultural product, it is subject to factors inherent to the production process that cause volatility in its prices and farmers face lack of information on the behaviour of the markets. One of these factors is the production seasonality, which, in the case of white corn in Mexico, is related to the harvest periods of the three main producing states in the country, which harvest their production in different months. Sinaloa between May and July; Jalisco, between November and February; and the State of Mexico, between November and January. Another factor that influences the price is climatic conditions, such as droughts, which cause low availability of the product and price volatility (FIRA, 2015).

In 2017, world maize (corn) production was concentrated in four countries: United States, Brazil, Argentina and Ukraine. Likewise, China, the European Union and Indonesia have increased their participation in the international market. On the other hand, the United States has the highest level in the use of corn in the world, 312.4 million tons (Megagrams, Mg), destined for fodder, industrial (ethanol production), seed and human consumption. The total national consumption of corn in Mexico is 43.7 million Mg, 56.7% of white corn (24.8 million Mg) and 43.35% of yellow corn (18.9 million Mg). The production of yellow corn in Mexico is not enough to satisfy the domestic demand; in 2018, 17.0 million Mg were imported, 93.5% of consumption; while 822 thousand Mg of white corn were exported. United States has been the main supplier of corn to our country. Between 2009 and 2018, 96.4% of corn imports arrived from that nation (FIRA, 2019). The main commercial partners of Mexico in the acquisition of this grain are the United States, Brazil and Argentina (SIAP, 2019).

In Mexico, white and yellow corn are treated by different industries. The main destination for white corn is the food industry, while yellow corn is used in both livestock and agro-industrial activities. The two types of corn have different consumptions, and the factors that influence the price are different. In the period 2009 to 2018, the average rural price of white corn in Mexico was higher than that of yellow corn. In 2018, the price of yellow corn was 182 USD Mg⁻¹ (\$3649 MXN Mg⁻¹), and white corn had a price of 194 USD Mg⁻¹ (\$3890 MXN

amarillo se utiliza en actividades ganaderas y agroindustriales. Los dos tipos de maíz tienen consumos distintos, y los factores que influyen en el precio son diferentes. En el periodo 2009 a 2018 el precio medio rural de maíz blanco en México fue superior al precio de maíz amarillo. En 2018, el precio de maíz amarillo fue de \$3649 MXN Mg⁻¹ (182 USD Mg⁻¹) y el maíz blanco tuvo un precio de \$3890 MXN Mg⁻¹ (194 USD Mg⁻¹). Los precios del maíz blanco están contemplados en las políticas públicas, en programas nacionales como “Producción para el bienestar” y “Precios de garantía” debido a su uso para la producción de tortilla y otros productos de consumo doméstico de la población (FIRA, 2019; SIAP, 2019). En cambio, las estrategias políticas respecto al maíz amarillo están encaminadas a la diversificación de proveedores para asegurar fuentes distintas a la de Estados Unidos.

Además, el maíz amarillo está sujeto a factores como: inventarios mundiales, cambios en la demanda internacional, tipo de cambio y especulación sobre el comportamiento de los precios de futuros. Los precios de maíz en el mercado spot y de futuros del maíz amarillo, los cuales cotizan en la bolsa de valores (Chicago Mercantile Exchange) de Chicago (EE UU), se han tomado como predictores del precio de maíz blanco y amarillo en México, desde el año 2012 y se toman en cuenta los diferenciales de precios debido a costos de comercialización. También existen otros instrumentos derivados como los contratos de futuros que ofrece el mercado mexicano de derivados (MEXDER) sobre precios de maíz amarillo. Sin embargo, el maíz blanco no cuenta con un instrumento financiero similar al utilizado para el maíz amarillo. La balanza deficitaria de maíz es evidencia de la influencia del mercado internacional sobre el mercado interno; por ello es conveniente para la construcción de un predictor del precio de maíz blanco, incorporar información del mercado externo.

De las entidades productoras nacionales, la participación mayor en la producción de maíz blanco la tienen el Estado de México con 3.8 millones Mg (14% del total de la producción nacional) y Sinaloa con 5.8 millones Mg (21.4% del total de la producción nacional). En esta investigación se utilizaron series de precios de esos estados para la construcción de modelos para probar la hipótesis de que los precios de maíz de Estados Unidos tienen influencia sobre los precios de maíz en México. Si la hipótesis prueba ser

Mg⁻¹). The prices of white corn are considered in public policies, such as national subsidiary or market regulation programs “Producción para el bienestar” and “Precios de garantía”; which are planned due to white corn is used for the production of tortillas and other products for domestic consumption of the population (FIRA, 2019; SIAP, 2019). Whereas, policy strategies regarding yellow corn are aimed at diversifying suppliers to ensure sources other than the United States.

In addition, yellow corn is subject to factors such as: world inventories, changes in international demand, currency exchange rates, and speculation on the behaviour of futures prices. Corn prices in the spot market and yellow corn futures prices market, which are listed on the Chicago Mercantile Exchange (Chicago, IL, USA), have been taken as predictors of the price of white and yellow corn in Mexico since 2012; price differentials due to marketing costs are taken into account. There are also other derivative instruments such as futures contracts offered by the Mexican derivatives market (MEXDER) on yellow corn prices. However, white corn has no financial instrument similar to that used for yellow corn. The deficit balance of corn is evidence of the influence from the international market on the domestic market. For this reason, it is convenient, in order to construct a white corn price predictor, to incorporate information from the external market.

Of the national producing entities, the highest participation in the production of white corn is held by the State of Mexico with 3.8 million Mg (14% of the total national production), and Sinaloa with 5.8 million Mg (21.4% of the total national production). In this study, series of prices from those states were used for the construction of models to test the hypothesis that US corn prices have an influence on corn prices in Mexico. If the hypothesis proves to be true, multivariate vector autoregression models (VAR) with vector error correction (VEC) will provide forecasts with lower prediction errors, measured by the mean absolute percentage error and Theil's U coefficient, compared to the predictions from a univariate model.

The objective of this study was to construct predictors for the prices of white corn through the univariate autoregressive integrated moving average model (ARIMA), and the multivariate VAR and VEC models with the price series of the State of

cierta, los modelos multivariados de vectores autorregresivos (VAR) con vectores de corrección de error (VEC) proporcionarán pronósticos con errores de predicción menores, medidos por el error porcentual medio absoluto y la U de Theil, en comparación con las predicciones de un modelo univariado.

El objetivo del estudio fue construir predictores para los precios de maíz blanco a través del modelo univariado autorregresivo integrado de media móvil (ARIMA) y los modelos multivariados VAR y VEC con las series de precios del Estado de México y Sinaloa para seleccionar el modelo que proporcione estimadores de predicción de los precios del maíz blanco en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos de los precios promedio mensuales de maíz blanco del Estado de México y Sinaloa, expresados en pesos por kilogramo (\$MXN kg⁻¹) se tomaron del portal del Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM) para usarse en el modelo ARIMA. En los modelos VAR y VEC se incorporaron los precios de futuros de maíz amarillo (precio de liquidación mensual promedio del contrato de futuros de maíz más cercano) y los precios de maíz en físico (precios promedio mensuales de maíz amarillo número 2, FOB en el Golfo de México), obtenidos del sitio de internet del departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA, 2020).

Los precios se transformaron de dólares USD por bushel a pesos por kilogramo (\$MXN kg⁻¹), al tipo de cambio FIX. El periodo de análisis fue de enero 2000 a diciembre 2018; se realizó una partición del conjunto de datos de cada serie en dos subconjuntos (Enders, 2015). Los datos de enero 2000 a junio 2018 se usaron para ajustar los modelos y los datos de julio a diciembre 2018 se utilizaron para evaluar la capacidad predictiva de los modelos.

Modelo ARIMA

El modelo univariado autorregresivo integrado de media móvil (ARIMA, Autoregressive Integrate Moving Average) es un modelo en el cual $\{Y_t\}$ es un proceso ARIMA (p, d, q) [Box y Jenkins, 1976] donde p denota el número de términos autorregresivos, q el número de términos con promedios móviles; y d es el número de diferencias requeridas para que el proceso sea estacionario. Todos los anteriores bajo el principio de parsimonia (Box *et al.*, 2016) que puede representarse como:

$$Y_t = \phi_1 y_{t-1} + \phi_2 y_{t-2} + \dots + \phi_p y_{t-p} + \varepsilon_t - \theta_1 \varepsilon_{t-1} - \theta_2 \varepsilon_{t-2} - \dots - \theta_q \varepsilon_{t-q} \quad (1)$$

Mexico and Sinaloa to select the model that may provide predictive estimators of white corn prices in Mexico.

MATERIALS AND METHODS

The average monthly prices of white corn for the State of Mexico and Sinaloa, expressed in pesos per kilogram (\$ MXN kg⁻¹) were taken from the website of the Mexico's National market information and integration system (Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados, SNIIM) to be used in the ARIMA model. In the VAR and VEC models, the yellow corn futures prices (average monthly settlement price of the closest corn futures contract) were incorporated, as well as the spot corn prices (monthly average prices of yellow corn number 2, FOB in the Gulf of Mexico), obtained from the United States Department of Agriculture website (USDA, 2020).

Prices were transformed from USD per bushel to MXN pesos per kilogram (\$MXN kg⁻¹), at the FIX exchange rate. The analysis period was from January 2000 to December 2018. A data set of each series was partitioned into two subsets (Enders, 2015). Data from January 2000 to June 2018 were used to fit the models, and data from July to December 2018 were used to assess the predictive capacity of the models.

ARIMA model

The Autoregressive Integrate Moving Average (ARIMA) univariate model is one in which $\{Y_t\}$ is an ARIMA process (p, d, q) [Box and Jenkins, 1976]; where p denotes the number of autoregressive terms, q the number of moving average terms; and d the number of differences required for the process to be stationary. All of the above under the principle of parsimony (Box *et al.*, 2016) that can be represented as:

$$Y_t = \phi_1 y_{t-1} + \phi_2 y_{t-2} + \dots + \phi_p y_{t-p} + \varepsilon_t - \theta_1 \varepsilon_{t-1} - \theta_2 \varepsilon_{t-2} - \dots - \theta_q \varepsilon_{t-q} \quad (1)$$

where, ε_t denotes the white noise random error terms, independently distributed with zero mean and σ^2 variance. The adjustment of the ARIMA models was done with the Box-Jenkins methodology: verification of stationarity conditions in the series, identification of the values p , d and q , diagnosis, validation and prediction (Pankratz, 1983).

VAR models

The vector autoregression (VAR) models developed by Sims (1980 and 1986) are based on a vector structure that assumes an interdependence between the model variables and their lags.

donde, ε_t denota los términos de error aleatorio de ruido blanco, distribuidos de forma independiente con media cero y varianza σ^2 . El ajuste de los modelos ARIMA se realizó con la metodología de Box-Jenkins: verificación de condiciones de estacionariedad en la serie, identificación de los valores p , d y q , diagnóstico, validación y predicción (Pankratz, 1983).

Modelos VAR

Los modelos de vectores autorregresivos (VAR) desarrollados por Sims (1980 y 1986) se fundamentan en una estructura vectorial que supone una interdependencia entre las variables del modelo y sus rezagos, de esta forma, un modelo VAR (p) es un sistema en el que cada variable se expresa como una combinación lineal de p de sus propios valores rezagados y de p valores rezagados de las otras variables en el modelo. Los modelos VAR son una generalización de los modelos autorregresivos en su forma multivariada y pueden definirse como:

$$y_t = \phi_0 + \phi_1 y_{t-1} + \dots + \phi_p y_{t-p} + \varepsilon_t \quad (2)$$

donde, y_t es un vector de dimensión ($m \times 1$) que contiene cada una de las variables incluidas en el modelo, ϕ_0 es un vector de términos de intercepción de dimensión ($m \times 1$), ϕ_i , $i=1 \dots p$, son matrices de dimensión ($m \times m$) por estimar y ε_t es un vector de perturbaciones de ruido blanco de dimensión ($m \times 1$).

Modelos VEC

Un modelo de vectores de corrección de errores (VEC) para las variables integradas I(1) necesariamente implica cointegración, esto está determinado por el teorema de representación de Granger (Engle y Granger, 1987). Puede representarse a partir dos variables y_t y z_t no estacionarias, cointegradas por medio de la ecuación: $Y_t - \beta_1 z_t + \varepsilon_t$, donde los errores estimados son: $\hat{\varepsilon}_t = Y_t - \hat{\beta}_1 z_t$, tal que $\hat{\varepsilon}_t \sim I(0)$ y los cambios en y_t y z_t dependen de las desviaciones de este equilibrio en el periodo $t-1$. Esto es: $\Delta X_t = \Pi X_t + \sum_{i=1}^{p-1} \Gamma \Delta X_i$, donde: $\Pi = \alpha\beta'$.

La cointegración por el método de Johansen se probó al contrastar que los estadísticos de la traza y los eigenvalores máximos sean mayores a los valores críticos. La estimación de los parámetros de los modelos VEC se realizó por medio del método de máxima verosimilitud (Lütkepohl, 2005) y la verificación de autocorrelación en los residuales de forma grupal se realizó a través de la estadística de Ljung-Box, como sugirieron Cryer y Sik (2008).

El coeficiente de exactitud U de Theil y el error porcentual absoluto medio (MAPE) se calcularon para evaluar la capacidad predictiva de los modelos (Makridakis *et al.*, 1997), con el uso de

Thus, a VAR model (p) is a system in which each variable is expressed as a linear combination of p of its own lagged values and p lagged values of the other variables in the model. VAR models are a generalization of autoregressive models in their multivariate form and can be defined as:

$$y_t = \phi_0 + \phi_1 y_{t-1} + \dots + \phi_p y_{t-p} + \varepsilon_t \quad (2)$$

where, y_t is a vector with ($m \times 1$) dimension that contains each of the variables included in the model, ϕ_0 is a vector of intercept terms with ($m \times 1$) dimension, ϕ_i , $i=1 \dots p$, are ($m \times m$) dimension matrices to be estimated, and ε_t is a white noise disturbance vector with ($m \times 1$) dimension.

VEC models

A vector error correction model (VEC) for the integrated variables I(1) necessarily implies cointegration; this is determined by the Granger representation theorem (Engle and Granger, 1987). It can be represented from two non-stationary variables y_t and z_t , cointegrated by the equation: $Y_t - \beta_1 z_t + \varepsilon_t$, where the estimated errors are: $\hat{\varepsilon}_t = Y_t - \hat{\beta}_1 z_t$, such that $\hat{\varepsilon}_t \sim I(0)$, and the changes in y_t and z_t depend on the deviations from this equilibrium in the period $t-1$. This is: $\Delta X_t = \Pi X_t + \sum_{i=1}^{p-1} \Gamma \Delta X_i$; where: $\Pi = \alpha\beta'$.

Cointegration was tested using the Johansen method, by contrasting that the trace statistics and the maximum eigenvalues are greater than their critical values. The estimation of the parameters of the VEC models was calculated by the maximum likelihood method (Lütkepohl, 2005) and the verification of autocorrelation in the group residuals was done through the Ljung-Box statistic, as Cryer and Sik (2008) suggested.

Theil's U coefficient of accuracy and the mean absolute percentage error (MAPE) were calculated to evaluate the predictive capacity of the models (Makridakis *et al.*, 1997), using the data observed from July to December 2018 and the predicted values obtained. The estimation of the parameters, the statistical tests, and the criteria to evaluate the predictive capacity were set and run in R v. 3.6.1 (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.6.1/>) and SAS® (2019).

RESULTS AND DISCUSSION

The series showed an upward trend and periods of volatility after 2007, which were accentuated a few years after 2010. Corn prices in Mexico increased in 2011 and 2012 due to the low availability of the grain in the national market because of the drought and severe aestival conditions that prevailed in almost

los datos observados de julio a diciembre 2018 y los valores predichos obtenidos. La estimación de los parámetros, las pruebas de estadísticas y los criterios para evaluar la capacidad predictiva se realizaron con R v. 3.6.1 (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.6.1/>) y SAS® (2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las series mostraron tendencia al alza y periodos de volatilidad después de 2007, los cuales se acentuaron en los años después de 2010. Los precios del maíz en México se incrementaron en 2011 y 2012 debido a la poca disponibilidad del grano en el mercado nacional ante la sequía y condiciones de estiaje que prevalecieron en casi todo el país en esos años. A partir del 2013 los precios al productor presentaron una tendencia a la baja ante periodos de producción más favorables (FIRA, 2015).

El comportamiento de las series sugiere que son no estacionarias (Figura 1); las pruebas de Dickey Fuller aumentada (DFA) y Phillips Perron indicaron que la serie correspondiente al precio de maíz blanco en el estado de Sinaloa (PSINALOA) es estacionaria en niveles y la serie de precios del Estado de México (PMEXICO) es integrada de orden uno I(1) (Cuadro 1).

the entire country in those years. Starting in 2013, settlement prices to farmers showed a downward trend due to more favourable production periods (FIRA, 2015).

The behaviour of the series suggests that they are non-stationary (Figure 1); the augmented Dickey Fuller (DFA) and Phillips Perron tests indicated that the series corresponding to the price of white corn in the state of Sinaloa (PSINALOA) is stationary in levels, and the price series of the State of Mexico (PMEXICO) is an integrated of order one I(1) (Table 1).

The adjustment of ARIMA models is conditioned to stationary series. Therefore, the series were transformed to natural logarithm and first difference to induce stationarity in mean and variance finite and constant in regard to time; as well as finite covariance that depends on time in the definition of autoregressive process. (Quintana y Mendoza, 2016). The stationary series transformed into logarithms and differences were named as: $\Delta \ln(\text{PMEXICO})$ and $\Delta \ln(\text{PSINALOA})$, where Δ denotes the first difference operator (Table 1).

An ARIMA (1, 0, 1) model was fitted to each of the transformed series with the simple and partial autocorrelation functions to choose the p and q values. The selected model was the one that presented



Figura 1. Comportamiento original de las series de precios de maíz blanco[†] en el estado de México y Sinaloa en \$ kg⁻¹. [†]A partir de datos de SNIIM (<http://www.economia-sniim.gob.mx>; consulta: enero 2019).

Figure 1. Original behaviour of the price series for white corn[†] in the State of Mexico and Sinaloa in \$ kg⁻¹. [†]Based on data from the SNIIM (<http://www.economia-sniim.gob.mx>; consulted: January 2019).

Cuadro 1. Prueba de Dickey Fuller aumentada (DFA) y Phillips Perron (PP) para las series de precios de maíz en el estado de México y Sinaloa.
Table 1. Augmented Dickey Fuller (DFA) and Phillips Perron (PP) tests for the series of corn prices in the State of Mexico and Sinaloa.

Serie	Estadística de Prueba		Orden de integración
	H_0 : Existe raíz unitaria	H_a : No existe raíz Unitaria	
	DFA Pr < Tau	PP Pr < Tau	
PMEXICO	0.199	0.222	I (1)
$\Delta \text{Ln}(\text{PMEXICO})^\dagger$	0.0005	<0.0001	I(0)
PSINALOA	0.053	0.019	I (0)
$\Delta \text{Ln}(\text{PSINALOA})^\dagger$	<0.0001	0.001	I(0)

$^\dagger \Delta$ operador de primeras diferencias. ♦ $^\dagger \Delta$ first difference operator.

El ajuste de modelos ARIMA está condicionado a series estacionarias. Por ello las series se transformaron a logaritmo natural y primera diferencia para inducir estacionariedad en media y varianza finitas y constantes respecto al tiempo, y covarianza finita que dependa del tiempo en la definición de proceso autorregresivo (Quintana y Mendoza, 2016). Las series estacionarias transformadas en logaritmos y diferencias se nombraron como: $\Delta \text{Ln}(\text{PMEXICO})$ y $\Delta \text{Ln}(\text{PSINALOA})$, donde Δ denota el operador de primeras diferencias (Cuadro 1).

Un modelo ARIMA (1, 0, 1) se ajustó a cada una de las series transformadas con las funciones de autocorrelación simple y parcial para elegir los valores de p y q . El modelo seleccionado fue el que presentó valor menor de los criterios AIC. En la fase de diagnóstico de los modelos se aplicó la prueba Ljung-Box a los residuales para probar la no autocorrelación, como sugirieron Makridakis *et al.* (1997). De acuerdo con el valor $p \geq 0.05$ asociado con la prueba no se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, no existe autocorrelación en los errores (Cuadro 2).

Modelos VAR

Las series de precios de maíz en físico y precios de futuros mostraron tendencia ascendente, pero no mostraron medias y varianzas constantes; por lo tanto, las series se suponen no estacionarias. El orden de integración de las series se verificó con base en las pruebas Dickey Fuller aumentada (DFA) y Phillips Perron (PP) y se determinó que la serie de precios de futuros (PRECIO FUTURO) es estacionaria y la serie de

the lowest value of the AIC criteria. In the diagnostic phase of the models, the Ljung-Box test was applied to the residuals to test the non-autocorrelation, as Makridakis *et al.* (1997) suggested. According to the $p \geq 0.05$ value associated with the test, the null hypothesis is not rejected, therefore, there is no autocorrelation in the errors (Table 2).

VAR models

The series of spot corn prices and futures prices showed an upward trend but did not show constant means and variances; therefore, the series are assumed to be non-stationary. The order of integration of the series was verified based on the augmented Dickey Fuller (DFA) and Phillips Perron (PP) tests and it was determined that the futures price series (PRECIO FUTURO) is stationary and the series of spot corn prices (PRECIO FISICO) presents unitary root (Table 3).

In a strict sense, in a VAR model all the variables must be stationary together (Gujarati and Porter 2010). In order to do this VAR models were established with the stationary series. The US spot corn price series was transformed with a first differentiation and renamed Δ (PRECIO FISICO), to compare it with the PRECIO FUTURO series (Figure 2).

The length of the lag included in the model denoted by p was selected based on the Akaike, Hannan Quinn (HQ) and Schwarz (Morán, 2014) criteria; the smallest values of those criteria were taken. The optimal lag was established as $p=2$ for the prices of the State of Mexico and $p=1$ for the state of

Cuadro 2. Prueba de Ljung-Box a los residuales de los modelos ARIMA.
Table 2. Ljung-Box test on the residuals of the ARIMA models.

Serie	Modelo ajustado	Ljung-Box test
		H_0 : no existe autocorrelación
$\Delta \text{Ln}(\text{PMEXICO})^\dagger$	ARIMA (1, 0, 1)	$Q^* = 16.378$, $df = 21$, p-value = 0.748
$\Delta \text{Ln}(\text{PSINALOA})^\dagger$	ARIMA (1, 0, 1)	$Q^* = 16.109$, $df = 21$, p-value = 0.763

$^\dagger \Delta$ operador de primeras diferencias. $\diamond \Delta$ first difference operator.

precios de maíz en físico (PRECIO FISICO) presenta raíz unitaria (Cuadro 3).

En un sentido estricto, en un modelo VAR todas las variables deben ser estacionarias en forma conjunta (Gujarati y Porter, 2010). En atención a esto, se establecieron los modelos VAR con las series estacionarias. La serie del precio de maíz en físico de Estados Unidos se transformó con una primera diferenciación y se nombró como Δ (PRECIO FISICO), para compararla con la serie PRECIO FUTURO (Figura 2).

La longitud del rezago incluido en el modelo denotado por p se seleccionó con base en los criterios Akaike, Hannan Quinn (HQ) y Schwarz (Morán, 2014) y se tomaron los valores más pequeños de estos criterios. El rezago óptimo se estableció como $p=2$ y $p=1$ para los precios del estado de México y Sinaloa, respectivamente. El modelo VAR (2) para el precio del Estado de México se definió como:

$$\begin{aligned} \Delta PMEX_t &= \phi_0 + \phi_1 \Delta PMEX_{t-1} + \phi_2 \Delta PFIS_{t-1} + \phi_3 \Delta PFUT_{t-1} + \phi_4 \\ \Delta PMEX_{t-2} &+ \phi_5 \Delta PFIS_{t-2} + \phi_6 \Delta PFUT_{t-2} + \varepsilon_t \end{aligned} \quad (3)$$

Sinaloa. The VAR (2) model for the price of the State of Mexico was defined as:

$$\begin{aligned} \Delta PMEX_t &= \phi_0 + \phi_1 \Delta PMEX_{t-1} + \phi_2 \Delta PFIS_{t-1} + \phi_3 \Delta PFUT_{t-1} + \phi_4 \\ \Delta PMEX_{t-2} &+ \phi_5 \Delta PFIS_{t-2} + \phi_6 \Delta PFUT_{t-2} + \varepsilon_t \end{aligned} \quad (3)$$

where, Δ is the difference operator, $PMEX$ is the price of corn in the State of Mexico, $PFIS$ is the spot price of corn in the United States, $PFUT$ is the futures price, ϕ_0 is the intercept parameter, and ϕ_i are parameters to be estimated.

The VAR model for the price of corn in Sinaloa was established in a similar way, but with $p=1$. Then the parameters were estimated, and the respective diagnoses were made. Some forecasts were generated out of the sample for the months July to December 2018, and were compared with the data of the validation set. The p-value ≥ 0.05 of the Ljung-Box test indicated the non-autocorrelation of the errors in the VAR models (Table 4).

Cuadro 3. Prueba de Dickey Fuller aumentada (DFA) y Phillips Perron (PP) para las series de precios de maíz en físico (PRECIO FISICO) y precios de futuros (PRECIO FUTURO).

Table 3. Augmented Dickey Fuller (DFA) and Phillips Perron (PP) test for the series of (PRECIO FISICO) spot corn prices and futures prices (PRECIO FUTURO).

Serie	Estadística de Prueba		Orden de integración
	H_0 : Existe raíz unitaria H_a : No existe raíz Unitaria		
	DFA Pr < Tau	PP Pr < Tau	
PRECIO FISICO	0.258	0.117	I (1)
Δ (PRECIO FISICO) [†]	<0.0001	<0.0001	I (0)
PRECIO FUTURO	0.033	0.032	I (0)

$^\dagger \Delta$ operador de primeras diferencias. $\diamond \Delta$ first difference operator.

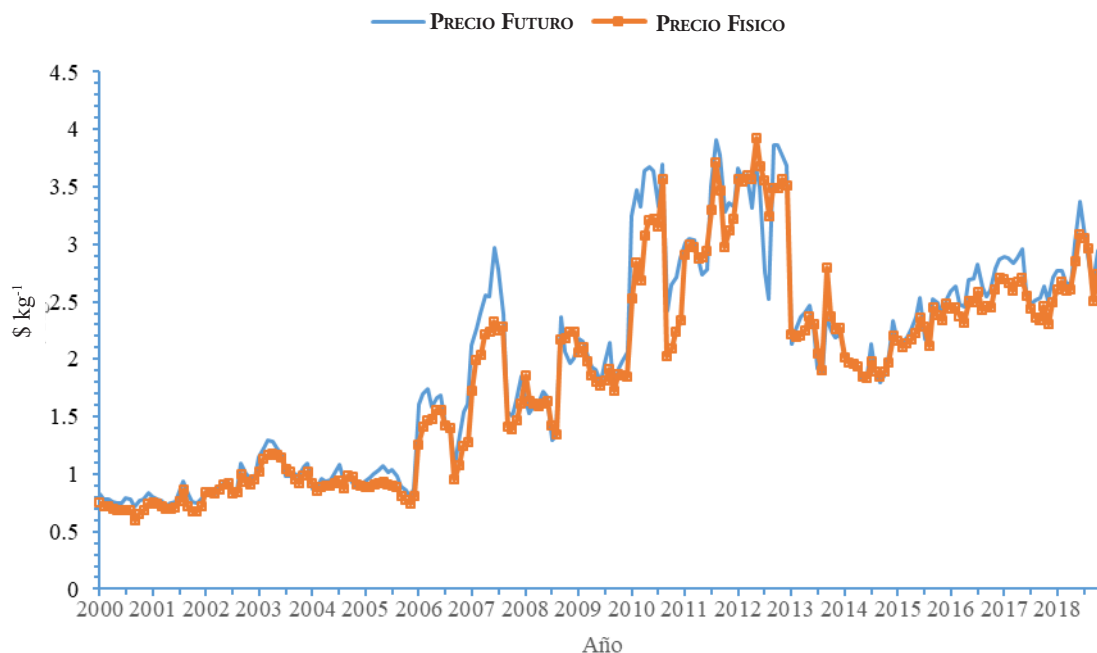


Figura 2. Comportamiento original de las series[†] de precios de futuros y precio de maíz en físico (FOB) en MXN \$ kg⁻¹. [†]A partir de datos de USDA (2020) y BANXICO (2020).

Figure 2. Original behaviour of the series[†] of futures prices and spot corn prices (FOB) in MXN \$ kg⁻¹. [†]Based on data USDA (2020) and BANXICO (2020).

donde, Δ es el operador de diferencias, $PMEX$ es el precio de maíz en el Estado de México, $PFIS$ es el precio de maíz en físico en Estados Unidos, $PFUT$ es el precio de futuros, ϕ_0 es el parámetro de intercepto y ϕ_i son parámetros por estimar.

El modelo VAR para el precio de maíz en Sinaloa se estableció de manera análoga, pero con $p=1$. Después se estimaron los parámetros y se realizaron los diagnósticos respectivos. Algunos pronósticos se generaron fuera de la muestra para los meses de julio a diciembre 2018 y se compararon con los datos del conjunto de validación. El p-valor ≥ 0.05 de la prueba de Ljung-Box indicó la no autocorrelación de los errores en los modelos VAR (Cuadro 4).

Modelos VEC

La construcción de un modelo de vectores de corrección de error (VEC) requiere el establecimiento del orden de integración $I(d)$ y la existencia de co-integración bajo el enfoque del teorema de Granger (Maparu y Mazumder, 2017). El modelo VEC para

VEC models

The construction of a vector error correction model (VEC) requires the establishment of the order of integration $I(d)$ and the existence of cointegration under the approach of the Granger theorem (Maparu and Mazumder, 2017). The VEC model to predict the price of corn in the State of Mexico was defined as:

$$\Delta PMEX = \alpha PMEX + \beta_{11}(\Delta PMEX) + \beta_{12}(\Delta PFIS) - \Pi_{11} \hat{\varepsilon}_{t-1}^{PMEX} + \varepsilon_{PMEX} \quad (4)$$

where, Δ is the difference operator, $PMEX$ is the price of corn in the State of Mexico, $PFIS$ is the spot price of corn in the United States, α is an intercept parameter to be estimated, β 's are parameters to be estimated, Π is the cointegrating vector, ε 's are errors resulting from the regression model: $PMEX - \alpha + \beta PFIS + \varepsilon$ lagged one period, and ε 's are the estimated error terms.

A procedure analogous to that performed in the VAR models was followed to determine the

Cuadro 4. Prueba de Ljung-Box para los residuales de los modelos VAR.
Tabla 4. Ljung-Box test for the residuals of the VAR model.

Variables	Modelo ajustado	Ljung-Box test H_0 : No existe autocorrelación
$\Delta PMEX$ $\Delta PFIS$ $PFUTURO^\dagger$	VAR (2)	X-squared = 0.192, df = 1 p-value = 0.660
$PSINALOA$ $\Delta PFIS$ $PFUTURO^\dagger$	VAR (1)	X-squared = 0.00048, df = 1 p-value = 0.982

$^\dagger \Delta$ denota el operador de primeras diferencias. $\diamond$ $^\dagger \Delta$ first difference operator.

predecir el precio de maíz en el Estado de México se definió como:

$$\Delta PMEX = \alpha PMEX + \beta_{11}(\Delta PMEX) + \beta_{12}(\Delta PFIS) - \Pi_{11} \hat{\varepsilon}_{t-1}^{PMEX} + \varepsilon_{PMEX} \quad (4)$$

donde, Δ es el operador de diferencias, $PMEX$ es el precio de maíz en el Estado de México, $PFIS$, es el precio de maíz en físico en Estados Unidos, α es un parámetro de intercepto por estimar, β 's son parámetros por estimar, Π es el vector cointegrante, ε 's son errores resultantes del modelo de regresión: $PMEX - \alpha + \beta PFIS + \varepsilon$ rezagados un periodo y ε 's son los términos de error estimados.

Un procedimiento análogo al realizado en los modelos VAR se siguió para la determinación del orden $p=2$ (Jiang y Liu, 2011); y se realizó la prueba de cointegración de Johansen (Guerrero, 2007; Godínez y Fuentes, 2008) para establecer la existencia de relaciones de cointegración entre las variables en niveles, dicha prueba indicó que existe al menos una relación de cointegración (Cuadro 5).

order $p=2$ (Jiang and Liu, 2011); and the Johansen cointegration test (Guerrero, 2007; Godínez and Fuentes, 2008) was done to establish the existence of cointegration relationships among the variables in levels; this test indicated that there is at least one cointegration relationship (Table 5).

With the Ljung-Box statistic applied to the residuals, no errors autocorrelation was found (Table 6). The corn prices observed in the State of Mexico were compared with the out-of-sample forecasts for the months July to December 2018, obtained with the VEC model.

Assessment of predictive capacity

Theil's U coefficient and the mean absolute percentage error (MAPE) were calculated from the observed values and the forecasted values obtained by the ARIMA, VAR and VEC models (Table 7). Theil's U coefficient is a measure that ranges from zero to one. If the Theil coefficient is equal to zero, it means that the forecast is perfect (exact); if the Theil coefficient is equal to one, then, using the method under study is not justified.

Cuadro 5. Contraste de cointegración de Johansen del modelo VEC para el precio de maíz en el Estado de México.

Table 5. Johansen's cointegration test of the VEC model for the corn price in the State of Mexico.

H_0 : Existen γ vectores de cointegración	Estadístico de prueba †	Valores Críticos			Eigenvalores (Lambda)
		10pct	5pct	1pct	
$r \leq 1$	1.05	6.50	8.18	11.65	0.0907
$r = 0$	20.92	12.91	14.90	19.19	0.0004

† Estadístico: traza. $\diamond$ † Statistic: trace.

Por medio de la estadística de Ljung-Box aplicada a los residuales se comprobó que no existió autocorrelación en los errores (Cuadro 6). Los precios de maíz observados en el Estado de México se compararon con los pronósticos fuera la muestra para los meses de julio a diciembre de 2018, obtenidos con el modelo VEC.

Evaluación de la capacidad predictiva

La U de Theil y el error porcentual absoluto medio (MAPE) se calcularon a partir de los valores observados y los valores pronosticados obtenidos usando los modelos ARIMA, VAR y VEC (Cuadro 7). La U de Theil es una medida que oscila entre cero y uno. Si el coeficiente de Theil es igual cero, significa que el pronóstico es perfecto (exacto) y si el coeficiente de Theil es igual a uno no se justifica el uso del método bajo estudio.

En la serie de precios del Estado de México, el modelo con desempeño mejor en la predicción fue el modelo univariado ARIMA (1, 0, 1) porque se obtuvo el error porcentual absoluto medio (MAPE) menor respecto a VAR y VEC; la predicción erró en un 11.32%. En la serie de Sinaloa el error porcentual absoluto medio menor fue igual a 3.46 y se obtuvo

In the series of prices for the State of Mexico, the model with the best performance in prediction was the ARIMA (1, 0, 1) univariate model because the lowest mean absolute percentage error (MAPE) was obtained in regard to VAR and VEC; the prediction was 11.32% wrong. In the Sinaloa series, the lowest mean absolute percentage error was equal to 3.46 and was obtained with the VAR (1) model. That is, there was an error in the prediction of 3.46%, compared to the univariate ARIMA models (1, 0, 1) with a MAPE of 4.83. Broz and Viego (2014) tested the ARIMA model methodology in Mexican timber products and their results showed that the ARIMA models built to predict the price of those products achieved predictions with errors less than 12%.

As it occurred in the case of MAPE, for the Theil's U coefficient analysis, the lowest values were obtained with the ARIMA model (1, 0, 1) in the series of the State of Mexico, and VAR (1) for the series of Sinaloa. This shows that the inclusion of international market variables did improve the forecasts in the case of Sinaloa. Our results support the hypothesis of Araujo (2011) who argued that there is integration between the corn markets in Mexico and the United States; however, such integration varied between two different regional markets in Mexico.

Cuadro 6. Prueba de Ljung-Box para los residuales del modelo VEC para el precio de maíz en el Estado de México.

Table 6. Ljung-Box test for the residuals of the VEC model for the corn price in the State of Mexico.

Modelo ajustado VEC	Ljung-Box test H_0 : Los errores son independientes
PMEXICO PFISICO	X-squared = 1.9158e-05, df = 1, p-value = 0.9965

Cuadro 7. Criterios de discriminación de los modelos univariados ARIMA y multivariados VAR y VEC.

Table 7. Discrimination criteria of the univariate ARIMA and multivariate VAR and VEC models.

Serie	Modelo	U de Theil	MAPE
$\Delta \ln(\text{PMEXICO})$	ARIMA (1, 0, 1)	0.063 [†]	11.32 [†]
$\Delta \text{PMEXICO } \Delta \text{PFISICO } \text{PFUTURO}$	VAR (2)	0.066	12.58
PMEXICO PFISICO	VEC	0.067	13.01
$\Delta \ln(\text{PSINALOA})$	ARIMA (1, 0, 1)	0.028	4.83
PSINALOA $\Delta \text{PFISICO } \text{PFUTURO}$	VAR (1)	0.018 [†]	3.46 [†]

[†]Modelo con mejor desempeño según los criterios establecidos. ♦ [†]Model with the best performance according to the established criteria.

con el modelo VAR (1). Esto es, hubo un error en la predicción de 3.46%, en comparación con los modelos univariados ARIMA (1, 0, 1) con un MAPE de 4.83. Broz y Viego (2014) probaron la metodología de modelos ARIMA en productos maderables mexicanos y sus resultados mostraron que los modelos ARIMA contruidos para predecir el precio de dichos productos lograron predicciones con errores menores al 12%.

Los resultados de la U de Theil coincidieron con los de MAPE en el sentido de que los menores valores se obtuvieron con el modelo ARIMA (1, 0, 1) en la serie del Estado de México, y VAR (1) para la serie de Sinaloa. Esto es evidencia de que la inclusión de variables del mercado internacional si mejoró los pronósticos en el caso de Sinaloa. Nuestros resultados respaldan la hipótesis de Araujo (2011) quien argumentó que existe integración entre los mercados de maíz en México y los Estados Unidos; sin embargo dicha integración varió entre dos distintos mercados regionales en México.

En la serie del Estado de México, los resultados apoyaron las hipótesis de Godínez y Fuentes (2008) y Ortiz y Montiel (2017), en las cuales se mostró que los precios de futuros no se encuentran relacionados con el precio de este estado. Los pronósticos se hicieron con los modelos ajustados y se realizó una comparación entre los valores observados, y las estimaciones puntuales fuera de la muestra para los meses de julio a diciembre de 2018 (Botero y Cano, 2008) (Cuadro 8).

La influencia del mercado internacional sobre los precios internos se ha planteado en algunos estudios recientes. Zavaleta (2019) modeló la dinámica

In the series for the State of Mexico, results supported the hypothesis of Godínez and Fuentes (2008) and Ortiz and Montiel (2017), in which it was shown that futures prices are not related to the price of this state. Forecasts were done with the adjusted models, and a comparison was performed between the observed values and the point estimates outside the sample for the months July to December 2018 (Botero and Cano, 2008) (Table 8).

The influence of the international market on domestic prices has been raised in some recent studies. Zavaleta (2019) modelled the stochastic dynamics of the percentage variations in corn price using autoregressive moving average models (ARMA) and through vector autoregression (VAR), in order to measure the impact on price volatility, which had the introduction of “futures” of yellow corn in the derivative market. Araujo (2011) used vector error correction models (VEC) to analyze the transmission of prices between the Mexican corn markets and the US market, and argued that there is integration between the corn markets in Mexico and the United States. Also, Fiess and Lederman (2004) analyzed the cointegration of corn prices in Mexico and the United States.

Regardless, Godínez and Fuentes (2008) used VAR models to prove that the futures price of yellow corn number 2 on the Chicago Stock Exchange does not maintain causality nor leadership over white corn spot prices in Mexico. Ortiz and Montiel (2017) showed through a multivariate stochastic volatility analysis that the market of corn futures prices is not related to the prices registered in some states in México. Those authors concluded that the price

Cuadro 8. Precios observados p_t y predichos $\hat{p}_t$ obtenidos con los modelos ajustados[†].
Table 8. Observed p_t prices and predicted $\hat{p}_t$ prices obtained with the adjusted models[†].

	VEC: PMEX PFISICO		VAR (1): PSINALOA Δ PFISICO PFUTURO		Δ PMEXICO Δ PFISICO PFUTURO		Δ LN(PMEXICO) ARIMA (1, 0, 1)		Δ LN(PSINALOA) ARIMA (1, 0, 1)	
	$\hat{p}_t$	p_t	$\hat{p}_t$	p_t	$\hat{p}_t$	p_t	$\hat{p}_t$	p_t	$\hat{p}_t$	p_t
Jul. 2018	5.265	5	4.528	4.75	5.283	5	5.209	5	4.524	4.75
Ago. 2018	5.320	5	4.477	4.6	5.312	5	5.216	5	4.550	4.60
Sep. 2018	5.364	4.75	4.434	5	5.322	4.75	5.234	4.75	4.575	5.00
Oct. 2018	5.403	4.75	4.394	5	5.332	4.75	5.254	4.75	4.600	5.00
Nov. 2018	5.438	4.3	4.357	5	5.343	4.3	5.275	4.3	4.624	5.00
Dic. 2018	5.470	6.3	4.322	5	5.355	6.3	5.296	6.3	4.649	5.00

[†] A partir de los datos de SNIIM (2020). ♦ [†]Based on data from SNIIM (2020).

estocástica de las variaciones porcentuales del precio del maíz, por medio de modelos autorregresivos de media móvil (ARMA) y a través un vector autorregresivo (VAR), con el fin de medir el impacto en la volatilidad de los precios, la cual ha experimentado la introducción de “futuros” de maíz amarillo en el mercado de derivados. Araujo (2011) uso modelos de corrección de errores (VEC) para analizar la transmisión de precios entre los mercados de maíz mexicanos y el mercado estadounidense y argumentó que existe integración entre los mercados de maíz en México y los Estados Unidos. También Fiess y Lederman (2004) analizaron la cointegración de los precios de maíz de México y Estados Unidos.

No obstante, Godínez y Fuentes (2008) usaron modelos VAR para probar que el precio de futuros del maíz amarillo número 2 de la bolsa de Chicago no mantiene una causalidad y liderazgo sobre los precios de maíz blanco en físico en México. Ortiz y Montiel (2017) mostraron a través de un análisis de volatilidad estocástica multivariante que el precio de mercado de futuros de maíz no se relaciona con los precios registrados en algunos estados del país. Esos autores concluyeron que la cobertura de precios que ofrece la agencia de servicios a la comercialización y desarrollo de mercados agropecuarios (ASERCA) no cumple en grado adecuado con su propósito de proteger a los agricultores nacionales que siembran maíz blanco.

CONCLUSIONES

Las variables precio de maíz en físico y precio de futuros influyeron sobre los precios de maíz en Sinaloa. El uso de estas variables mejoró los pronósticos comparados con los obtenidos con el modelo univariado autorregresivo integrado de media móvil (ARIMA), por un coeficiente de Theil menor y un error porcentual absoluto medio menor.

La influencia de los precios en el mercado internacional no fue igual en los dos estados analizados. En la serie del Estado de México el modelo con mejor desempeño en la predicción fuera de la muestra fue el modelo ARIMA (1, 0, 1). En este caso no resultó benéfico el uso de modelos multivariados. Los modelos ARIMA también son útiles para realizar pronósticos pues con ellos se obtiene un estimador del precio sin recurrir a información de otras variables y aportan evidencia de la influencia del mercado internacional

coverage offered by the agricultural marketing and development services agency (ASERCA) does not adequately fulfill its primary purpose of protecting national farmers that grow white corn.

CONCLUSIONS

The spot corn price and futures price variables influenced corn prices in Sinaloa. The use of these variables improved the forecasts compared to those obtained with the univariate autoregressive integrated moving average model (ARIMA), due to a lower Theil coefficient and a lower mean absolute percentage error.

The influence of prices in the international market was not the same in the two states analysed. In the series from the State of Mexico, the model with the best performance in the out-of-sample prediction was the ARIMA model (1, 0, 1). In this case, the use of multivariate models was not beneficial. ARIMA models are also useful for forecasting, since with them a price estimator is obtained without resort to information from other variables. ARIMA provided evidence of the influence of the international market on the domestic market, which was different in the two states analysed.

The use of univariate or multivariate models was not decisive for the accuracy of the forecasts obtained with the series analysed. The models analysed for series from the State of Mexico and Sinaloa are a useful tool in planning and decision-making regarding the production and commercialization of corn and related products, because they provide white corn forecasts.

—End of the English version—

-----*-----

sobre el mercado interno; la cual resultó diferente en los dos estados analizados.

El uso de modelos univariado o multivariados no fue determinante para la precisión de las predicciones obtenidas con las series analizadas. Los modelos analizados para series del estado de México y Sinaloa son una herramienta útil en la planeación y toma de decisiones; en lo referente a producción y comercializa-

ción del maíz y productos relacionados debido a que proporcionan predictores del precio del maíz blanco.

LITERATURA CITADA

- Araujo E., S. R. 2011. Análisis de transmisión de precios entre los mercados de maíz mexicanos y el mercado estadounidense: métodos lineales y no lineales. *Rev. Esp. Est. Agro. Pesq.* 2011: 39-78.
- BANXICO (Banco de México). 2020. Tipo de cambio. <https://www.banxico.org.mx/SieInternet/consultarDirectorioInternetAction.do?accion=consultarCuadro&idCuadro=CF102§or=6&locale=es> (Consulta: marzo 2020).
- Botero B., S. y J. A. Cano C. 2008. Análisis de series de tiempo para la predicción de los precios de la energía en la bolsa de Colombia. *Cuad. Econ.* 27: 173-208.
- Box, G. E. P., G. M. Jenkins, G. C. Reinsel, and G. M. Ljung. 2016. *Time Series Analysis Forecasting and Control*. 5th Ed. Hoboken, NJ, USA. 709 p.
- Broz R., D. y Viego N., V. 2014. Predicción de precios de productos de *Pinus* spp. con modelos ARIMA. *Madera y Bosque*. 20: 37-46.
- Cryer, D. J. and K. Sik. 2008. *Time Series Analysis with Applications in R*. 2nd Ed. Springer. New York, NY, USA. 501 p.
- Enders, W. 2015. *Applied Econometrics Time Series*. 4th Ed. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA. 498 p.
- Engle, R. F. and C. W. J. Granger. 1987. Co-integration and error correction: representation, estimation, and testing. 55: 51-276.
- Fiess, N. and D. Lederman. 2004. Mexican corn: the effects of NAFTA. The World Bank Group. https://www.researchgate.net/profile/DanielLederman/publication/242146394_Mexican_Corn_The_Effects_of_NAFTA/links/544e45bf0cf29473161b06cc/Mexican-Corn-The-Effects-of-NAFTA.pdf. (Consulta: noviembre 2021).
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). 2015. Panorama agroalimentario maíz 2015. México. 37 p. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2015.pdf (Consulta: noviembre 2021).
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). 2016. Panorama agroalimentario 2016. México. Documento técnico. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2016.pdf. (Consulta: noviembre 2021).
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). 2019. Panorama agroalimentario 2019. México. 25 p. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2019/11/Panorama-Agroalimentario-Ma%C3%ADz-2019.pdf> (Consulta: noviembre 2021).
- Godínez P., J. A. y N. A. Fuentes F. 2008. Las condiciones económicas para operar un mercado de futuros de maíz blanco en México. *Invest. Econ.* 67: 15-37.
- Guerrero, V. M. 2007. Pronósticos restringidos con modelos de series de tiempo múltiples y su aplicación para evaluar metas de política macroeconómica en México. *Est. Econ.* 22: 241-311.
- Gujarati D, N. y D. C. Porter. 2010. *Econometría*. 5ta Ed. McGraw-Hill Educación. México, D. F., México. 946 p.
- Jiang, H. and C. Liu. 2011. Forecasting construction demand: a vector error correction model with dummy variables. *Construct. Manage. Econ.* 29: 969-979.
- Lütkepohl, H. 2005. *New introduction to multiple time series analysis*. Springer. New York, NY, USA. 765 p.
- Makridakis, S., S. C. Wheelwright, and R. J. Hyndman. 1997. *Forecasting, methods and applications*. 3ra Ed. John Wiley & Sons, Inc. 656 p.
- Maparu, T. S. and T. N. Mazumder. 2017. Transport infrastructure, economic development and urbanization in India (1990-2011): Is there any causal relationship? *Transp. Res. Part A: Pol. Pract.* 100: 319-336.
- Morán C., D. M. 2014. Determinantes de la inflación en Ecuador un análisis econométrico utilizando modelos VAR. *Eco. Soc.* 31: 53-70.
- Ortiz A., F. y A. N. Montiel G. 2017. Transmisión de precios futuros de maíz del Chicago Board of Trade al mercado spot mexicano. *Contad. Adm.* 62: 924-940.
- Pankratz, A. 1983. *Forecasting with univariate Box-Jenkins models concepts and cases*. 588 p.
- Quintana R, L. y M. A. Mendoza G. 2016. La econometría: sus usos y aplicaciones en R. DGAPA/UNAM. PE302513. 358 p.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2019. Panorama agroalimentario 2019. SAGARPA. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019. (Consulta: diciembre 2021).
- Sims, C. 1980. Macroeconomics and reality. *Econometrica* 48: 1-48.
- Sims, C. 1986. Are forecasting models usable for policy analysis? *Q. Rev.* 10: 2-16.
- SNIIM (Sistema Nacional de Información e Integración de mercados). http://www.economia-sniim.gob.mx/Precio_del_Maiz.htm (Consulta: marzo 2020).
- USDA (United States Department of Agriculture). 2020. Precios de futuros y precio de maíz en físico FOB. <https://www.ers.usda.gov/data-products/season-average-price-forecasts/> (Consulta: marzo 2020).
- Zavaleta V., O. H. 2019. Impacto de la introducción del contrato futuro del maíz amarillo en la volatilidad del precio spot: evidencia del MexDer. *Contad. Adm.* 65: 1-33.