

Agrociencia

Volumen 56, Número 8

16 de noviembre - 31 de diciembre, 2022



Dra. Rosa Manzanilla López



DIRECTORIO

DIRECTOR DE LA REVISTA AGROCIENCIA
Fernando Carlos Gómez Merino

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
Said Infante Gil
Leopoldo E. Mendoza Onofre
José A. Villaseñor Alva

RESPONSABLES DE LA EDICIÓN
Fernando Carlos Gómez Merino

FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN
L. Brenda Espejel Lagunas

TRADUCTORES
Inés Enriquez
Joel Castillo González
Nicolas Crossa

COSECHADOR DE METADATOS
Moises Quintana Arévalo

PLATAFORMA
Ana Luisa Mejía Sandoval
L. Brenda Espejel Lagunas

APOYO SECRETARIAL
Yolanda Feroso Meraz

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, **Volumen 56, Número 8, 16 de noviembre - 31 de diciembre, 2022**, 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. Fernando Gómez Merino**. 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, **20 de enero del 2023**.

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

Teléfono: 595 92 84427

<https://agrociencia-colpos.org>

~~~~~  
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: Dra. Rosa Manzanilla López



AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

ANIMAL SCIENCE * CIENCIA PECUARIA

GRAZING BEHAVIOR OF NEW ZEALAND HOLSTEIN COWS WITH ACCESS TO SHADE 1431

*

CONDUCTA DE PASTOREO DE VACAS HOLSTEIN NEOZELANDÉS CON ACCESO A SOMBRA

Marisol Ortiz-**Texon**, Rodolfo **Ramírez-Valverde**, María Esther **Ortega-Cerrilla**,
Lucía **Améndola-Saavedra**, Juan Andrés **Burgueño-Ferreira**,
Ricardo Daniel **Améndola-Massiotti**

BIOTECHNOLOGY * BIOTECNOLOGÍA

ORGANIC WASTE BIOCONVERSION AND WEIGHT GAIN DYNAMICS OF THE BLACK SOLDIER FLY *Hermetia illucens* 1459

*

DINÁMICA DE BIOCONVERSIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS Y GANANCIA DE PESO POR LA MOSCA SOLDADO NEGRA *Hermetia illucens*

Víctor Adrián **Ramírez-Méndez**, Remigio Anastacio **Guzmán-Plazola**,
Alejandro **Pérez-Panduro**, Julio **Sánchez-Escudero**

EFFECT OF TEMPERATURE AND ULTRAVIOLET RADIATION ON GROWTH AND PATHOGENICITY OF *Metarhizium anisopliae* 1484

*

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE CRECIMIENTO Y PATOGENICIDAD DE *Metarhizium anisopliae**Hermetia illucens*

María Elena **Márquez-Gutiérrez**, Evelyn **Pérez-Lezcano**, Yamilé **Baro-Robaina**,
Francisco Paúl **Gámez Vázquez**, César **Aguirre-Mancilla**,
Gerardo Armando **Aguado-Santacruz**

CROP SCIENCE * FITOCIENCIA

GRAIN YIELD STABILITY AND BIOCHEMICAL NUTRIENT CONTENT IN WHITE CORN EXPERIMENTAL CROSSES 1507

*

ESTABILIDAD DEL RENDIMIENTO DE GRANO Y CONTENIDO BIOQUÍMICO NUTRIMENTAL EN CRUZAS EXPERIMENTALES DE MAÍZ BLANCO

Francisco Javier **Sánchez-Ramírez**, Ma. del Carmen **Mendoza-Castillo**, Carmen
Gabriela **Mendoza-Mendoza**, Adriana **Delgado-Alvarado**,
Etzael **Nuñez-Terrones**

NATIVE BACTERIA IN RASPBERRY CROWN GALL REDUCE THE
SEVERITY OF *Agrobacterium tumefaciens*

1533

*

BACTERIAS NATIVAS EN LA AGALLA DE LA CORONA DE FRAMBUESA
REDUCEN LA SEVERIDAD DE *Agrobacterium tumefaciens*

Elizabeth Sánchez-Jiménez, Sergio Aranda-Ocampo,
Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Dimas Mejía-Sánchez

CHALLENGES AND MANAGERIAL STRATEGIES OF COFFEE
COOPERATIVES FROM THE HUATUSCO REGION IN MEXICO:
THE PERSPECTIVE OF LEADERS

1558

*

RETOS Y ESTRATEGIAS DE GESTIÓN DE LAS COOPERATIVAS DE CAFÉ
DE LA REGIÓN DE HUATUSCO EN MÉXICO:
LA PERSPECTIVA DE LOS LÍDERES

Margarita Velandia, Carlos Trejo-Pech, Benigno Rodríguez-Padrón,
Roselia Servín-Juárez, Christopher Stripling

GRAZING BEHAVIOR OF NEW ZEALAND HOLSTEIN COWS WITH ACCESS TO SHADE

Marisol Ortiz-Texon¹, Rodolfo Ramírez-Valverde¹, María Esther Ortega-Cerrilla², Lucía Améndola-Saavedra³, Juan Andrés Burgueño-Ferreira⁴, Ricardo Daniel Améndola-Massiotti*

¹ Universidad Autónoma Chapingo. Posgrado en Producción Animal. Carretera México- Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, Mexico. C. P. 56264.

² Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mexico. C. P. 56264.

³ Animal Welfare Advisor. Carretera México- Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, Mexico. C. P. 56230.

⁴ Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Carretera México-Veracruz km 45, El Batán, Texcoco, Estado de México, Mexico. C. P. 56237.

* Author for correspondence: r_amendola@yahoo.com

ABSTRACT

Access to shade decreases heat stress of grazing dairy cows, but may reduce their grazing time. It was hypothesized that access to shade would alter grazing behavior of New Zealand Holstein cows. The objective was to evaluate the distribution of time use of cows with and without access to shade in a temperate sub-humid climate with summer rainfall, where the mean annual temperature varies between 12 (January) and 18 °C (May). During the warm (May) and cool (October) seasons of 2017, two lots of nine lactating New Zealand Holstein cows grazed in two treatments, with (S) and without (NS) shade access. Behavior was recorded every 10 min for 5 d per period. The response variables were: grazing times; rumination standing, prostrate and total; resting standing, prostrate and total. The data were classified as diurnal (07:00 to 19:00 h) and nocturnal (19:00 to 07:00 h); the former were grouped into four shifts according to Temperature and Humidity Index (TIH) and solar radiation. It was analyzed with a general linear model and the MIXED procedure. In the warm season (19 °C, precipitation of 44.3 mm) cows with access to shade grazed 16 % less time ($p \leq 0.05$) in the shifts of higher THI and solar radiation, being higher the percentage of shade use. During the cool season (16 °C, precipitation 62.0 mm) at times of higher THI (71.0) and solar radiation (880.5 Wm⁻²) S cows ruminated standing 44 % longer ($p \leq 0.05$), with total rumination time 30.7 % longer ($p \leq 0.05$) than NS; the latter rested standing 22.5 % longer ($p \leq 0.05$). Access to shade modified the behavior of New Zealand Holstein cows grazing in the temperate climate of Mexico.

Keywords: solar radiation, THI, artificial shade, Mexico, dairy cow.

INTRODUCTION

There is a growing societal interest, in Germany, for example, in animal welfare of livestock species, aimed at improvements in production systems to minimize environmental aspects with negative effects on animal welfare (Schütz *et al.*, 2018).

Citation: Ortiz-Texon M, Ramírez-Valverde R, Ortega-Cerrilla ME, Améndola-Saavedra L, Burgueño-Ferreira JA, Améndola-Massiotti RD. 2022. Grazing behavior of New Zealand Holstein cows with access to shade. *Agrociencia*. 56(8): 1431-1458. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2446>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: September 10, 2021.
Approved: December 01, 2022.
Published in Agrociencia:
January 11, 2023.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



In dairy cows, exposure to elevated environmental temperature, solar radiation and humidity can induce discomfort and heat stress - i.e., imbalance between production and metabolic heat dissipation (Das *et al.*, 2016) - and thus reduce their welfare and productive performance (Moretti *et al.*, 2017). Heat stress is defined as the sum of forces external to the animal that causes an increase in body temperature and elicits a physiological response (Polsky and von Keyserlingk, 2017).

The Temperature and Humidity Index (THI) is used as a measure of thermal comfort in dairy cows (Polsky and von Keyserlingk, 2017), in which solar radiation plays an important role (Schütz *et al.*, 2014). Dairy cow behavior can be used to directly assess heat stress and comfort, as heat stressed cows modify their grazing behavior (Vizzotto *et al.*, 2015) and reduce their physical activity such as walking or ruminating (Das *et al.*, 2016). Likewise, to improve body heat dissipation, they increase standing rumination and resting time at the expense of prostration time, which is critical for dairy cow comfort (Tucker *et al.*, 2008).

Van laer *et al.* (2014) warn that in cattle production in temperate climates it is largely unknown whether cows suffer discomfort caused by environmental conditions, or whether action is required to prevent such discomfort; although Rees *et al.* (2016) and Moretti *et al.* (2017) argue that, even in temperate conditions, cows can exhibit moderate heat stress. In temperate climates, shade is not often provided to grazing cows (Van laer *et al.*, 2015b; Veissier *et al.*, 2018). In these climatic conditions, providing shade to dairy cows can be a resource to mitigate the effects of weather conditions, which allows them to modify their grazing behavior and increase their resting time during the hottest hours (Palacio *et al.*, 2015; Vizzotto *et al.*, 2015). Therefore, in this study it was hypothesized that access to shade would modify the behavior of dairy cows, and the objective was to evaluate changes in grazing time, rumination and rest of lactating New Zealand Holstein cows, with or without shade, during two contrasting times of the year in a temperate zone of Mexico.

MATERIALS AND METHODS

The research was conducted in two stages during 2017, the first in May, which is the warmest season at the experimental site, and the second in October, a cooler season coinciding with autumn. The study took place at the Grazing Module of the Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' N, 98° 54' W, altitude 2240 m). The site's climate is temperate sub-humid, with 644.8 mm of mean annual precipitation and a summer rainfall regime; the mean annual temperature fluctuates between 11.2 (January) and 17.9 °C (May) (Garcia, 2004).

In the experiment, treatments S (with access to shade) and NS (without access to shade) were evaluated. Eighteen lactating New Zealand Holstein cows were distributed in two groups of nine based on live weight, days in milk and age, by stratified randomization; these groups were then randomized among treatments. In May, NS cows had an initial weight of 481 ± 20 kg, an initial milk production of 21.9 ± 1.5 L d⁻¹, and were 125 ± 24 days in milk; S cows had an initial weight of 485 ± 17 kg, an

initial milk production of 23.0 ± 1.8 L d⁻¹, and were 102 ± 28 days in milk. In October, the cows had an initial weight of 523.9 ± 19.8 kg and an initial milk production of 15.98 ± 0.77 L d⁻¹, a productive decrease that corresponded to the advance of lactation. The proportion of skin colors was not quantified, but the predominant skin color was black, which is a racial characteristic.

The cows were managed in rotational grazing in five paddocks of, on average, 0.54 ha of mixed alfalfa (*Medicago sativa* L.) and orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) pastures that had an average of 5 days of grazing and 30 days of rest. The paddocks were rectangles of 36 m by 150 m divided in half; groups of cows entered from opposite sides of the paddock. Daily grazing area was defined as a function of forage mass and a daily allowance determined by a total dry matter (DM) intake target of 3 % of live weight and a grazing efficiency target (above 5 cm) of 70 % in May and 80 % in October. Additionally, the cows received supplemental feeding with 2.7 kg DM d⁻¹ of commercial concentrate and corn silage (2.1 kg DM d⁻¹ in May and 2.7 kg DM d⁻¹ in October); the daily amount of supplement was divided in two and supplied after each milking (which occurred between 6:30 and 08:00, and between 15:30 and 17:00).

The artificial shade structures, placed at one end of the S area, were constructed with 80% shade netting supported by steel tubes according to the design proposed by Higgins *et al.* (2011). Four mobile structures of 4 x 4 m and 2.6 m high each were used; the drinking trough was placed 2 m from the shade. Shade availability per cow was 7.11 m², a value within the range recommended by Higgins *et al.* (2011) for grazing dairy cows and 53 % higher than that used by Palacio *et al.* (2015). In May, the average climatic conditions between 10:00 and 19:00 without shade were THI 73.5 and radiation 921 W m⁻², while under the shade structure the values were 71.7 and 226 W m⁻². In October, the values without shade were THI 68.8 and radiation 700 W m⁻², and 67.9, 177 W m⁻² under the shade structure.

Cow behavior was recorded during five days in May and five days in October in 24 h cycles, being the second days of occupation (grazing) of five different paddocks in each season; in this way, the average distance between both lots during the measurement days was 105 m. The duration of the experimental phases was five weeks in both seasons. The activities were recorded by six observers (trained for one month prior to data collection) every ten minutes, using the sweep method suggested by Pullin *et al.* (2017) and recommended by Bateson and Martin (2021). Each cow was assigned a number that was painted on both flanks to facilitate identification from a distance. For the recording of nocturnal activities, the observers used pocket lamps that they turned on exclusively at the time of data collection. Observers worked in pairs in three-hour shifts, with each member of the pair recording activities in one of the treatments.

Recording of activities related to grazing behavior included whether the cow was grazing, ruminating standing or prostrate, or resting (no jaw movements) standing or prostrate (Sheahan *et al.*, 2013); in addition, it was recorded whether the cow was in or out of shade. The cow was considered to be a) grazing if with her head down she took a mouthful or walked in search of a next feeding station; b) ruminating if she made

chewing movements without fresh forage in her mouth; c) lying down if her flank was in contact with the ground and standing otherwise.

Solar radiation, temperature and relative humidity were measured in and out of the shade with a solar meter (Amprobe® SOLAR-100 Solar Power, Glottertal, Germany) and a thermo-hygrometer (Amprobe® THWD-5, Glottertal, Germany). The THI was calculated for 11:00, 15:00 and 17:00 h according to Schütz *et al.* (2014) and Palacio *et al.* (2015) (Equation 1).

$$ITH = (1.8 \times T + 32) - ((0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26)) \quad (1)$$

where T is the air temperature (°C) and RH is the relative humidity (%).

Statistical analysis

For analysis purposes, observations were divided into daytime (from 07:00 to 19:00 h) and nighttime (from 19:00 to 07:00 h). Based on solar radiation and the THI, the daytime period was divided into four shifts: T1 (07:00-10:00), T2 (10:00-13:00), T3 (13:00-16:00) and T4 (16:00-19:00).

To determine changes in shade access, a general linear model analysis was performed using the MIXED procedure (SAS Institute Inc., 2017). The model included the fixed effects of shift, day, their interaction, and the random effect of cow; for the analysis of the day and night periods, the effect of period, day and their interaction was included. Comparison of means was performed by Tukey's test with $p \leq 0.05$.

For the analysis of the behaviors recorded in the sweep samplings, the time spent on each behavior per cow was summed to obtain the total time in each period, assuming that each record was representative of the activity performed in the time elapsed since the previous record (Penning y Rutter, 2004). Then, the average of each activity in each treatment, was calculated for shifts T2, T3 and T4, day, night and total periods. Sweep sampling was selected based on widely validated methods for recording animal behavior (Pullin *et al.*, 2017; Bateson and Martin, 2021). Likewise, intervals between observations of up to 15 min have been shown to representatively capture the behavior of grazing cattle (e. g., Améndola *et al.*, 2019). The dependent variables were grazing time, standing rumination, prostrate rumination, total rumination, standing rest, prostrate rest and total rest. The analysis was performed with the GLM procedure (SAS Institute Inc., 2017), for shifts T2, T3 and T4, the model included the effect of treatment, shift, treatment \times shift interaction, and day, as well as the inclusion of THI and solar radiation as covariates. The covariates were included separately and both together in the model, the significance of the effects was analyzed and the percentage reduction in the sum of squares when including the covariates was calculated. For the diurnal, nocturnal and total periods, the model included the day and treatment effect and its interaction. The means of the treatments were obtained with the LSMEANS instruction and their comparison was performed with PDIF.

RESULTS AND DISCUSSION

Weather conditions

Solar radiation and THI during shifts T2, T3 and T4 in the two stages showed wide variations among the three shifts, as well as among days (Figure 1). For both climatic variables, high values were recorded in May at T3, while in October solar radiation at T2 and T3 was apparently similar. High values of solar radiation during May were present on days 3 and 4, while THI values at T3 during the 5 experimental days were higher than 72, a reference value for mild heat stress in dairy cattle (Polsky and von Keyserlingk, 2017). In October, elevated radiation levels were present at T2 on days 1 and 2, while the THI exceeded 72 on days 1 and 5 during T3.

Access to shade

In both stages there were differences ($p \leq 0.05$) in shade access by cows due to the effect of period, shift and day, as well as their interaction for the four-day shifts (Table 1). Access to shade was not different ($p > 0.05$) between daytime and nighttime periods in May; however, the time cows spent employing the shade resource was greater ($p \leq 0.05$) during T3 than in the other shifts.

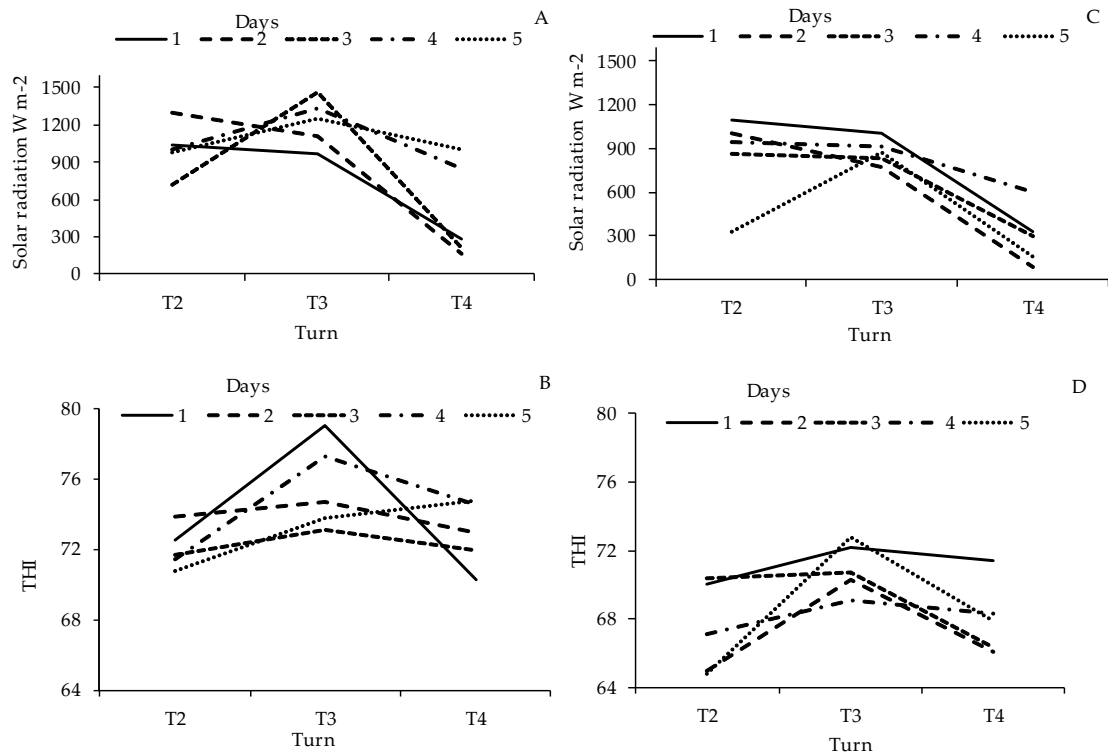


Figure 1. Solar radiation and THI calculated for different day shifts during the evaluation (5 d) of the behavior of grazing dairy cows in May (A and B) and October (C and D).

Table 1. Shade use (min) by grazing dairy cows during the evaluation days in different periods and shifts of the day in May and October.

May	Day					Significance level				
	1	2	3	4	5	Mean, period or shift	EE	Period or shift	Day	Period or shift x day
T1	0 c	0 c	0 c	0 c	2.2 c	0.4	4.87	≤ 0.0001	0.0013	≤ 0.0012
T2	11.1 c	3.3 c	2.2 c	1.1 c	13.3 bc	6.2				
T3	37.8 a	7.8 c	21.1 abc	31.1 ab	42.2 a	28				
T4	1.11 c	14.1 bc	0 c	2.2 c	12.2 bc	6				
Mean	12.5	6.4	5.8	8.6	17.5					
Diurnal	50 b	25.6 b	23.3 b	34.4 b	70 b	40.7	22.39	0.3891	≤ 0.0001	≤ 0.0001
Nocturnal	193.3 a	0 b	54.4 b	4.4 b	10 b	52.4				
Mean	121.7	12.8	38.9	19.4	40					
October										
T1	2.2 d	17.8 cd	2.2 d	1.1 d	6.7 d	6	6.74	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001
T2	23.3 bcd	40 bc	25.6 bcd	10 cd	5.6 d	20.9				
T3	32.2 bdc	36.7 bc	8.9 cd	45.5 b	81.1 a	40.9				
T4	10 cd	32.2 bcd	8.9 cd	30 bcd	13.3 cd	18.9				
Mean	17	31.7	11.4	21.7	26.7					
Diurnal	67.8 b	126.7 b	45.6 b	87.8 b	106.7 b	86.9	43.7	0.0071	0.0004	0.0051
Nocturnal	163.3 ab	157.8 ab	36.7 b	273.3 a	74.4 b	141.1				
Mean	115.6	142.2	41.1	180.6	90.6					

T1: (7:00–10:00); T2: (10:00–13:00); T3: (13:00–16:00); T4: (16:00–19:00). Period or Shift x Day means followed by similar indices are not different ($p > 0.05$). EE: Standard error.

Dairy cows accessed the shade structure equally in both seasons. Changes in shade access across shifts between seasons may be due to changes in the THI and solar radiation (Figure 1). In May, both variables presented the highest values in T3, which exceeded the critical THI value of 72. In October, the greatest access to shade during the diurnal period occurred during T3, which matched the highest values of solar radiation between 1000 and 1500 Wm^{-2} . The incidence of the THI and solar radiation, when included as covariates together, improves the fit of the models (Tables 2 and 3). This indicates that shade is an important resource for cows when THI values and radiation barely exceed the thermal comfort limit defined by Armstrong (1994). These results coincide with the reports of different authors; on the one hand, Palacio *et al.* (2015) report that cows are in comfort with THI values below 70. On the other hand, it has been consistently shown that in temperate climates, radiation affects access to shade; cows access shade to a greater extent when the effect of protection against solar radiation is greater (Tucker *et al.*, 2008).

In our study, New Zealand Holstein cows made use of the shade structure equally in both phases and to a greater extent in the night period. The cows had a period of one month of habituation to the shade structure, and also made use of the structure during the first day of evaluation. These facts, coupled with the nocturnal use of the structure,

indicate that they were accustomed to using the shade structure. The greater use of the shade structure during night periods in both months suggests the presence of factors other than access to shade *per se*; however, the variables taken into account in this study were not sufficient to explain the preference of cows to use the shade structure as shelter during the night.

Grazing behavior

In May, there was treatment effect ($p \leq 0.05$) on grazing time (Table 2), and in all activities there was shift effect ($p \leq 0.05$); however, in no activity there were day and treatment-by-shift interaction effects ($p > 0.05$). For all variables, solar radiation and THI jointly explained the highest percentage of the sum of squares of the shift effect.

Table 2. Significance levels of grazing behavior for cows with and without access to shade for T2, T3 and T4 shifts in May.

Variable	Statistical [†]	Treat [‡]	Percentage SC	Shift	Percentage SC	Treat x Shift	Day
Grazing	<i>p</i>	0.0320		$\leq .0001$		0.1509	0.7374
	THI	0.0707	27.4	$\leq .0001$	13.3		
	Rad	0.9951	99.9	0.0002	37.4		
	THI+Rad [§]	0.9998	100	0.0004	40.3		
Rumination standing	<i>p</i>	0.2088		$\leq .0001$		0.3160	0.6878
	THI			$\leq .0001$	0.5		
	Rad			$\leq .0001$	41.1		
	THI+Rad			0.0002	42.1		
Rumination postrate	<i>p</i>	0.8968		0.0003		0.9809	0.730
	THI			0.0005	4.4		
	Rad			0.0007	13.6		
	THI+Rad			0.0023	28.7		
Rumination total	<i>p</i>	0.1470		$\leq .0001$		0.2155	0.9115
	THI			$\leq .0001$	0		
	Rad			$\leq .0001$	34.1		
	THI+Rad			$\leq .0001$	37.8		
Rest standing	<i>p</i>	0.4721		0.0020		0.92410	0.8062
	THI			0.0067	20.5		
	Rad			0.1391	74.3		
	THI+Rad			0.1883	77.5		
Rest postrate	<i>p</i>	0.8929		0.0017		0.2547	0.3083
	THI			0.0029	5.1		
	Rad			0.0276	48.9		
	THI+Rad			0.0333	48.9		
Rest Total	<i>p</i>	0.5494		$\leq .0001$		0.4219	0.6538
	THI			$\leq .0001$	13.3		
	Rad			0.0027	65.4		
	THI+Rad			0.0042	66.6		

[†]Significance level and percent reduction in the sum of squares (SC) explained by the inclusion of the THI and radiation covariates; [‡]: Treatment.

For grazing time, THI was linked to 27.4 % of the sum of squares of the treatment effect, and radiation to 99.9 %, while for the shift effect they explained 13.3 and 37.4 %, respectively.

These results evidence the importance of including solar radiation levels along with THI, as indicators of heat stress-related welfare deterioration risks in grazing dairy cows (Veissier *et al.*, 2018). In October there was effect ($p \leq 0.05$) of treatment (Table 3) for standing rumination, total rumination, and standing rest; in addition there was shift effect for all variables. For standing rumination, total rumination, standing rest and total rest, radiation explained the highest percentage of the sum of squares of the shift effect, whereas, for prostrate rumination, prostrate rest and grazing, the highest proportion was associated with THI. In the sum of squares of the treatment effect, the

Table 3. Significance levels of grazing behavior for cows with and without access to shade for T2, T3 and T4 shifts in October.

Variable	Statistical [†]	Treat [‡]	Percentage SC	Shift	Percentage SC	Treat x Shift	Day
Grazing	<i>p</i>	0.8120		≤ 0.0001		0.4529	0.7230
	THI			0.0082	58.6		
	Rad			0.0002	13.8		
	THI+Rad			0.0068	56.4		
Rumination standing	<i>p</i>	0.0185		0.0048		0.6138	0.5123
	THI	0.0406	23.6	0.0125	18.1		
	Rad	0.0711	43.9	0.2138	76.1		
	THI+Rad	0.0545	34.4	0.1685	71.6		
Rumination prostrate	<i>p</i>	0.4412		0.0445		0.5475	0.5639
	THI			0.1986	49.6		
	Rad			0.0125	0		
	THI+Rad			0.0976	31.4		
Rumination total	<i>p</i>	0.0626		0.0300		0.8388	0.3432
	THI	0.1021	20.4	0.0403	4.6		
	Rad	0.0315	0	0.9069	97.8		
	THI+Rad	0.0230	0	0.6447	90.1		
Rest standing	<i>p</i>	0.0658		≤ .0001		0.4071	0.0727
	THI	0.0927	12.9	0.0002	15.7		
	Rad	0.0352	0	0.0006	36.1		
	THI+Rad	0.0311	0	0.0008	37.6		
Rest prostrate	<i>p</i>	0.6970		0.0100		0.3929	0.1103
	THI			0.0320	27.3		
	Rad			0.0113	2.3		
	THI+Rad			0.1106	55.4		
Rest total	<i>p</i>	0.0570		≤ .0001		0.7532	0.1337
	THI	0.1047	25.9	0.0001	2.3		
	Rad	0.1352	39.1	0.0030	50.3		
	THI+Rad	0.1083	27.3	0.0031	49.1		

[†]*p* Significance level and percent reduction in the sum of squares (SC) explained by the inclusion of the THI and radiation covariates; [‡] Treatment.

THI explained 23.6, 20.4 and 12.9 % for standing rumination, total rest and standing rest. Although October is considered a cool time of the year, these results indicate that the levels of THI and solar radiation during that month may cause changes in the behavior of dairy cows in the presence of shade.

In May, S cows showed 16 % less grazing time per shift (67.5 vs. 80.5 min \pm 3.92; $p \leq 0.05$) (Table 4). Access to shade did not modify ($p > 0.05$) rumination times (standing or prostrate and total) or resting times (standing or prostrate, and total). S cows modified their grazing time during the day; this decrease was mainly related to solar radiation; in addition, access to shade increased when radiation was higher, indicating that cows preferred to access the resource rather than spend their time grazing. In agreement with our study, Kendall *et al.* (2006) also reported decreased grazing in shaded cows in New Zealand's temperate climate.

In the present study, night grazing time was not different ($p > 0.05$) between cows with or without access to shade (Figure 2). Since they received supplementation, it is likely that S cows did not need to compensate for the reduced daytime grazing time. These may be due to availability of high quality forage since, in the same pastures with the same type of animals, Améndola-Massiotti *et al.* (2018) reported 25 % crude protein and 40 % acid detergent fiber, on average, for both times of the year. This good forage composition may have been linked to the fact that the cows, having acquired sufficient

Table 4. Least squares means for grazing behavior variables (min) in cows with or without access to shade during different shifts of the day in May.

Effect	Grazing	Rumination standing	Laid rumination	Total rumination	Standing rest	Laid rest	Total rest
Treatment							
NS	80.5 a	37.8	9.3	47.2	18.3	6.4	24.7
S	67.7 b	40.0	9.7	54.7	20.4	6.1	26.6
EE	3.9 2	3.91	1.99	3.54	2.07	1.53	2.15
Shift							
T2	74.2 b	56.6 a	17.2 a	73.9 a	19.4 a	7.7 a	27.1 b
T3	51.7 c	55.2 a	11.2 a	66.4 a	26.8 a	11.1 a	37.9 a
T4	96.4 a	12.4 b	0.1b	12.2 b	11.9 b	0.1 b	12 c
EE	4.81	4.79	2.44	4.33	2.54	1.88	2.63
Treatment x Shift							
T2NS	87.5	47.1	16.7	63.7	18.6	5.5	24.1
T2S	60.9	66.2	17.8	84	20.2	9.8	30.0
T3NS	51.1	55.8	11.1	66.8	26.2	13.5	39.7
T3S	52.2	54.7	11.3	66.1	27.3	8.7	36.0
T4NS	102.8	10.6	0.2	10.9	10.0	0.2	10.2
T4S	90.0	14.2	0.0	14.2	13.7	0.0	13.7
EE	10.79	10.9	5.45	9.56	5.72	4.34	6.01

NS: cows without shade; S: cows with shade; T2: (10:00–13:00); T3: (13:00–16:00); T4: (16:00–19:00). Means with different literal within column are different ($p \leq 0.05$); EE: Standard error.

nutrients and reduced their hunger drive, did not spend more time grazing instead of resting in the shade.

In contrast, in October (Table 5), access to shade did not affect ($p > 0.05$) times spent grazing, prostrate ruminating, prostrate resting and total resting during the hours of highest THI and solar radiation. At that time, S cows had 44 % more rumination time while standing (46.4 vs. 32.2 min \pm 4.01 per shift; $p \leq 0.05$) and 30.7 % more total rumination time (51.5 vs. 39.4 min \pm 4.58 per period; $p \leq 0.05$), and 22.5 % less time in standing rest (29.3 vs. 37.8 min \pm 3.25 per period; $p \leq 0.05$). At this time, S cows

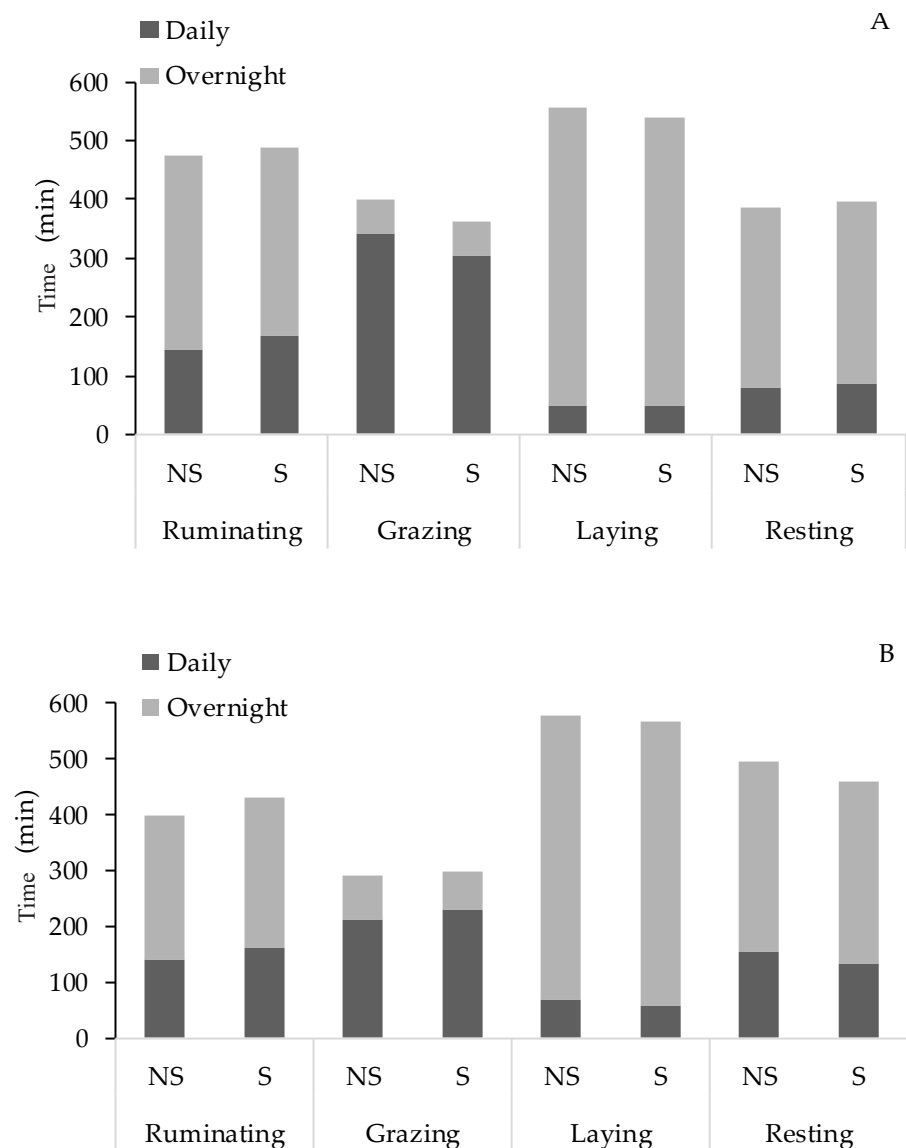


Figure 2. Behavior of grazing cows during the day and night periods of cows without (NS) and with access to shade(S) during May (A) and October (B).

Table 5. Least squares means for grazing behavior variables (min) in cows with or without access to shade during different shifts of the day in October.

Effect	Grazing	Rumination standing	Laid rumination	Total rumination	Standing rest	Laid rest	Total rest
Treatment							
NS	56.4	32.2 b	7.2	39.4 b	37.8 a	7.9	45.8
S	57.5	46.4	5.1	51.5 a	29.3 b	6.8	36.07
EE	3.06	4.01	1.84	4.58	3.25	1.96	3.69
Shift							
T2	68.7 a	40.9 a	9.9 a	50.9 a	38.9 a	13.9 a	52.8 a
T3	39.2 b	51.1 a	1.4	52.5 a	45.7 a	2.6 b	48.3 a
T4	62.9 a	25.8 b	7.1 ab	32.8 b	16.0 b	5.6 b	21.6 b
EE	3.75	4.91	2.26	5.62	3.98	2.4	4.53
Treatment x Shift							
T2NS	66.5	37.7	9.6	47.3	44.1	12.4	56.5
T2S	70.9	44.2	10.2	54.4	33.8	15.3	49.1
T3NS	36.2	42.8	1.8	44.6	53.2	2.5	55.7
T3S	42.2	59.3	1.1	60.4	38.2	2.7	40.9
T4NS	66.4	16.1	10.1	26.2	16.3	8.8	25.1
T4S	59.3	35.5	4.0	39.6	15.8	2.4	18.2
EE	5.55	6.75	3.18	7.51	5.39	3.41	5.86

NS: cows without shade; S: cows with shade; T2: (10:00–13:00); T3: (13:00–16:00); T4: (16:00–19:00). Means with different literal within column are different ($p \leq 0.05$); EE: Standard error.

ruminated longer than NS cows during the hours of highest THI and solar radiation, and also spent more time in this activity while standing. These results match those of Vizzotto *et al.* (2015), in which cows preferred to ruminate standing while under shade. The explanation for these behaviors lies in the fact that, as reported by Nordlund *et al.* (2019), the standing position represents an advantage in terms of body heat dissipation. The shorter total rumination time in NS cows coincides with that reported by Moretti *et al.* (2017), however, is surprising because the lack of difference in grazing time allows the assumption that there must have been no difference in forage intake. In October, NS cows had a longer standing rest time, which was due to changes in THI. According to Wang *et al.* (2018), by standing, cows increase the body surface area exposed to the wind and thus increase the amount of convective heat loss. In this study, differences in standing rest time were observed during the day shifts with the highest THI and solar radiation in October. This result is in agreement with Herbut and Angrecka (2018), who found that the time of cows in lying position decreased 21 %, going from THI of 68 for 3 h to THI greater than 68 for more than 12 h. In October, access to shade did not change the time the cows spent grazing, a situation also reported by Schütz *et al.* (2014). In the present study, during the 24-h period in both periods, there were no differences in the time spent ruminating, resting, and lying prostrate between S and NS cows (Figure 2). The fact that the amount of time

cows spent grazing, ruminating, resting, or lying down in the total 24 h was not different between groups, is an indicator that the level of stress was not severe enough to maintain changes in behavior across days. The severity of heat stress depends on day and night conditions. If the ambient temperature is below 21 °C for at least 3 h during the night, the cow can dissipate the heat gained during the day (Igono *et al.*, 1992). In this study, in both experimental stages, the night temperature was lower than 21 °C for more than 3 h, while the minimum temperature was 10.7 and 8 °C in May and October, respectively. This is why the cows must have been able to dissipate during the night some of the heat gained during the day.

Heat stress-induced behavioral changes can negatively impact emotional state in dairy cows (Polsky and von Keyserlingk, 2017). In this study, shade was effective in attenuating the effects on dairy cows of daytime weather conditions, although their behavioral changes did not necessarily indicate a heat stress situation as they may be the result of compensatory mechanisms, as indicated by Alves *et al.* (2017).

CONCLUSIONS

Solar radiation levels were needed along with THI to explain behavioral changes in New Zealand Holstein cows. Between 10:00 and 19:00 in the warm season (May) the Temperature and Humidity Index (THI) and solar radiation in the temperate conditions of this study affected the time spent by these cows in grazing, ruminating and resting; in the cool season (October) the situation was similar except that THI and solar radiation did not affect the time spent in ruminating. The time cows remained in the shade increased with increases in THI and solar radiation in those hours.

These changes did not necessarily indicate a heat stress situation as they may be the result of a compensatory mechanism. Shade proved beneficial in facilitating the use of these compensatory mechanisms by cows during the day; furthermore, the preference of New Zealand Holstein dairy cows for nocturnal shelter was evident in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the financial support provided during the first author's doctoral studies.

REFERENCES

- Alves JRA, Andrade TAA, Assis DM, Gurgão TA, Melo LRB, Souza BB. 2017. Productive and reproductive performance, behavior and physiology of cattle under heat stress conditions. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology* 5 (3): 91–96. <https://doi.org/10.31893/2318-1265jabb.v5n3p91-96>
- Améndola-Massiotti RD, Jiménez-Rosales JD, Burgueño-Ferreira JA, Ramírez-Valverde R, Vázquez-Hernández I, Valerio-Hernández JE, Huerta-Bravo M. 2018. Composition of herbage consumed in mixed sequential grazing of cows with ewes as followers. *Journal of Applied Animal Research* 46 (1): 1418–1423. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1520112>
- Améndola L, Solorio FJ, Ku-Vera JC, Améndola-Massiotti RD, Zarza H, Mancera KF, Galindo F. 2019. A pilot study on the foraging behaviour of heifers in intensive silvopastoral and monoculture systems in the tropics. *Animal* 13 (3): 606–616. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001532>

- Armstrong DV. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science* 77 (7): 2044–2050. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77149-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77149-6)
- Bateson M, Martin P. 2021. *Measuring behaviour: an introductory guide* (Third Edition). Cambridge University Press: Cambridge, UK. <https://doi.org/10.1017/9781108776462>
- Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Imtiwati P, Kumar R. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World* 9 (3): 260–268. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268>
- García ME. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen* (Quinta Edición). Instituto de Geografía de la UNAM: Ciudad de México, México. 90 p.
- Herbut P, Angrecka S. 2018. Relationship between THI level and dairy cows' behaviour during summer period. *Italian Journal of Animal Science* 17 (1): 226–233. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1333892>
- Higgins SF, Agouridis CT, Wightman SJ. 2011. *Shade options for grazing cattle*. University of Kentucky, College of Agriculture: Lexington, KY, USA. 8 p.
- Igono MO, Bjotvedt G., Sanford-Crane HT. 1992. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. *International Journal of Biometeorology* 36 (2): 77–87. <https://doi.org/10.1007/BF01208917>
- Kendall PE, Nielsen PP, Webster JR, Verkerk GA, Littlejohn RP, Matthews LR. 2006. The effects of providing shade to lactating dairy cows in a temperate climate. *Livestock Science* 103 (2): 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.02.004>
- Moretti R, Biffani S, Chessa S, Bozzi R. 2017. Heat stress effects on Holstein dairy cows' rumination. *Animal* 11 (12): 2320–2325. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001173>
- Nordlund KV, Strassburg P, Bennett TB, Oetzel GR, Cook NB. 2019. Thermodynamics of standing and lying behavior in lactating dairy cows in freestall and parlor holding pens during conditions of heat stress. *Journal of Dairy Science* 102 (7): 6495–6507. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15891>
- Palacio S, Bergeron R, Lachance S, Vasseur E. 2015. The effects of providing portable shade at pasture on dairy cow behavior and physiology. *Journal of Dairy Science* 98 (9): 6085–6093. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8932>
- Penning PD, Rutter SM. 2004. Ingestive behaviour. *In*: Penning PD. (ed.). *Herbage intake handbook* (2nd edition). The British Grassland Society: Dunston, UK, pp: 151–175.
- Polsky L, von Keyserlingk MAG. 2017. Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* 100 (11): 8645–8657. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12651>
- Pullin AN, Pairis-Garcia MD, Campler MR, Proudfoot KL. 2017. Validation of scan sampling techniques for behavioural observations of pastured lambs. *Animal Welfare* 26 (2): 185–190. <https://doi.org/10.7120/09627286.26.2.185>
- Rees A, Fischer-Tenhagen C, Heuwieser W. 2016. Effect of heat stress on concentrations of faecal cortisol metabolites in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 51 (3): 392–399. <https://doi.org/10.1111/rda.12691>
- SAS Institute, Inc. 2017. *SAS/STAT® 14.3 User's Guide: High-Performance Procedures*. SAS Institute, Inc.: Cary, NC, USA, 800 p.
- Schütz KE, Cox NR, Tucker CB. 2014. A field study of the behavioral and physiological effects of varying amounts of shade for lactating cows at pasture. *Journal of Dairy Science* 97 (6): 3599–3605. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7649>
- Schütz KE, Lee C, DeVries TJ. 2018. Cattle priorities: Feed and water selection, ability to move freely and to access pasture. *Advances in Cattle Welfare 2018*: 93–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100938-3.00005-X>
- Sheahan AJ, Gibbs SJ, Roche JR. 2013. Diurnal patterns of grazing behavior and humoral factors in supplemented dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96 (5): 3201–3210. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6201>
- Tucker BC, Rogers AR, Schütz KE. 2008. Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour, use of shade and body temperature in a pasture-based system. *Applied Animal Behaviour Science* 109 (2): 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.015>
- Van laer E, Moons CPH, Sonck B, Tuytens FAM. 2014. Importance of outdoor shelter for cattle in temperate climates. *Livestock Science* 159: 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.003>

- Van laer E, Tuyttens FAM, Ampe B, Sonck B, Moons CPH, Vandaele L. 2015. Effect of summer conditions and shade on the production and metabolism of Holstein dairy cows on pasture in temperate climate. *Animal* 9 (9): 1547–1558. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000816>
- Veissier I, Van laer E, Palme R, Moons CPH, Ampe B, Sonck B, Andanson S, Tuyttens FAM. 2018. Heat stress in cows at pasture and benefit of shade in a temperate climate region. *International Journal of Biometeorology* 62 (4): 585–595. <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1468-0>
- Vizzotto EF, Fischer V, Thaler Neto A, Abreu AS, Stumpf MT, Werncke D, Schmidt FA, McManus CM. 2015. Access to shade changes behavioral and physiological attributes of dairy cows during the hot season in the subtropics. *Animal* 9 (9): 1559–1566. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000877>
- Wang X, Zhang G, Choi CY. 2018. Effect of airflow speed and direction on convective heat transfer of standing and reclining cows. *Biosystems Engineering* 167: 87–89. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.12.011>.

CONDUCTA DE PASTOREO DE VACAS HOLSTEIN NEOZELANDÉS CON ACCESO A SOMBRA

Marisol Ortiz-Texon¹, Rodolfo Ramírez-Valverde¹, María Esther Ortega-Cerrilla², Lucía Améndola-Saavedra³, Juan Andrés Burgueño-Ferreira⁴, Ricardo Daniel Améndola-Massiotti^{*}

¹ Universidad Autónoma Chapingo. Posgrado en Producción Animal. Carretera México- Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, Mexico. C. P. 56264.

² Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mexico. C. P. 56264.

³ Animal Welfare Advisor. Carretera México- Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, Mexico. C. P. 56230.

⁴ Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Carretera México-Veracruz km 45, El Batán, Texcoco, Estado de México, Mexico. C. P. 56237.

* Autor para correspondencia: r_amendola@yahoo.com

RESUMEN

El acceso a sombra disminuye el estrés térmico de vacas lecheras en pastoreo, pero puede reducir su tiempo de pastoreo. Se planteó que el acceso a la sombra alteraría la conducta de pastoreo de vacas Holstein Neozelandés. El objetivo fue evaluar la distribución del empleo de tiempo de vacas con y sin acceso a sombra en un ambiente con clima templado subhúmedo con lluvias en verano, donde la temperatura media anual varía entre 12 (enero) y 18 °C (mayo). Durante las épocas cálida (mayo) y fresca (octubre) de 2017, dos lotes de nueve vacas Holstein Neozelandés en lactación pastaron en dos tratamientos, con (S) y sin (NS) acceso a sombra. La conducta se registró cada 10 min durante 5 d por época. Las variables respuesta fueron: tiempos de pastoreo; rumia de pie, postrada y total; descanso de pie, postrada y total. Los datos se clasificaron como diurnos (07:00 a 19:00 h) y nocturnos (19:00 a 07:00 h); los primeros se agruparon en cuatro turnos en función de Índice de Temperatura y Humedad (ITH) y radiación solar. Se analizó con un modelo lineal general y el procedimiento MIXED. En la época cálida (19 °C, precipitación de 44.3 mm) las vacas con acceso a sombra pastorearon 16 % menos tiempo ($p \leq 0.05$) en los turnos de mayor (ITH) y radiación solar, siendo mayor el porcentaje de utilización de la sombra. Durante la época fresca (16 °C, precipitación de 62.0 mm) en momentos de mayor ITH (71.0) y radiación solar (880.5 Wm⁻²) las vacas S rumiaron de pie 44 % más tiempo ($p \leq 0.05$), con tiempo total de rumia 30.7 % mayor ($p \leq 0.05$) que las NS; éstas últimas descansaron de pie 22.5 % más tiempo ($p \leq 0.05$). El acceso a sombra modificó la conducta de vacas Holstein Neozelandés que pastaron en clima templado de México.

Palabras clave: radiación solar, ITH, sombra artificial, México, vaca lechera.

INTRODUCCIÓN

Existe un creciente interés social, en Alemania, por ejemplo, por el bienestar de animales de especies pecuarias, dirigido a mejoras en los sistemas de producción para mi-

Citation: Ortiz-Texon M, Ramírez-Valverde R, Ortega-Cerrilla ME, Améndola-Saavedra L, Burgueño-Ferreira JA, Améndola-Massiotti RD. 2022. Conducta de pastoreo de vacas Holstein Neozelandés con acceso a sombra. *Agrociencia*. 56(8): 1431-1458. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2446>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: September 10, 2021.
Approved: December 01, 2022.
Published in Agrociencia:
January 11, 2023.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



nimizar aspectos ambientales con efectos negativos sobre el bienestar animal (Schütz *et al.*, 2018). En vacas lecheras, la exposición a temperatura ambiental, radiación solar y humedad elevadas puede inducir incomodidad y estrés calórico – i.e., desequilibrio entre producción y disipación de calor metabólico (Das *et al.*, 2016) – y por tanto reducir su bienestar y desempeño productivo (Moretti *et al.*, 2017). El estrés por calor se define como la suma de fuerzas externas al animal que causa un aumento de la temperatura corporal y provoca una respuesta fisiológica (Polsky y von Keyserlingk, 2017). El Índice de Temperatura y Humedad (ITH) se usa como una medida de confort térmico en vacas lecheras (Polsky y von Keyserlingk, 2017), en el cual la radiación solar tiene una función importante (Schütz *et al.*, 2014). La conducta de las vacas lecheras se puede usar para evaluar de manera directa el estrés calórico y confort, ya que las vacas con estrés calórico modifican su conducta de pastoreo (Vizzotto *et al.*, 2015) y reducen su actividad física como caminar o rumiar (Das *et al.*, 2016). Asimismo, para mejorar la disipación de calor corporal, incrementan el tiempo de rumia y descanso paradas a costa del tiempo postradas, el cual es fundamental para el confort de las vacas lecheras (Tucker *et al.*, 2008).

Van laer *et al.* (2014) advierten que en la producción bovina en climas templados se desconoce en gran medida si las vacas sufren incomodidad ocasionada por las condiciones ambientales, o si se requiere actuar para prevenir dicha incomodidad; aunque Rees *et al.* (2016) y Moretti *et al.* (2017) sostienen que, incluso en condiciones templadas, las vacas pueden presentar estrés térmico moderado. En climas templados no es frecuente que se aporte sombra a las vacas en pastoreo (Van laer *et al.*, 2015b; Veissier *et al.*, 2018). En esas condiciones climáticas, proporcionar sombra a las vacas lecheras puede ser un recurso para mitigar los efectos de las condiciones climáticas, el cual les permita modificar su conducta de pastoreo y aumentar su tiempo de descanso durante las horas de mayor calor (Palacio *et al.*, 2015; Vizzotto *et al.*, 2015). Por lo anterior, en este estudio se hipotetizó que el acceso a la sombra modificaría la conducta de vacas lecheras, y el objetivo fue evaluar los cambios en el tiempo de pastoreo, rumia y descanso de vacas Holstein Neozelandés en lactancia, con o sin sombra, durante dos épocas del año contrastantes en una zona templada de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en dos etapas durante 2017; la primera en mayo, que es la época más cálida en el sitio experimental, y la segunda en octubre, una temporada más fresca que coincide con el otoño. El estudio tuvo lugar en el Módulo de Pastoreo de la Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' N, 98° 54' O, altitud de 2240 m). El clima del sitio es templado subhúmedo, con 644.8 mm de precipitación media anual y régimen de lluvias en verano; la temperatura media anual fluctúa entre 11.2 (enero) y 17.9 °C (mayo) (García, 2004).

En el experimento se evaluaron los tratamientos S (con acceso a sombra) y NS (sin acceso a sombra). Se utilizaron 18 vacas Holstein Neozelandés en lactancia distribuidas en dos grupos de nueve con base en el peso vivo, los días en leche y la edad, por medio

de azar estratificado; a su vez estos grupos se asignaron al azar entre los tratamientos. En mayo las vacas de NS tuvieron un peso inicial de 481 ± 20 kg, una producción inicial de leche de 21.9 ± 1.5 L d⁻¹, y tenían 125 ± 24 días en leche; las vacas S tuvieron un peso inicial de 485 ± 17 kg, una producción inicial de leche de 23.0 ± 1.8 L d⁻¹, y tenían 102 ± 28 días en leche. En octubre las vacas tuvieron un peso inicial de 523.9 ± 19.8 kg y una producción inicial de leche de 15.98 ± 0.77 L d⁻¹, descenso productivo que correspondió al avance de la lactancia. No se cuantificó la proporción de colores de piel, pero el color de piel predominante fue negro, lo cual es una característica racial.

Las vacas se manejaron en pastoreo rotacional en cinco potreros de, en promedio, 0.54 ha de praderas asociadas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y pasto ovinillo (*Dactylis glomerata* L.) que tuvieron en promedio 5 días de ocupación y 30 días de descanso. Los potreros fueron rectángulos de 36 m por 150 m divididos por la mitad; los grupos de vacas entraban por lados opuestos al potrero. El área diaria de pastoreo se definió en función de la masa de forraje y una asignación diaria determinada por una meta de consumo total de materia seca (MS) de 3 % del peso vivo y una meta de eficiencia de pastoreo (por encima de 5 cm) de 70 % en mayo y 80 % en octubre. Adicionalmente las vacas recibieron alimentación suplementaria con 2.7 kg MS d⁻¹ de concentrado comercial y ensilado de maíz (2.1 kg MS d⁻¹ en mayo y 2.7 kg MS d⁻¹ en octubre); la cantidad diaria de suplemento se dividió en dos y se suministró después de cada ordeña (que ocurrieron entre las 6:30 y las 08:00, y entre las 15:30 y las 17:00).

Las estructuras de sombra artificial, colocadas en un extremo del área destinada a S, se construyeron con malla sombra al 80 % sostenida por tubos de acero conforme al diseño propuesto por Higgins *et al.* (2011). Se usaron cuatro estructuras móviles de 4 x 4 m y 2.6 m de altura cada una; el bebedero se colocó a 2 m de la sombra. La disponibilidad de sombra por vaca fue de 7.11 m², valor dentro del rango recomendado por Higgins *et al.* (2011) para vacas lecheras en pastoreo y 53 % superior al empleado por Palacio *et al.* (2015). En mayo las condiciones climáticas promedio entre las 10:00 y las 19:00 sin sombra fueron ITH 73.5 y radiación 921 W m⁻², en tanto que, bajo la estructura de sombra los valores fueron 71.7 y 226 W m⁻². Por su parte en octubre los valores sin sombra fueron ITH 68.8 y radiación 700 W m⁻², y 67.9, 177 W m⁻² bajo la estructura de sombra. La conducta de las vacas se registró durante cinco días de mayo y cinco días de octubre en ciclos de 24 h, siendo los segundos días de ocupación (pastoreo) de cinco diferentes potreros en cada época; de esta manera, la distancia promedio entre ambos lotes durante los días de medición fue de 105 m. La duración de las fases experimentales fue de cinco semanas en ambas estaciones. El registro de las actividades fue realizado por seis observadores (entrenados durante un mes previo a la toma de datos) cada diez minutos, por el método de barrido sugerido por Pullin *et al.* (2017) y recomendado por Bateson y Martin (2021). A cada vaca se asignó un número que se pintó en ambos flancos, para facilitar la identificación a distancia. Para el registro de actividades nocturnas, los observadores emplearon lámparas de bolsillo que encendieron exclusivamente en los momentos de toma de datos. Los observadores trabajaron en parejas en tandas de tres horas, cada integrante de la pareja registró actividades en uno de los tratamientos.

El registro de las actividades relacionadas con la conducta de pastoreo incluyó si la vaca se encontraba en pastoreo, rumia de pie o postrada, o en descanso (sin movimientos mandibulares) de pie o postrada (Sheahan *et al.*, 2013); además, se registró si la vaca se encontraba dentro o fuera de la sombra. Se consideró que la vaca a) pastoreaban si con la cabeza hacia abajo tomaba un bocado o caminaba en busca de una siguiente estación de alimentación; b) rumiaba si realizaba movimientos de masticación sin forraje fresco en la boca; c) estaba echada si su flanco estaba en contacto con el suelo y de pie en caso contrario.

La radiación solar, temperatura y humedad relativa se midieron dentro y fuera de la sombra, con un medidor solar (Amprobe® SOLAR-100 Solar Power, Glottertal, Alemania) y un termo higrómetro (Amprobe® THWD-5, Glottertal, Alemania). El ITH se calculó para las 11:00, 15:00 y 17:00 h de acuerdo a Schütz *et al.* (2014) y Palacio *et al.* (2015) (Ecuación 1).

$$ITH = (1.8 \times T + 32) - ((0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26)) \quad (1)$$

donde T es la temperatura del aire (°C) y RH es la humedad relativa del ambiente (%).

Análisis estadístico

Para efectos del análisis, las observaciones se dividieron en diurnas (de 07:00 a 19:00 h) y nocturnas (de 19:00 a 07:00 h). En función de la radiación solar y el ITH, el periodo diurno se dividió en cuatro turnos: T1 (07:00–10:00), T2 (10:00–13:00), T3 (13:00–16:00) y T4 (16:00–19:00).

Para determinar los cambios en el acceso a la sombra, se realizó un análisis con un modelo lineal general con el procedimiento MIXED (SAS Institute Inc., 2017). El modelo incluyó los efectos fijos de turno, día, su interacción, y el efecto aleatorio de vaca; para el análisis de los periodos diurno y nocturno, se incluyó el efecto de periodo, día y su interacción. La comparación de medias se realizó por medio de la prueba de Tukey con $p \leq 0.05$.

Para el análisis de las conductas registradas en los muestreos de barrido, se sumó el tiempo dedicado a cada conducta por vaca para obtener el tiempo total en cada periodo, para ello se asumió que cada registro fue representativo de la actividad realizada en el tiempo transcurrido desde el registro previo (Penning y Rutter, 2004). A continuación, se calculó el promedio de cada actividad en cada tratamiento, para los turnos T2, T3 y T4, periodos diurno, nocturno y total. El muestreo de barrido fue seleccionado con base en métodos ampliamente validados para el registro de conducta animal (Pullin *et al.*, 2017; Bateson y Martin, 2021). Así mismo, se ha demostrado que los intervalos entre observaciones de hasta 15 min capturan de manera representativa la conducta del ganado bovino en pastoreo (e. g., Améndola *et al.*, 2019). Las variables dependientes fueron tiempos de pastoreo, rumia de pie, rumia postrada, total de rumia, descanso de pie, descanso postrada y descanso total. El análisis se realizó con el procedimiento GLM (SAS Institute Inc., 2017), para los turnos T2, T3 y T4, el modelo incluyó el efecto de tratamiento, turno, interacción tratamiento x turno, y día,

así como la inclusión de ITH y radiación solar como covariables. Se incluyeron las covariables, por separado y las dos juntas en el modelo, se analizó la significancia de los efectos y se calculó el porcentaje de reducción de la suma de cuadrados al incluir las covariables. Para los periodos diurno, nocturno y total, el modelo incluyó el efecto de tratamiento día y su interacción. Las medias de los tratamientos se obtuvieron con la instrucción LSMEANS y su comparación se realizó con PDIFF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones climáticas

La radiación solar y el ITH durante los turnos T2, T3 y T4 en las dos etapas presentaron variaciones amplias entre los tres turnos, así como entre días (Figura 1). Para ambas variables climáticas, en mayo se registraron valores altos en el T3, mientras que en octubre la radiación solar en T2 y T3 fue aparentemente similar. Valores altos de radiación solar durante mayo se presentaron los días 3 y 4, mientras que los valores de ITH en el T3 durante los 5 días experimentales fueron superiores a 72, valor de referencia para estrés por calor leve en ganado lechero (Polsky y von Keyserlingk, 2017). En octubre, se presentaron niveles de radiación elevada en el T2 de los días 1 y 2, mientras que el ITH superó 72 en los días 1 y 5 durante el T3.

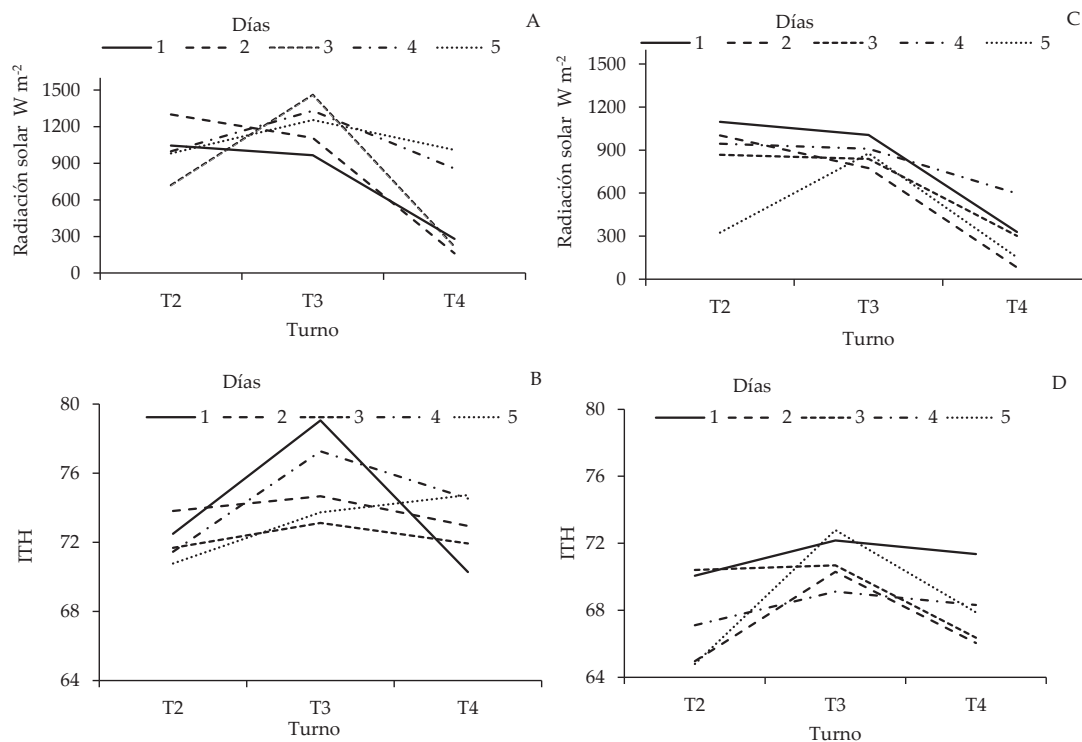


Figura 1. Radiación solar e ITH calculado para diferentes turnos del día durante la evaluación (5 d) de la conducta de vacas lecheras en apacentamiento en mayo (A y B) y octubre (C y D).

Acceso a la sombra

En ambas etapas se presentaron diferencias ($p \leq 0.05$) en el acceso a la sombra por las vacas debido al efecto de periodo, turno y día, así como su interacción para los cuatro turnos del día (Cuadro 1). El acceso a la sombra no fue diferente ($p > 0.05$) entre los periodos diurno y nocturno de mayo; no obstante, el tiempo que las vacas dedicaron a emplear el recurso sombra fue mayor ($p \leq 0.05$) durante T3 que en los demás turnos. Las vacas lecheras accedieron a la estructura para sombra de igual forma en ambas épocas. Los cambios en el acceso a sombra a través de los turnos entre las épocas pueden deberse a las evoluciones del ITH y la radiación solar (Figura 1). En mayo ambas variables presentaron los valores más altos en el T3, mismos que sobrepasaron el valor crítico de ITH de 72. En octubre, el mayor acceso a sombra durante el periodo diurno se presentó durante T3, que coincidió con mayores valores de radiación solar entre 1000 y 1500 Wm^{-2} . La incidencia del ITH y la radiación solar, al incluirse como covariables de manera conjunta, mejora el ajuste de los modelos (Cuadro 2, 3). Esto indica que la sombra es un recurso importante para las vacas cuando los valores de ITH y la radiación apenas sobrepasan el límite de confort térmico definido por Armstrong (1994). Estos resultados coinciden con los reportes de diferentes autores; por una parte, Palacio *et al.* (2015) informan que las vacas están en confort con valores de ITH inferiores a 70. Por otra parte, de forma consistente, se ha demostrado que en climas

Cuadro 1. Uso de sombra (min) por vacas lecheras en pastoreo, durante los días de evaluación en diferentes periodos y turnos del día en mayo y octubre.

May	Día					Niveles de significancia				
	1	2	3	4	5	Media periodo o turno	EE	Periodo o turno	Día	Periodo o turno x día
T1	0 c	0 c	0 c	0 c	2.2 c	0.4	4.87	≤ 0.0001	0.0013	≤ 0.0012
T2	11.1 c	3.3 c	2.2 c	1.1 c	13.3 bc	6.2				
T3	37.8 a	7.8 c	21.1 abc	31.1 ab	42.2 a	28				
T4	1.11 c	14.1 bc	0 c	2.2 c	12.2 bc	6				
Media	12.5	6.4	5.8	8.6	17.5					
Diurno	50 b	25.6 b	23.3 b	34.4 b	70 b	40.7	22.39	0.3891	≤ 0.0001	≤ 0.0001
Nocturno	193.3 a	0b	54.4 b	4.4 b	10 b	52.4				
Media	121.7	12.8	38.9	19.4	40					
October										
T1	2.2 d	17.8 cd	2.2 d	1.1 d	6.7 d	6	6.74	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001
T2	23.3 bcd	40 bc	25.6 bcd	10 cd	5.6 d	20.9				
T3	32.2 bdc	36.7 bc	8.9 cd	45.5 b	81.1 a	40.9				
T4	10 cd	32.2 bcd	8.9 cd	30 bcd	13.3 cd	18.9				
Media	17	31.7	11.4	21.7	26.7					
Diurno	67.8 b	126.7 b	45.6 b	87.8 b	106.7 b	86.9	43.7	0.0071	0.0004	0.0051
Nocturno	163.3 ab	157.8 ab	36.7 b	273.3 a	74.4 b	141.1				
Media	115.6	142.2	41.1	180.6	90.6					

T1: (7:00–10:00); T2: (10:00–13:00); T3: (13:00–16:00); T4: (16:00–19:00). Medias de Periodo o Turno x Día seguidas de índices similares no son diferentes ($p > 0.05$). EE: Error estándar.

Cuadro 2. Niveles de significancia de la conducta de pastoreo para vacas con o sin acceso a sombra para los turnos T2, T3 y T4, en mayo.

Variable	Estadísticos [†]	Trat [‡]	Porcentaje SC	Turno	Porcentaje SC	Trat x Turno	Día
Pastoreo	<i>p</i>	0.0320		≤ .0001		0.1509	0.7374
	THI	0.0707	27.4	≤ .0001	13.3		
	Rad	0.9951	99.9	0.0002	37.4		
	THI+Rad [§]	0.9998	100	0.0004	40.3		
Rumia de pie	<i>p</i>	0.2088		≤ .0001		0.3160	0.6878
	THI			≤ .0001	0.5		
	Rad			≤ .0001	41.1		
	THI+Rad			0.0002	42.1		
Rumia postrada	<i>p</i>	0.8968		0.0003		0.9809	0.730
	THI			0.0005	4.4		
	Rad			0.0007	13.6		
	THI+Rad			0.0023	28.7		
Rumia total	<i>p</i>	0.1470		≤ .0001		0.2155	0.9115
	THI			≤ .0001	0		
	Rad			≤ .0001	34.1		
	THI+Rad			≤ .0001	37.8		
Descanso de pie	<i>p</i>	0.4721		0.0020		0.92410	0.8062
	THI			0.0067	20.5		
	Rad			0.1391	74.3		
	THI+Rad			0.1883	77.5		
Descanso postrada	<i>p</i>	0.8929		0.0017		0.2547	0.3083
	THI			0.0029	5.1		
	Rad			0.0276	48.9		
	THI+Rad			0.0333	48.9		
Descanso Total	<i>p</i>	0.5494		≤ .0001		0.4219	0.6538
	THI			≤ .0001	13.3		
	Rad			0.0027	65.4		
	THI+Rad			0.0042	66.6		

p[†] Nivel de significancia y porcentaje de reducción en la suma de cuadrados (SC) explicada por la inclusión de las covariables ITH y radiación; [‡]: Tratamiento.

templados la radiación afecta el acceso a la sombra; las vacas acceden en mayor medida al recurso sombra cuando el efecto de la protección contra la radiación solar es mayor (Tucker *et al.*, 2008).

En nuestro estudio, las vacas Holstein Neozelandés hicieron uso de la estructura para sombra de igual forma en ambas fases y en mayor medida en el periodo nocturno. Las vacas tuvieron un periodo de un mes de habituación a la estructura de sombra, además hicieron uso de la estructura durante el primer día de evaluación. Estos hechos, sumados al uso nocturno de la estructura, indican que estaban acostumbradas a usar la estructura de sombra. El mayor uso de la estructura de sombra en periodos nocturnos en ambos meses sugiere la presencia de factores diferentes al acceso a sombra *per se*; sin embargo, las variables tomadas en cuenta en este estudio no fueron suficientes

Table 3. Significance levels of grazing behavior for cows with and without access to shade for T2, T3 and T4 shifts in October.

Variable	Estadísticos [†]	Trat [‡]	Porcentaje SC	Turno	Porcentaje SC	Trat x Turno	Día
Pastoreo	<i>p</i>	0.8120		≤ 0.0001		0.4529	0.7230
	THI			0.0082	58.6		
	Rad			0.0002	13.8		
	THI+Rad			0.0068	56.4		
Rumia de pie	<i>p</i>	0.0185		0.0048		0.6138	0.5123
	THI	0.0406	23.6	0.0125	18.1		
	Rad	0.0711	43.9	0.2138	76.1		
	THI+Rad	0.0545	34.4	0.1685	71.6		
Rumia postrada	<i>p</i>	0.4412		0.0445		0.5475	0.5639
	THI			0.1986	49.6		
	Rad			0.0125	0		
	THI+Rad			0.0976	31.4		
Rumia total	<i>p</i>	0.0626		0.0300		0.8388	0.3432
	THI	0.1021	20.4	0.0403	4.6		
	Rad	0.0315	0	0.9069	97.8		
	THI+Rad	0.0230	0	0.6447	90.1		
Descanso de pie	<i>p</i>	0.0658		≤ .0001		0.4071	0.0727
	THI	0.0927	12.9	0.0002	15.7		
	Rad	0.0352	0	0.0006	36.1		
	THI+Rad	0.0311	0	0.0008	37.6		
Descanso postrada	<i>p</i>	0.6970		0.0100		0.3929	0.1103
	THI			0.0320	27.3		
	Rad			0.0113	2.3		
	THI+Rad			0.1106	55.4		
Descanso total	<i>p</i>	0.0570		≤ .0001		0.7532	0.1337
	THI	0.1047	25.9	0.0001	2.3		
	Rad	0.1352	39.1	0.0030	50.3		
	THI+Rad	0.1083	27.3	0.0031	49.1		

[†]*p* Significance level and percent reduction in the sum of squares (SC) explained by the inclusion of the THI and radiation covariates; [‡]: Treatment.

para explicar la preferencia de las vacas por el uso de la estructura de sombra como refugio durante la noche.

Conducta de pastoreo

En mayo hubo efecto de tratamiento ($p \leq 0.05$) en el tiempo de pastoreo (Cuadro 2), y en todas las actividades hubo efecto de turno ($p \leq 0.05$); sin embargo, en ninguna actividad hubo efectos de día y de la interacción tratamiento por turno ($p > 0.05$). Para todas las variables, la radiación solar y el ITH de manera conjunta explicaron el mayor porcentaje de la suma de cuadrados del efecto de turno. Para tiempo de pastoreo, el ITH se vinculó con 27.4 % de la suma de cuadrados del efecto de tratamiento, y la

radiación con 99.9 %, mientras que para el efecto de turno explicaron 13.3 y 37.4 %, de manera respectiva.

Estos resultados evidencian la importancia de incluir los niveles de radiación solar junto con el ITH, como indicadores de riesgos de deterioro del bienestar relacionado al estrés térmico en vacas lecheras en pastoreo (Veissier *et al.*, 2018). En octubre hubo efecto ($p \leq 0.05$) de tratamiento (Cuadro 3) para rumia de pie, rumia total, y descanso de pie; además hubo efecto de turno para todas las variables. Para rumia de pie, rumia total, descanso de pie y descanso total, la radiación explicó el mayor porcentaje de la suma de cuadrados del efecto de turno, mientras que, para rumia postrada, descanso postrada y pastoreo, la mayor proporción se asoció al ITH. En la suma de cuadrados del efecto de tratamiento, el ITH explicó 23.6, 20.4 y 12.9 % para rumia de pie, descanso total y descanso de pie. A pesar de que octubre es considerado una época fresca del año, estos resultados indican que los niveles de ITH y radiación solar durante dicho mes pueden provocar cambios en la conducta de las vacas lecheras ante la presencia de sombra.

En mayo, las vacas S mostraron 16 % menos tiempo de pastoreo por turno (67.5 vs. 80.5 min \pm 3.92; $p \leq 0.05$) (Cuadro 4). El acceso a sombra no modificó ($p > 0.05$) los tiempos de rumia (en posición de pie o postrada y total) ni los tiempos de descanso (en posición de pie o postrada, y total). Las vacas S modificaron su tiempo de pastoreo durante el día; esta disminución estuvo relacionada de manera principal con la radiación solar;

Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados para variables de conducta de pastoreo (min) en vacas con o sin acceso a sombra durante diferentes turnos del día en mayo.

Efecto	Pastoreo	Rumia de pie	Rumia echada	Rumia total	Descanso de pie	Descanso echada	Descanso total
Tratamiento							
NS	80.5 a	37.8	9.3	47.2	18.3	6.4	24.7
S	67.7 b	40.0	9.7	54.7	20.4	6.1	26.6
EE	3.9 2	3.91	1.99	3.54	2.07	1.53	2.15
Shift							
T2	74.2 b	56.6 a	17.2 a	73.9 a	19.4 a	7.7 a	27.1 b
T3	51.7 c	55.2 a	11.2 a	66.4 a	26.8 a	11.1 a	37.9 a
T4	96.4 a	12.4 b	0.1b	12.2 b	11.9 b	0.1 b	12 c
EE	4.81	4.79	2.44	4.33	2.54	1.88	2.63
Tratamiento x Turno							
T2NS	87.5	47.1	16.7	63.7	18.6	5.5	24.1
T2S	60.9	66.2	17.8	84	20.2	9.8	30.0
T3NS	51.1	55.8	11.1	66.8	26.2	13.5	39.7
T3S	52.2	54.7	11.3	66.1	27.3	8.7	36.0
T4NS	102.8	10.6	0.2	10.9	10.0	0.2	10.2
T4S	90.0	14.2	0.0	14.2	13.7	0.0	13.7
EE	10.79	10.9	5.45	9.56	5.72	4.34	6.01

NS: vacas sin sombra; S: vacas con sombra; T2: (10:00–13:00); T3: (13:00–16:00); T4: (16:00–19:00). Medias con literal diferente dentro de columna son diferentes ($p \leq 0.05$); EE: Error estándar.

además, el acceso a la sombra aumentó cuando la radiación fue más alta, lo que indica que las vacas prefirieron acceder al recurso en lugar de dedicar su tiempo a pastorear. En concordancia con nuestro estudio, Kendall *et al.* (2006) también reportaron disminución de pastoreo en las vacas con sombra en clima templado de Nueva Zelanda. En el presente estudio, el tiempo de pastoreo nocturno no fue diferente ($p > 0.05$) entre vacas con o sin acceso a sombra (Figura 2). Como recibieron suplementación, es probable que las vacas S no necesitaran compensar el menor tiempo de pastoreo diurno.

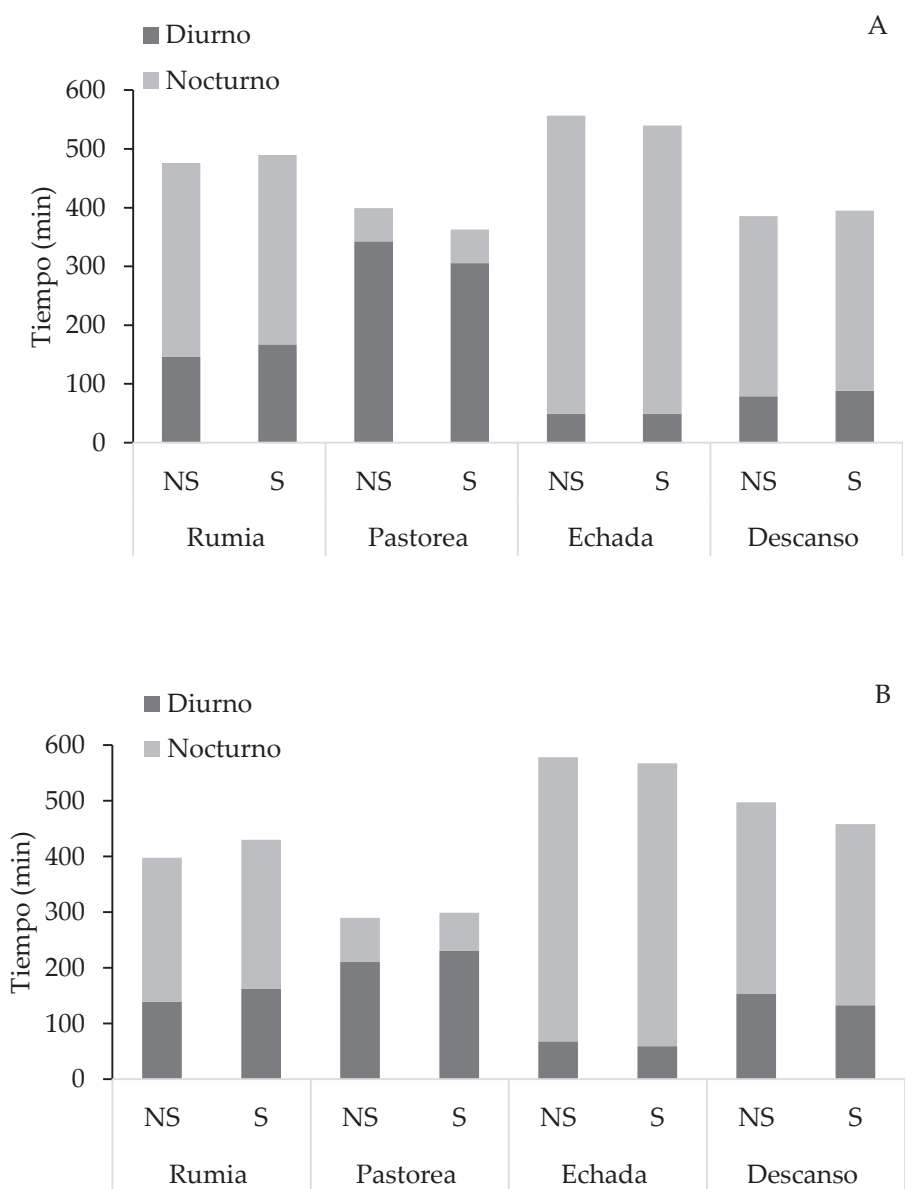


Figura 2. Conducta de vacas en pastoreo durante los periodos diurno y nocturno de vacas sin (NS) y con acceso a sombra(S) durante mayo (A) y octubre (B).

Éstas debieron tener disponibilidad de forraje de alta calidad ya que, en las mismas praderas con el mismo tipo de animales, Améndola-Massiotti *et al.* (2018) reportaron 25 % proteína cruda y 40 % fibra detergente ácido, en promedio, para ambas épocas del año. Esta buena composición del forraje pudo estar vinculado al hecho de que las vacas, al haber adquirido suficientes nutrientes y haber reducido su impulso de hambre, no dedicaran mayor tiempo a pastorear en lugar de descansar bajo la sombra. Por el contrario, en octubre (Cuadro 5), el acceso a sombra no afectó ($p > 0.05$) los tiempos dedicados a pastorear, rumiar en posición postrada, descanso en posición postrada y total durante las horas de mayor ITH y radiación solar. En esa época, las vacas S tuvieron 44 % más tiempo de rumia mientras estaban de pie (46.4 *vs.* 32.2 min \pm 4.01 por turno; $p \leq 0.05$) y 30.7 % más tiempo de rumia total (51.5 *vs.* 39.4 min \pm 4.58 por periodo; $p \leq 0.05$), y 22.5 % menos tiempo en descanso de pie (29.3 *vs.* 37.8 min \pm 3.25 por periodo; $p \leq 0.05$). En esta época, las vacas S rumiaron más tiempo que las vacas NS durante las horas de mayor ITH y radiación solar, además dedicaron mayor tiempo a esa actividad mientras estaban de pie. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Vizzotto *et al.* (2015), en que las vacas preferían rumiar de pie mientras se encontraban bajo la sombra. La explicación para estas conductas reside en el hecho de que, tal como reportan Nordlund *et al.* (2019), la posición de pie representa una ventaja en términos de disipación del calor corporal. El tiempo total de rumia menor en las vacas NS coincide con lo reportado por Moretti *et al.* (2017), sin embargo, es sorprendente

Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados para variables de conducta de pastoreo (min) en vacas con o sin acceso a sombra durante diferentes turnos del día en octubre.

Efecto	Pastoreo	Rumia de pie	Rumia echada	Rumia total	Descanso de pie	Descanso echada	Descanso total
Tratamiento							
NS	56.4	32.2 b	7.2	39.4 b	37.8 a	7.9	45.8
S	57.5	46.4	5.1	51.5 a	29.3 b	6.8	36.07
EE	3.06	4.01	1.84	4.58	3.25	1.96	3.69
Turno							
T2	68.7 a	40.9 a	9.9 a	50.9 a	38.9 a	13.9 a	52.8 a
T3	39.2 b	51.1 a	1.4	52.5 a	45.7 a	2.6 b	48.3 a
T4	62.9 a	25.8 b	7.1 ab	32.8 b	16.0 b	5.6 b	21.6 b
EE	3.75	4.91	2.26	5.62	3.98	2.4	4.53
Tratamiento x Turno							
T2NS	66.5	37.7	9.6	47.3	44.1	12.4	56.5
T2S	70.9	44.2	10.2	54.4	33.8	15.3	49.1
T3NS	36.2	42.8	1.8	44.6	53.2	2.5	55.7
T3S	42.2	59.3	1.1	60.4	38.2	2.7	40.9
T4NS	66.4	16.1	10.1	26.2	16.3	8.8	25.1
T4S	59.3	35.5	4.0	39.6	15.8	2.4	18.2
EE	5.55	6.75	3.18	7.51	5.39	3.41	5.86

NS: vacas sin sombra; S: vacas con sombra; T2: (10:00–13:00); T3: (13:00–16:00); T4: (16:00–19:00). Medias con literal diferente dentro de columna son diferentes ($p \leq 0.05$); EE: Error estándar.

porque la falta de diferencia en tiempo de pastoreo permite suponer que no debió existir diferencia en consumo de forraje.

En octubre, las vacas NS presentaron un mayor tiempo de descanso de pie, lo que se debió a los cambios en ITH. De acuerdo con Wang *et al.* (2018), al permanecer de pie, las vacas aumentan la superficie corporal expuesta al viento y, por tanto, aumentan la cantidad de pérdida de calor por convección. En este estudio se observaron diferencias en el tiempo de descanso de pie, durante los turnos del día con mayor ITH y radiación solar en octubre. Este resultado concuerda con Herbut y Angrecka (2018), quienes encontraron que el tiempo de las vacas en posición echada disminuyó 21 %, al pasar de ITH de 68 durante 3 h a ITH mayor que 68 durante más de 12 h.

En octubre el acceso a sombra no modificó el tiempo en que las vacas se dedicaron a pastorear, situación también reportada por Schütz *et al.* (2014). En el presente estudio, durante el lapso de 24 h en ambas épocas, no hubo diferencias en el tiempo dedicado a rumiar, descansar, y permanecer postradas entre las vacas S y NS (Figura 2). El hecho de que el tiempo en que las vacas se dedicaron a pastorear, rumiar, descansar, o echarse en el total de 24 h no fuese diferente entre los grupos, es un indicador de que el nivel de estrés no fue lo suficientemente severo como para mantener cambios en la conducta a través de los días. La severidad del estrés por calor depende de las condiciones diurnas y nocturnas. Si la temperatura ambiente es menor a 21 °C durante al menos 3 h durante la noche, la vaca puede disipar el calor ganado durante el día (Igono *et al.*, 1992). En este estudio, en ambas etapas experimentales, la temperatura nocturna fue menor que 21 °C durante más de 3 h, en tanto que la temperatura mínima fue 10.7 y 8 °C en mayo y octubre, respectivamente. Es por ello que las vacas deben haber podido disipar durante la noche, parte del calor ganado durante el día.

Cambios en la conducta inducidos por el estrés térmico pueden impactar de forma negativa el estado emocional en vacas lecheras (Polsky y von Keyserlingk, 2017). En este estudio, la sombra fue efectiva para atenuar los efectos en las vacas lecheras de las condiciones climáticas durante el día, aunque sus cambios de conducta no necesariamente indicaron una situación de estrés térmico ya que pueden ser resultado de mecanismos compensatorios, tal como indican Alves *et al.* (2017).

CONCLUSIONES

Los niveles de radiación solar fueron necesarios junto con el ITH para explicar los cambios en conducta de las vacas Holstein Neozelandés. Entre las 10:00 y las 19:00 en la época cálida (mayo) el Índice de Temperatura y Humedad (ITH) y la radiación solar en las condiciones templadas de este estudio afectaron el tiempo dedicado por estas vacas a pastoreo, rumia y descanso; en la época fresca (octubre) la situación fue similar con la salvedad de que el ITH y la radiación solar no afectaron el tiempo de rumia. El tiempo que las vacas permanecieron bajo la sombra aumentó con incrementos en ITH y radiación solar en esas horas.

Esos cambios no necesariamente indicaron una situación de estrés térmico ya que pueden ser resultado de un mecanismo compensatorio. La sombra demostró ser beneficiosa

para facilitar el empleo de esos mecanismos compensatorios por las vacas durante el día; además, en este estudio se evidenció la preferencia de las vacas lecheras Holstein Neozelandés por un refugio nocturno.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante los estudios de doctorado del primer autor.

REFERENCIAS

- Alves JRA, Andrade TAA, Assis DM, Gurgão TA, Melo LRB, Souza BB. 2017. Productive and reproductive performance, behavior and physiology of cattle under heat stress conditions. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology* 5 (3): 91–96. <https://doi.org/10.31893/2318-1265jabb.v5n3p91-96>
- Améndola-Massiotti RD, Jiménez-Rosales JD, Burgueño-Ferreira JA, Ramírez-Valverde R, Vázquez-Hernández I, Valerio-Hernández JE, Huerta-Bravo M. 2018. Composition of herbage consumed in mixed sequential grazing of cows with ewes as followers. *Journal of Applied Animal Research* 46 (1): 1418–1423. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1520112>
- Améndola L, Solorio FJ, Ku-Vera JC, Améndola-Massiotti RD, Zarza H, Mancera KF, Galindo F. 2019. A pilot study on the foraging behaviour of heifers in intensive silvopastoral and monoculture systems in the tropics. *Animal* 13 (3): 606–616. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001532>
- Armstrong DV. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science* 77 (7): 2044–2050. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77149-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77149-6)
- Bateson M, Martin P. 2021. *Measuring behaviour: an introductory guide* (Third Edition). Cambridge University Press: Cambridge, UK. <https://doi.org/10.1017/9781108776462>
- Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Imtiwati P, Kumar R. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World* 9 (3): 260–268. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268>
- García ME. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen* (Quinta Edición). Instituto de Geografía de la UNAM: Ciudad de México, México. 90 p.
- Herbut P, Angrecka S. 2018. Relationship between THI level and dairy cows' behaviour during summer period. *Italian Journal of Animal Science* 17 (1): 226–233. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1333892>
- Higgins SF, Agouridis CT, Wightman SJ. 2011. *Shade options for grazing cattle*. University of Kentucky, College of Agriculture: Lexington, KY, USA. 8 p.
- Igono MO, Bjotvedt G., Sanford-Crane HT. 1992. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. *International Journal of Biometeorology* 36 (2): 77–87. <https://doi.org/10.1007/BF01208917>
- Kendall PE, Nielsen PP, Webster JR, Verkerk GA, Littlejohn RP, Matthews LR. 2006. The effects of providing shade to lactating dairy cows in a temperate climate. *Livestock Science* 103 (2): 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.02.004>
- Moretti R, Biffani S, Chessa S, Bozzi R. 2017. Heat stress effects on Holstein dairy cows' rumination. *Animal* 11 (12): 2320–2325. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001173>
- Nordlund KV, Strassburg P, Bennett TB, Oetzel GR, Cook NB. 2019. Thermodynamics of standing and lying behavior in lactating dairy cows in freestall and parlor holding pens during conditions of heat stress. *Journal of Dairy Science* 102 (7): 6495–6507. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15891>
- Palacio S, Bergeron R, Lachance S, Vasseur E. 2015. The effects of providing portable shade at pasture on dairy cow behavior and physiology. *Journal of Dairy Science* 98 (9): 6085–6093. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8932>
- Penning PD, Rutter SM. 2004. Ingestive behaviour. *In: Penning PD. (ed.). Herbage intake handbook* (2nd edition). The British Grassland Society: Dunston, UK, pp: 151–175.

- Polsky L, von Keyserlingk MAG. 2017. Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* 100 (11): 8645–8657. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12651>
- Pullin AN, Pairis-Garcia MD, Campler MR, Proudfoot KL. 2017. Validation of scan sampling techniques for behavioural observations of pastured lambs. *Animal Welfare* 26 (2): 185–190. <https://doi.org/10.7120/09627286.26.2.185>
- Rees A, Fischer-Tenhagen C, Heuwieser W. 2016. Effect of heat stress on concentrations of faecal cortisol metabolites in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 51 (3): 392–399. <https://doi.org/10.1111/rda.12691>
- SAS Institute, Inc. 2017. *SAS/STAT® 14.3 User's Guide: High-Performance Procedures*. SAS Institute, Inc.: Cary, NC, USA, 800 p.
- Schütz KE, Cox NR, Tucker CB. 2014. A field study of the behavioral and physiological effects of varying amounts of shade for lactating cows at pasture. *Journal of Dairy Science* 97 (6): 3599–3605. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7649>
- Schütz KE, Lee C, DeVries TJ. 2018. Cattle priorities: Feed and water selection, ability to move freely and to access pasture. *Advances in Cattle Welfare 2018*: 93–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100938-3.00005-X>
- Sheahan AJ, Gibbs SJ, Roche JR. 2013. Diurnal patterns of grazing behavior and humoral factors in supplemented dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96 (5): 3201–3210. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6201>
- Tucker BC, Rogers AR, Schütz KE. 2008. Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour, use of shade and body temperature in a pasture-based system. *Applied Animal Behaviour Science* 109 (2): 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.015>
- Van laer E, Moons CPH, Sonck B, Tuytens FAM. 2014. Importance of outdoor shelter for cattle in temperate climates. *Livestock Science* 159: 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.003>
- Van laer E, Tuytens FAM, Ampe B, Sonck B, Moons CPH, Vandaele L. 2015. Effect of summer conditions and shade on the production and metabolism of Holstein dairy cows on pasture in temperate climate. *Animal* 9 (9): 1547–1558. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000816>
- Veissier I, Van laer E, Palme R, Moons CPH, Ampe B, Sonck B, Andanson S, Tuytens FAM. 2018. Heat stress in cows at pasture and benefit of shade in a temperate climate region. *International Journal of Biometeorology* 62 (4): 585–595. <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1468-0>
- Vizzotto EF, Fischer V, Thaler Neto A, Abreu AS, Stumpf MT, Werncke D, Schmidt FA, McManus CM. 2015. Access to shade changes behavioral and physiological attributes of dairy cows during the hot season in the subtropics. *Animal* 9 (9): 1559–1566. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000877>
- Wang X, Zhang G, Choi CY. 2018. Effect of airflow speed and direction on convective heat transfer of standing and reclining cows. *Biosystems Engineering* 167: 87–89. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.12.011>

ORGANIC WASTE BIOCONVERSION AND WEIGHT GAIN DYNAMICS OF THE BLACK SOLDIER FLY *Hermetia illucens*

Víctor Adrián **Ramírez-Méndez**, Remigio Anastacio **Guzmán-Plazola***,
Alejandro **Pérez-Panduro**, Julio **Sánchez-Escudero**

Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56264.

* Author for correspondence: rguzmanp@colpos.mx

ABSTRACT

The anaerobic decomposition of urban organic wastes produces significant amounts of environmentally harmful biogases and leachates. In the context of a circular economy, the valuation of these wastes is an alternative for producing environmental and economic benefits. *Hermetia illucens* larvae digest a wide range of organic materials, converting them into high-value protein, oils and organic fertilizer. The bioconversion and weight gain dynamics of larvae fed with household waste (HW), restaurant waste (RW), pig manure (PM) and bovine manure (BM) were measured. By fitting the data to the logistical model, rates of larval weight gain and waste decomposition were calculated. The highest weight gain was obtained with RW ($0.315 \pm 0.090 \text{ g (g} \cdot \text{d}^{-1})$), followed by BM ($0.214 \pm 0.054 \text{ g (g} \cdot \text{d}^{-1})$), PM ($0.213 \pm 0.064 \text{ g (g} \cdot \text{d}^{-1})$), and HW ($0.199 \pm 0.064 \text{ g (g} \cdot \text{d}^{-1})$). The larvae decomposed PM, RW, and HW with the same efficiency ($0.72 - 0.85 \text{ g d}^{-1}$) and faster than BM (0.53 g d^{-1}). The data adjustment to the logistical model helped analyze the weight gain dynamics of the larvae, as well as the bioconversion of wastes into biomass and the waste decomposition. This information provides criteria for optimizing organic waste management.

Keywords: Greenhouse gases, ecotechnologies, bioaccumulation, growth rate, decomposition rate.

INTRODUCTION

Agrifood systems make up all the processes involved in the production of food and its use. These processes require inputs and result in the production of food, raw materials, services, economic income, as well as a variety of social and environmental effects (Berkum *et al.*, 2018). Organic waste generated by the processing of crops, manure, and food is a problem with a significant environmental impact. One-third of all food produced for human consumption is estimated to be wasted every year (FAO, 2013). According to UNEP statistics (2016), agrifood systems contribute to the degradation and depletion of natural resources in the world due to inefficient and unsustainable practices. It is estimated that 30 % of the greenhouse gas (GG) emissions worldwide (Berkum *et al.*, 2018) come from such agrifood systems.

Citation: Ramírez-Méndez VA, Guzmán-Plazola RA, Pérez-Panduro A, Sánchez-Escudero J. 2022. Organic waste bioconversion and weight gain dynamics of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Agrociencia*. 56(8): 1459-1483. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2635>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: April 05, 2022.
Approved: September 22, 2022.
Published in Agrociencia:
January 11, 2023.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



Cities are the main waste-producing centers, due to the concentration of people and their economic activity. In 2012, the global production of municipal solid waste was approximately 1.3 billion Mg per day, with this figure expected to rise to 2.2 billion by 2025 (Bernache-Pérez, 2012; Hoornweg and Bhada-Tata, 2012). The organic fraction of total waste produced is higher in developed nations than in developing countries. This waste is degraded by anaerobic decomposition in open-air landfills, which release methane, CO₂, and leachates into the environment (Acurio *et al.*, 1997; IPCC, 2015).

Diminished agrifood waste could substantially reduce the emissions of greenhouse gases and contribute to the UN's Sustainable Development Goals (IPCC, 2014; UN, 2016). However, changes in consumption patterns and diets would be required, which could be difficult to generalize. The circular economy model, originated in China in 1998 (Yuan *et al.*, 2006), proposes the use of ecotechnologies for the treatment and transformation of agrifood waste.

Proposal designs under this model require technical data on the rates of material and energy between the stages and actors in the recycling processes (Fischer-Kowalski and Haberl, 2015). Likewise, production cycles are optimized when using waste to produce goods and services that benefit of other economic areas. In this context, organic and food waste treatment using black soldier flies (BSF) *Hermetia illucens* to produce compost, oils, protein-rich pastes for animal feed, among other products, promises economic and environmental benefits (FAO, 2013; Salomone *et al.*, 2017). The BSF is studied around the world for its ability to process a wide range of organic waste and its high rate of bioconversion into usable biomass (Sheppard, 1983; Tomberlin and Sheppard, 2002; Diener *et al.*, 2009; Holmes *et al.*, 2016). Due to the composition of its intestinal microbiota, larvae digest a large variety of food substrates, including the remains of decomposing plants, manure, flours, municipal organic waste, carcasses, fecal sludge, and others (Üstüner *et al.*, 2003; Banks, 2014). When the larvae reach a pre-pupal stage, they have accumulated protein (36–48 %), fat (31–33 %) and calcium (7.5 %) in highly nutritional forms for animals, making them a desirable alternative for livestock and fishing food production (Arango *et al.*, 2004; Diener *et al.*, 2011).

The quantification of the bioconversion of substrates by BSF larvae is essential to estimate its potential to transform organic residues. The present work reports on the bioconversion dynamics of various organic wastes and weight gain by *H. illucens* until it reaches the pupal stage, under the hypothesis that all substrates are susceptible to decomposition by the larvae and that their bioconversion rates may vary from one substrate to another. *H. illucens* larvae demonstrated the ability to decompose the four substrates evaluated, with variations in decomposition efficiency and bioaccumulation.

MATERIALS AND METHODS

BSF larvae and wastes evaluated

The larvae used were two to three weeks old (fourth and fifth instar) and weighted less than 0.09 g when collected from an insect farm located in Morelos, Mexico. Five

groups of larvae were formed, and each one was assigned a treatment at random: 1) household waste (remains of fruits, vegetables, egg shells and tortilla, all with seven days of decomposition); 2) restaurant waste (fruits, vegetables, legumes, rice, bread, tortilla, cooked egg and meat, all with two days of decomposition); 3) pig manure from a gestating and lactating swine stable; 4) bovine manure obtained from the Colegio de Postgraduados stables; and 5) control. Household and restaurant wastes were ground up and wrung by hand with a piece of cloth, then mixed until its consistency was homogenous. The wastes were refrigerated inside appropriately labelled bags to facilitate their handling and dosifying during the bioassay. The experiment was carried out in 2019.

Experimental procedure

For each treatment, ten BSF larvae were individually confined in Petri dishes and kept in an incubator at 28 ± 0.5 °C and an RH of 67 ± 3.8 %. In addition, the same food was served a group of ten larva-free Petri dishes under the same conditions. Every 48 hours a new serving of food was given (2.5 to 3.0 g) to the larvae in each treatment and the control group. The leftover food was weighed along with the excretions in each dish (final weight) and the larva itself at each change of serving, using an analytical scale (Scientech ZSA 120 with a precision of 1.0 ten-thousandth of a gram). The weights were measured 12 times over the course of 24 days. The apparent consumption was assumed to be the difference in weight between the beginning and end of each period (*initial weight – final weight*), considering the loss of humidity of the substrate due to evaporation. Therefore, the effective consumption in each period was calculated using the data for lost humidity from the control group.

Estimation of rates and statistical analysis

Using the effective consumption data (decomposition) and the weight gained by the larvae, the accumulation curves were obtained for each treatment. The decomposition was calculated using the weight difference in the Petri dish (*initial residue weight*) - (*remaining weight + larval excretions*). The value was calculated for parameter *r*, which represents the rate of weight gain in the larva (Table 1) and residual decomposition.

Table 1. Growth models adjusted to waste decomposition and weight gain by the *Hermetia illucens* larvae.

Model	Formula
Exponential	$y = y_0 * e^{(r * t)}$
Logistic	$y = K / (1 + ((k - y_0) / y_0) * e^{-r * t})$
Gompertz	$y = e^{-(-\log(y_0)) * e^{-r * t}}$
Monomolecular	$y = 1 - (K - y_0) * e^{-r * t}$

r: growth rate; *y*₀: initial weight; *t*: days; *k*: maximum capacity of weight gain and decomposition.

The weight loss data for the pre-pupae were adjusted to the equation $y = t / (A + (B * t))$, where A indicates the intensity of reduction in fresh weight and B the speed of weight stabilization of the larva before it pupates. Using the MODEL procedure in the SAS v. 9.3 statistical program (The SAS Institute, Cary, North Carolina), the adjustment was made to determine the parameter values (r , y_0 , A and B). Likewise, its descriptive statistics (means and variances) were calculated, along with the normality and variance homogeneity tests, the ANOVAs or Wilcoxon and Kruskal-Wallis tests (as appropriate), as well as Tukey's multiple comparisons, with $\alpha = 0.05$ in all cases.

RESULTS AND DISCUSSION

The larvae fed with restaurant waste (RW) reached a maximum average weight of 333.2 ± 73.8 mg; household waste (HW) had a weight of 293.2 ± 61.5 mg; bovine manure (BM), 270.7 ± 43.2 mg; and for pig manure (PM), 246.8 ± 51.6 mg. The only statistically significant differences were between RW and PM (Tukey, $p = 0.05$). The *H. illucens* larvae reached a fresh weight higher than those reported in other studies, where they were fed with different substrates and reached a weight of 69 to 263 mg per larva (Diener *et al.*, 2009; Ferdousi *et al.*, 2020; Jucker *et al.*, 2017; Oonincx *et al.*, 2015a; Oonincx *et al.*, 2015b; Nguyen *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015).

Weight gain dynamic in individual larvae

Out of the four mathematical models evaluated, the logistic growth model had the best adjustment. Its determination coefficient (R^2) was the highest and had high significance in its parameter hypothesis tests (y_0 and r) (Data not shown). Taking the highest values observed as a basis, the adjustment of the model was compared using values of $K = 0.4$ and $K = 0.5$, obtaining a better adjustment with $k = 0.4$, where K represents the limit or highest possible weight (g) after which the larva stops gaining weight reaching the pre-pupa stage. The ANOVA performed on the r values indicated significant differences between treatments. The highest value of this parameter was obtained with the RW treatment, followed by BM, PM, and finally, HW (Table 2).

Table 2. Parameters of the Logistic model[†] estimated for the dynamics of fresh weight gain for *Hermetia illucens* larvae with different food sources. Initial weight of larvae < 0.090 g.

Food source	Parameter	Estimated parameter average [‡]	Parameter	Estimated parameter average [§]	Range of values of R^2
HW	r	0.199 ± 0.064 b	y_0	0.088 ± 0.026	0.681 – 0.992
RW	r	0.315 ± 0.090 a	y_0	0.080 ± 0.030	0.882 – 0.988
PM	r	0.213 ± 0.064 b	y_0	0.081 ± 0.020	0.901 – 0.987
BM	r	0.214 ± 0.054 b	y_0	0.076 ± 0.013	0.899 – 0.979

[†]Estimated for a value $k = 0.4$ g. HW: household waste; R: restaurant waste; PM: pig manure; BM: bovine manure. [‡]All the averages of the estimators are adjusted to a normal distribution, according to the Shapiro-Wilk test. r is given in grams of fresh weight ($\text{g} \cdot \text{day}^{-1}$). [§]Means with the same letter are statistically equal (Tukey $P \alpha = 0.05$; $F = 5.37$, $\text{Prob} > F = 0.0041$).

The K value, derived from the logistic growth model, helps define that BSF larvae can gain up to 0.4 g in weight. More than identifying a minimum weight required to initiate the pupa formation and metamorphosis processes suggested by Nijhout and Williams (1974), the K value helps identify when the larvae have reached their maximum gain of biomass, which is critical for its economic use as a food and/or energy resource.

The general fresh weight gain dynamics in *H. illucens* larvae in each treatment helps define the point at which the larvae reach their maximum daily weight gain capacity (Figure 1A), which occurs in $K/2$ (0.2 g). From that point forward, the daily gain in biomass in the larva gradually decreases until it reaches zero in the pre-pupa stage. The larvae fed with RW reached a maximum weight gain capacity of 0.061 g d^{-1} two

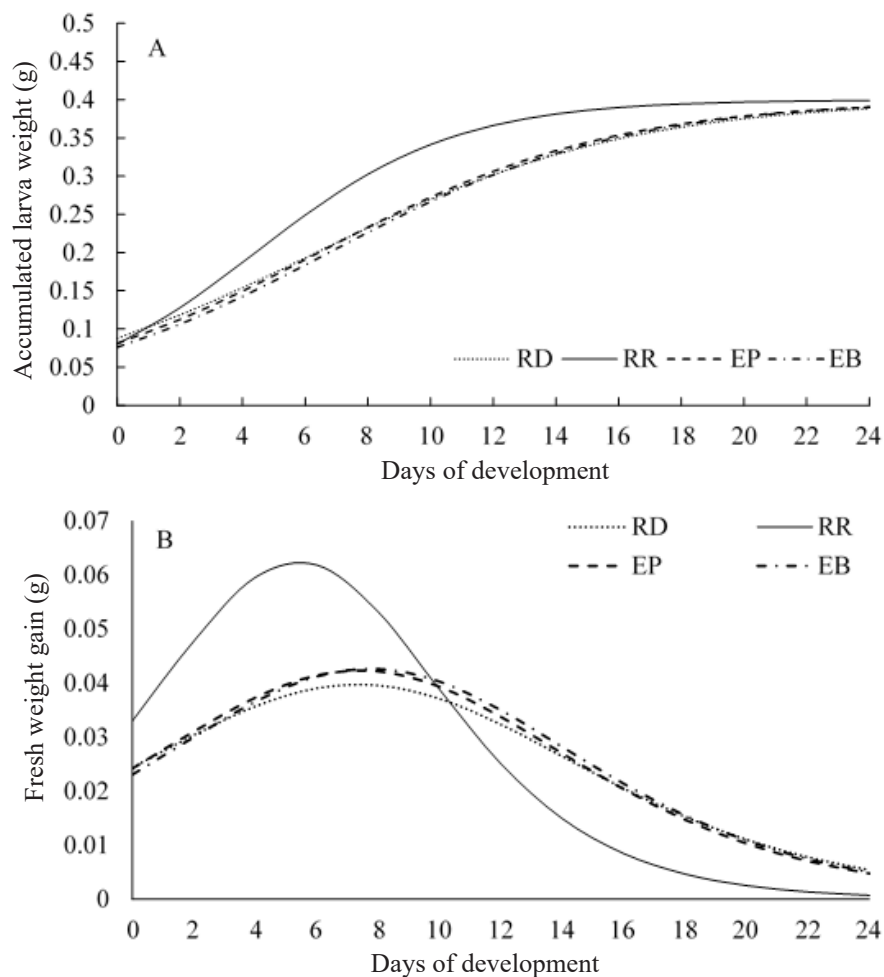


Figure 1. Estimation of the general dynamics of biomass accumulation (A) and daily weight gain (B) in the *Hermetia illucens* larvae, according to the logistic model $y = k / (1 + ((k - y_0) / y_0) * e^{-r * t})$, in four treatments. HW: household waste; R: restaurant waste; PM: pig manure; BM: bovine manure. Initial larval weight $< 0.090 \text{ g}$. For the parameter values, see Table 2.

days before the larvae fed with other residues (HW, PM and BM), which reached a maximum weight gain capacity around 0.040 g d^{-1} . In addition, the larvae fed with RW reached their maximum gain five days before the larvae fed with other treatments (HW, PM and BM) (Figure 1B), indicating that they reach their maximum weight several days before they do with the other wastes.

There is a clear difference between the dynamics of weight gain in larvae fed with RW in comparison to the other three treatments (Figure 1), which could be attributed to this type of organic residue having a greater diversity of components and, presumably, a higher protein and lipid content than fruit and vegetable waste (Gold *et al.*, 2018). Even if restaurant waste contains no animal residues, they provide a greater amount of raw protein and specific amino acids than the fruit and vegetable waste, according to Spranghers *et al.* (2016). Under optimal environmental conditions and with sufficient RW availability, larvae raised with such wastes would be expected to reach a fresh weight of 0.4 g.

Using the values determined when adjusting the data to the logistic model, the weight gain capacity of the larvae before its establishment in the experiment was projected (Figure 2A). Under the same considerations, the general fresh weight gain dynamics of larvae during their entire development, feeding on the same wastes and in the same environmental conditions, were displayed in a graph (Figure 2B). The values of day 18 correspond with the values of day 0 in the previous graphs (Figure 1), confirming that the larvae were between 15 and 20 days old.

According to the logistic model, *H. illucens* larvae's daily weight gain capacity is not static, but rather dynamic and varies with time. That is, depending on the larva's actual size and weight or, in other words, on its physiological ability to gain weight depending as it ages. According to the projection based on the logistic model's parameters, under optimal environmental conditions, the larvae would develop completely in approximately 42 days, when it reaches the pre-pupa and pupal stages (Nguyen *et al.*, 2013). In addition, the larvae would reach a usable optimum weight approximately one month after eclosion (RW: 32 d; HW, PM and BM: 37 d).

Weight decline and stabilization in individual larvae

According to the observations, when the larvae reach the sixth instar (pre-pupa), their development stops to allow pupa formation. In this period, the fresh weight of the larvae undergoes a sharp decline, followed by a stabilization that lasts until the pupa is formed. Although the model used to describe this dynamic displays a high R^2 value (Table 2), none of its parameters could be accurately estimated, nor did its estimator display a normal distribution according to the Shapiro-Wilk test (Figure 3).

In the RW treatment, a higher value was obtained for A and a slightly lower one for B in comparison to the other treatments, indicating that the weight loss in larvae was lower in this treatment and the speed of stabilization did not differ significantly (Table 2). The general dynamics of larval weight decline and stabilization for each treatment are also noticeable, with day two corresponding to the start of the decline (Figure 3).

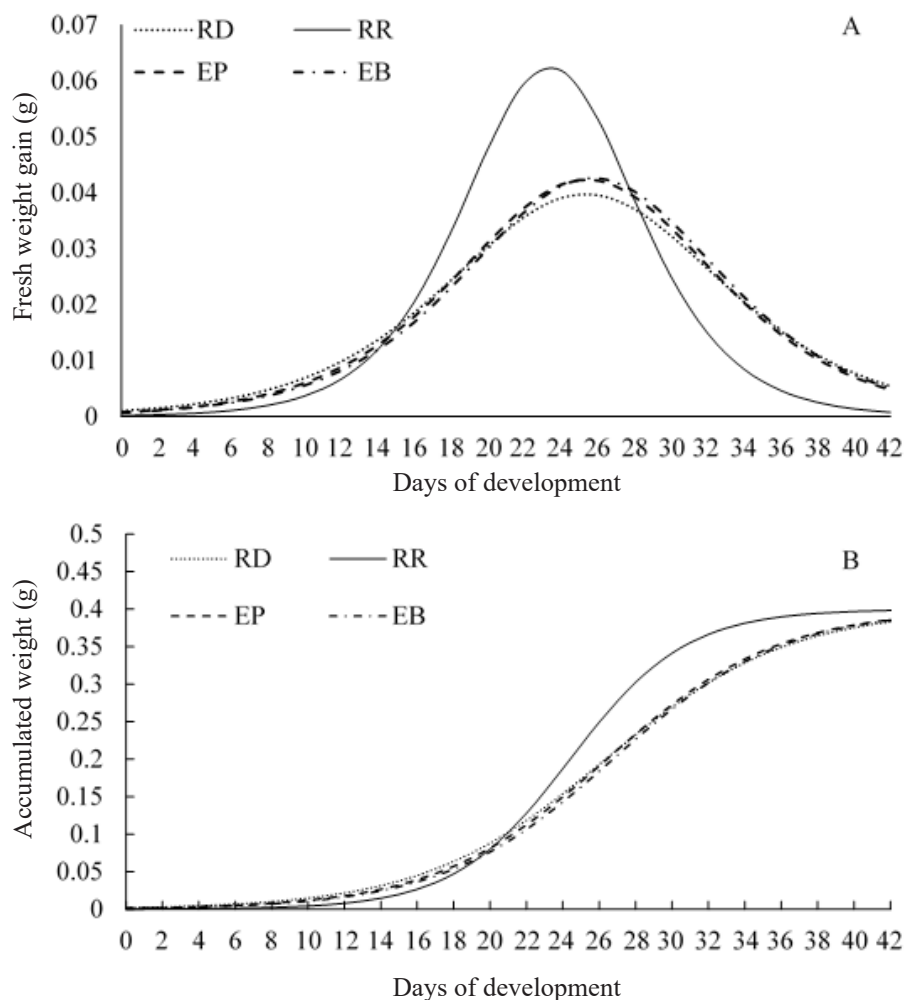


Figure 2. Projection of the daily weight gain dynamics (A) and accumulation of total weight (B) during the whole larval stage of *H. illucens*, using the parameters estimated by the logistic model $y = k / (1 + ((k - y_0) / y_0) * e^{-r * t})$. HW: household weight; RW: restaurant waste; PM: pig manure; BM: bovine manure.

The weight decline and stabilization model show the efficiency that exists in the use of food during larval development when the nourishment comes from a fresher, more diverse source, ensuring a greater conservation of fresh weight when going from a larva to pre-pupa. Although the reduction is between 10 and 20 %, it takes place only 2 d after the larva reaches its maximum weight.

Decomposition of organic wastes by individual larvae

The logistic growth model displayed a better adjustment to the consumption data of the different substrates. It had the highest R^2 , as well as the highest significance in the test of its parameters' hypotheses (y_0 and r) (data not shown). This model was

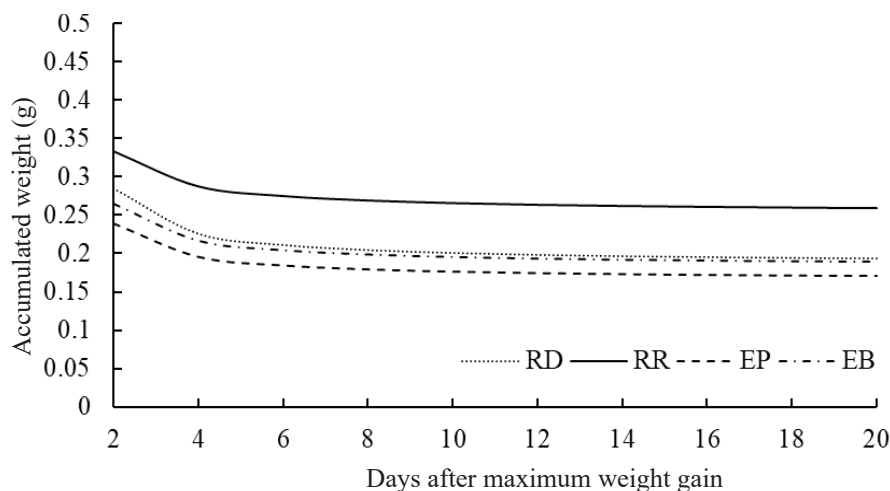


Figure 3. General dynamic of weight decline in *H. illucens* larvae with four treatments using the model $y = t / (A + (B * t))$. HW: household waste; RW: restaurant waste; PM: pig manure; BM: bovine manure.

evaluated with the values of $K = 5$, $K = 5.5$, and $K = 6$, with $K = 5.5$ providing the best adjustment. K represents the highest possible waste decomposition rate per larva in g of fresh weight. Despite the variance between the means of the statistic r being homogenous according to the Bartlett test, the residuals of the analysis did not display any normality (Table 3). Therefore, Wilcoxon rank-sum non-parametric tests were carried out, which gave evidence to show that the parameter EB had a lower sum of scores, and the Kruskal-Wallis test, which gave a highly significant value for $P = 0.0013$ (Table 4).

The substrate decomposition dynamics by the larvae that were given PM, RW and HW were very similar and higher than the capacity of the larvae that were given BM (Figure 4A). According to the logistic model, the greatest capacity of the larvae to decompose

Table 3. Parameters of the logistic model[†] estimated for the dynamic of decomposition (fresh weight) of food from different sources by the *Hermetia illucens* larvae.

Food source	Parameter	Estimated parameter average [‡]	Parameter	Estimated parameter average	Range of values of R ²
HW	r	0.264 ± 0.053 ab	y_0	0.456 ± 0.067	0.853 – 0.981
RW	r	0.299 ± 0.067 a	y_0	0.401 ± 0.097	0.871 – 0.964
PM	r	0.316 ± 0.046 a	y_0	0.434 ± 0.063	0.843 – 0.948
BM	r	0.194 ± 0.062 b	y_0	0.459 ± 0.130	0.732 – 0.959

[†]Estimated for a value of $k = 5.5$ g. HW: Household waste; RW: Restaurant waste; PM: pig manure; BM: bovine manure; r : grams of waste decomposed (g day)⁻¹. [‡]Means with the same letter are statistically equal (Tukey $P \alpha = 0.05$).

Table 4. Comparison test for the medians of the rate r of the logistic model[†], estimated for the dynamic of degradation in fresh weight of wastes from different sources, by the *Hermetia illucens* larvae.

Food source	Parameter	Estimated parameter median [‡]	Coefficient of variation	Final Wilcoxon score [§]
HW	r	0.257	20.15	158
RW	r	0.278	22.49	203
PM	r	0.287	14.63	236
BM	r	0.175	32.03	69

[†]Estimated for a value of $k = 5.5$ g. HW: Household waste; RW: Restaurant waste; PM: pig manure; BM: bovine manure; [‡] r : grams of waste decomposed (g day)⁻¹. [§]Highly significant difference between treatments, according to the Kruskal-Wallis Pr test = 0.0013.

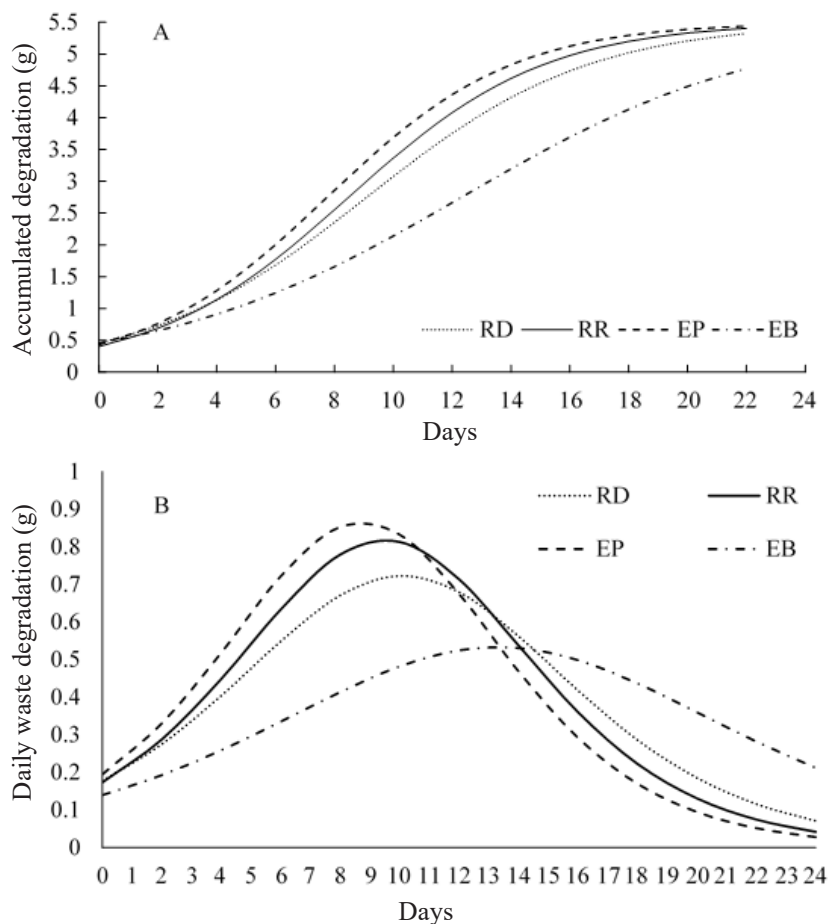


Figure 4. Dynamic of total decomposition (A) and daily decomposition (B) of waste by *H. illucens* larvae. The data were adjusted to a logistic model $y = k / (1 + ((k - y_0) / y_0) * e^{-r * t})$. HW: household waste; RR: restaurant waste; PM: pig manure; BM: bovine manure.

the wastes takes place when the value of $K/2$ is reached on day 8 of our observations, which corresponds to an accumulated consumption of 2.75 g. Degradation continues at a decreasing rate until it reaches values near 0, when the larva has completed its development and the pre-pupa stage begins. In the PM treatment, the larvae achieve their highest decomposition rate (0.85 g d^{-1}), one day before those in HW (0.83 g d^{-1}) and RW (0.72 g d^{-1}) treatments. Under the BM treatment, they achieve their highest decomposition rate (0.53 g d^{-1}) 5 and 4 days after the other treatments (Figure 4B). The low decomposition rate observed in the BM is attributed to its high cellulose, hemicellulose and lignin contents, as suggested by Rehman *et al.*, (2017) and Triplehorn and Johnson (2005).

CONCLUSIONS

The *H. illucens* larvae were able to decompose the four types of waste evaluated. The adjusted models helped analyze the rates of substrate conversion into biomass. The greatest efficiency in the accumulation of body mass was observed in the waste with the greatest diversity of components, such as those produced in restaurants [$0.315 \pm 0.090 \text{ g (g} \cdot \text{d}^{-1})$]. With this type of waste, larvae reached an optimum usable weight (0.4 g) several days earlier than when feeding with the other waste forms, suggesting a greater bioconversion efficiency. The organic household, restaurant and pig manure wastes were decomposed by the *H. illucens* larvae at similar rates ($0.72\text{--}0.85 \text{ g d}^{-1}$), although the bovine manure was decomposed with less efficiency (0.53 g d^{-1}), suggesting that its treatment with these larvae may not be the best option.

When these larvae reach the pre-pupal stage, their weight decreases, although it is still unclear whether this weight loss only represents the loss of water (as in the case of lepidoptera) or also a loss of body biomass. The information obtained is useful in order to consider the management and handling of this species in industrial bioconversion processes, since it presents an approach to the productive of larvae as a resource.

REFERENCES

- Acurio G, Rossin A, Teixeira PF, Zepeda F. 1997. Diagnóstico de la situación del manejo de residuos sólidos municipales en América Latina y el Caribe. Banco Interamericano de Desarrollo 130 p.
- Arango GP., R. Vergara RA, Mejía H. 2004. Análisis composicional, microbiológico y digestibilidad de la proteína de la harina de larvas de *Hermetia illucens* L (Diptera:Stratiomyidae) en Angelópolis, Antioquia, Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía 57 (2): 2491–2500.
- Banks IJ. 2014. To assess the impact of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae on fecal reduction in pit latrines. School of Hygiene and Tropical Medicine. <https://doi.org/10.17037/PUBS.01917781>
- Bernache-Pérez G. 2012. Riesgo de contaminación por disposición final de residuos. Un estudio de la región centro occidente México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 28 (1): 97–105.
- Diener S, Zurbrugg C, Gutiérrez FR, Nguyen DH, Morel A, Koottatep T, Tockner K. 2011. Black soldier fly larvae for organic waste treatment – prospects and constraints. In: Alamgir M, Bari QH, Rafizul IM, Islam BMT, Sarkar G, Howlader MK. (eds.). 2nd International conference

- on solid waste management in the developing countries. Proceedings of the WasteSafe 2011: Khulna, Bangladesh, pp: 1–8.
- Diener S, Zurbrügg C, Tockner K. 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Management and Research* 27 (6): 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242x09103838>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013. Climate-BMART Agriculture Sourcebook Summary. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. <https://www.fao.org/3/i7994e/i7994e.pdf> (Retrieved: September 2022).
- Ferdousi L, Sultana N, Helal MA, Momtaz N. 2020. Molecular identification and life cycle of black soldier fly (*Hermetia illucens*) in laboratory. *Bangladesh Journal of Zoology* 48 (2): 429–440. <https://doi.org/10.3329/bjz.v48i2.52381>
- Fischer-Kowalski M, Haberl H. 2015. Social metabolism: a metric for biophysical growth and degrowth. In: *Handbook of Ecological Economics*, Martinez-Alier J, Muradian R. (eds.). Edward Elgar Publishing: Cheltenham, UK, pp: 100–138. <https://doi.org/10.4337/9781783471416>
- Gold M, Tomberlin JK, Diener S, Zurbrügg C, Mathys A. 2018. Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review. *Waste Management* 82: 302–318. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.022>
- Holmes LA, VanLaerhoven SL, Tomberlin JK. 2016. Lower temperature threshold of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) development. *Journal of Insects as Food and Feed* 2 (4): 255–262. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0008>
- Hoorweg D, Bhada-Tata P. 2012. What a waste: a global review of solid waste management. Urban development series; knowledge papers no. 15. World Bank. Washington, DC, USA. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/17388> (Retrieved: September 2022).
- Jucker C, Erba D, Leonardi MG, Lupi D, Savoldelli S. 2017. Assessment of vegetable and fruit substrates as potential rearing media for *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Environmental Entomology* 46 (6): 1415–1423. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx154>
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2014. Summary for policymakers. climate change 2014: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press. Cambridge, NY, USA. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324>
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2015. Climate change 2014 Mitigation of climate change summary for policymakers and technical summary mitigation of climate change. Cambridge University Press. Cambridge, NY, USA. <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg3/> (Retrieved: September 2022).
- Nguyen TTX, Tomberlin JK, Vanlaerhoven S. 2013. Influence of resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larval development. *Journal of Medical Entomology* 50 (4): 898–906. <https://doi.org/10.1603/me12260>
- Nguyen TTX, Tomberlin JK, Vanlaerhoven S. 2015. Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environmental Entomology* 44 (2): 406–410. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv002>
- Nijhout HF, Williams CM. 1974. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation. *Journal of Experimental Biology* 61 (2): 493–501.
- Oonincx DGAB, van Broekhoven S, van Huis A, van Loon JJ. 2015a. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *Plos One* 10 (12): e0144601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>
- Oonincx DGAB, van Broekhoven S, van Huis A, van Loon JJ. 2015b. Nutrient utilisation by black soldier flies fed with chicken, pig, or cow manure. *Journal of Insects as Food and Feed* 1 (2): 131–139. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0023>
- Rehman KU, Cai M, Xiao X, Zheng L, Wang H, Soomro AA, Zhou Y, Li W, Yu Z, Zhang J. 2017. Cellulose decomposition and larval biomass production from the co-digestion of dairy manure and chicken manure by mini-livestock (*Hermetia illucens* L.). *Journal of Environmental Management* (196): 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.03.047>

- Salomone R, Saija G, Mondello G, Giannetto A, Fasulo S, Savastano D. 2017. Environmental impact of food waste bioconversion by insects: application of life cycle assessment to process using *Hermetia illucens*. *Journal of Cleaner Production* 140 (2): 890–905. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.154>
- Sheppard DC. 1983. House fly and lesser fly control utilizing the black soldier fly in manure management systems for caged laying hens. *Environmental Entomology* 12 (5): 1439–1442. <http://dx.doi.org/10.1093/ee/12.5.1439>
- Sheppard DC, Tomberlin JK, Joyce JA, Kiser BC, Sumner BM. 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Medical Entomology* 39 (4): 695–698. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.4.695>
- Sprangers T, Ottoboni M, Klootwijk C, Olyn A, Deboosere S, De Meulenaer B, Michiels J, Eeckhout M, De Clercq P, De Bmet S. 2016. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (8): 2594–2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>
- Tomberlin JK, Sheppard DC. 2002. Factors influencing mating and oviposition of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in a colony. *Journal of Entomological Science* 37 (4): 345–352. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-37.4.345>
- Triplehorn CA, Johnson NF. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the study of insects (7th edition); Cengage Learning: Boston, Massachusetts, USA. 888 p.
- UN (United Nations). 2016. Transforming our world: the 2030 agenda for sustainable development. New York, NY, USA. <https://doi.org/10.1201/b20466-7>
- UNEP (United Nations Environment Programme). 2016. Food systems and natural resources. A report of the working group on food systems of the international resource panel. <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/7592> (Retrieved: September 2022).
- Üstüner T, Hasbenli A, Rozkošný R. 2003. The first record of *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Stratiomyidae) from the Near East. *Studia Dipterologica* 10: 181–185.
- van Berkum S, Dengerink J, Ruben R. 2018. The food systems approach: sustainable solutions for a sufficient supply of healthy food. *Wageningen Economic Research* 2018: 29. <https://doi.org/10.18174/451505>
- Yuan Z, Bi J, Moriguchi Y. 2006. The Circular Economy: A new development strategy in China. *Journal of Industrial Ecology* 10 (1–2): 4–8. <https://doi.org/10.1162/108819806775545321>

DINÁMICA DE BIOCONVERSIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS Y GANANCIA DE PESO POR LA MOSCA SOLDADO NEGRA *Hermetia illucens*

Víctor Adrián **Ramírez-Méndez**, Remigio Anastasio **Guzmán-Plazola***,
Alejandro **Pérez-Panduro**, Julio **Sánchez-Escudero**

Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56264.

* Autor para correspondencia: rguzmanp@colpos.mx

RESUMEN

La degradación anaeróbica de los residuos orgánicos urbanos produce cantidades considerables de biogás y lixiviados que contaminan el ambiente. En un contexto de economía circular, la valorización de estos residuos es una alternativa para la generación de beneficios ambientales y económicos. Las larvas de *Hermetia illucens* digieren un amplio rango de materiales orgánicos, convirtiéndolos en proteína de alto valor, aceites y fertilizante orgánico. Se evaluaron las dinámicas de bioconversión y de acumulación de peso en larvas alimentadas con residuos domiciliarios (RD), residuos de restaurante (RR), estiércol porcino (EP) y bovino (EB). Se estimaron tasas de acumulación de peso en larva y de degradación de los residuos, mediante el ajuste de los datos al modelo logístico. La mayor tasa de acumulación de peso se obtuvo con RR ($0.315 \pm 0.090 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$), seguida por EB ($0.214 \pm 0.054 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$), EP ($0.213 \pm 0.064 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$) y RD ($0.199 \pm 0.064 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$). Las larvas degradaron EP, RR y RD con igual eficiencia ($0.72\text{--}0.85 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$) y en menor tiempo que EB ($0.53 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$). El ajuste de los datos al modelo logístico permitió analizar la dinámica de la ganancia de peso de las larvas, de la bioconversión de los residuos en biomasa y la degradación de los residuos. Esta información provee criterios para optimizar el manejo de residuos orgánicos.

Palabras clave: Gases de efecto invernadero, ecotecnologías, bioacumulación, tasa de crecimiento, tasa de degradación.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas agroalimentarios comprenden todos los procesos asociados con la producción de alimento y su utilización. Dichos procesos requieren insumos y generan alimentos, materias primas, servicios, ingresos económicos, así como una diversidad de impactos sociales y ambientales (van Berkum *et al.*, 2018). La generación de desechos orgánicos a partir del procesamiento de cultivos, estiércol y residuos de alimentos preparados representa un problema con un impacto ambiental significativo. Se estima que aproximadamente un tercio del alimento producido mundialmente para consumo humano se desperdicia anualmente (FAO, 2013). Estadísticas de la UNEP

Citation: Ramírez-Méndez VA, Guzmán-Plazola RA, Pérez-Panduro A, Sánchez-Escudero J. 2022. Dinámica de bioconversión de residuos orgánicos y ganancia de peso por la mosca soldado negra *Hermetia illucens*. *Agrociencia*. 56(8): 1459-1483. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2635>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: April 05, 2022.
Approved: September 22, 2022.
Published in Agrociencia:
January 11, 2023.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



(2016) han evidenciado que la contribución de los sistemas agroalimentarios a la degradación y el agotamiento de los recursos naturales del mundo es debido a prácticas ineficientes e insustentables. Se ha estimado que el 30 % de las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI) a nivel global (van Berkum *et al.*, 2018) proviene de dichos sistemas agroalimentarios.

Las ciudades son los principales centros de producción de residuos debido a la concentración de la población y su actividad económica. En 2012, la producción mundial de residuos sólidos municipales fue alrededor de 1300 millones Mg diarias y podría incrementarse hasta los 2200 millones en el año 2025 (Bernache-Pérez, 2012; Hoor-nweg y Bhada-Tata, 2012). Del total de residuos generados, la fracción orgánica es mayor en los países desarrollados que en los subdesarrollados. Estos residuos son degradados por descomposición anaeróbica en tiraderos a cielo abierto, lo cual libera metano, CO₂ y lixiviados que contaminan el ambiente (Acurio *et al.*, 1997; IPCC, 2015). La reducción de los residuos agroalimentarios podría disminuir sustancialmente las emisiones de gases de efecto invernadero y contribuir al cumplimiento de las Metas del Desarrollo Sostenible de la ONU (IPCC, 2014; UN, 2016). Sin embargo, se requerirían cambios en los patrones de consumo y en la dieta difíciles de generalizar. El modelo de la economía circular, cuyas ideas iniciales surgieron en China en 1998 (Yuan *et al.*, 2006), propone la aplicación de ecotecnologías para el tratamiento y transformación de los residuos agroalimentarios.

El diseño de propuestas bajo este modelo requiere de datos técnicos sobre las tasas de flujo de materiales y energía entre las etapas y actores de los procesos de reciclado (Fischer-Kowalski y Haberl, 2015). De igual forma, se optimizan ciclos de producción al aprovechar desechos para producir bienes y servicios en beneficio de otras áreas económicas. En este contexto, el tratamiento de residuos orgánicos y desechos alimentarios agrícolas utilizando larvas de mosca soldado negra (MSN), *Hermetia illucens*, para producir compost, aceite, pastas ricas en proteína para alimentación animal, entre otros productos, promete beneficios económicos y ambientales (FAO, 2013; Salomone *et al.*, 2017). La MSN es estudiada globalmente por su capacidad para procesar diversos residuos orgánicos y su alta tasa de bioconversión en biomasa útil (Sheppard, 1983; Tomberlin y Sheppard, 2002; Diener *et al.*, 2009; Holmes *et al.*, 2016). Gracias a la composición de su microbiota intestinal, sus larvas digieren una gran variedad de sustratos alimenticios, tales como restos de vegetales en descomposición, estiércol, harinas, residuos orgánicos municipales, cadáveres de animales, lodos fecales, entre otros (Üstüner *et al.*, 2003; Banks, 2014). Cuando las larvas alcanzan su estado de pre-pupa, han acumulado proteína (36–48 %), grasa (31–33 %) y calcio (7.5 %) en formas de alta calidad nutricional para animales, haciéndolas una alternativa deseable para la producción de alimento en el sector pecuario y pesquero (Arango *et al.*, 2004; Diener *et al.*, 2011).

La cuantificación de la bioconversión de sustratos por las larvas de MSN es esencial para realizar estimaciones de su potencial para transformar los residuos orgánicos. En el presente trabajo se reportan las dinámicas de bioconversión de diferentes residuos

orgánicos y de acumulación de peso por *H. illucens* hasta llegar a la fase de pupa, bajo la hipótesis de que todos los sustratos son susceptibles de degradación por las larvas y que sus tasas de bioconversión podrían variar de un sustrato a otro. Las larvas de *H. illucens* mostraron capacidad para degradar los cuatro sustratos evaluados, con variaciones en la eficiencia de degradación y bioacumulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Larvas de MNS y residuos evaluados

Se utilizaron larvas de dos a tres semanas de edad (cuarto y quinto instar) con un peso fresco menor a 0.09 g, obtenidas de una granja de insectos ubicada en Morelos, México. Se hicieron cinco grupos de larvas y aleatoriamente se les asignó un tratamiento a cada uno: 1) residuos domiciliarios (restos de frutas, verduras, cáscaras de huevo y tortilla, con siete días de descomposición); 2) residuos de restaurante (restos de frutas, verduras, leguminosas, arroz, pan, tortilla, huevo cocinado y carne, con dos días de descomposición); 3) estiércol porcino proveniente de un establo de hembras en gestación y lactancia; 4) estiércol bovino obtenido de los establos del Colegio de Postgraduados; y 5) control. Los residuos domiciliarios y de restaurante fueron triturados y escurridos manualmente utilizando un trozo de tela, y mezclados hasta obtener una consistencia homogénea. Los residuos se conservaron en refrigeración dentro de bolsas de plástico etiquetadas apropiadamente, para facilitar su manejo y dosificación durante el bioensayo. El experimento se realizó durante 2019.

Procedimiento experimental

Para cada tratamiento, diez larvas de MSN fueron confinadas individualmente en cajas de Petri y mantenidas en incubadora a 28 ± 0.5 °C y HR de 67 ± 3.8 %. Adicionalmente, un grupo de diez cajas de Petri libres de larva fue provisto con el mismo suministro de alimento bajo las mismas condiciones. Cada 48 horas, se proporcionó una nueva cantidad de alimento (2.5 a 3.0 g) a las larvas en cada tratamiento y al grupo control. En cada cambio de provisión, se pesó en conjunto el alimento remanente y las excretas en cada caja (peso final), así como a la larva misma, empleando una balanza analítica (Scientech ZSA 120 con precisión de 1.0 diezmilésimo de gramo). Los pesos se evaluaron 12 veces durante 24 días. La diferencia de peso al inicio y final de cada período (*peso inicial - peso final*) fue asumida como el consumo aparente, al considerar la pérdida de humedad del sustrato por evaporación. Por ello, se realizó un ajuste con los datos de humedad perdida del grupo testigo, obteniendo el consumo efectivo en cada periodo.

Estimación de tasas y análisis estadístico

Empleando los datos del consumo efectivo (degradación) y del peso ganado por las larvas se obtuvieron las curvas de acumulación de cada tratamiento. La degradación se calculó a partir de la diferencia de peso del residuo en la caja de Petri (*peso inicial del*

residuo) - (*residuo remanente* + *ecretas de larva*). Se calculó el valor del parámetro r que representa la tasa de acumulación de peso en larva (Cuadro 1) y de degradación de los residuos. Los datos de pérdida de peso de las prepupas se ajustaron a la ecuación $y = t / (A + (B * t))$, donde el A indica la intensidad de declinación del peso fresco y B , la velocidad de estabilización del peso de la larva previo a su pupación. Utilizando el procedimiento MODEL en el programa estadístico SAS v. 9.3 (The SAS Institute, Cary North Carolina), se realizó el ajuste para determinar los valores de los parámetros (r , y_0 , A y B). Asimismo, se calcularon sus estadísticas descriptivas (medias y varianzas), las pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianzas, los análisis ANOVA o de comparación de medianas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis (según fuese apropiado), así como las comparaciones múltiples de Tukey, con $\alpha=0.05$ en todos los casos.

Cuadro 1. Modelos de crecimiento ajustados a la degradación de residuos y acumulación de peso por las larvas de *Hermetia illucens*.

Modelo	Fórmula
Exponencial	$y = y_0 * e (r * t)$
Logístico	$y = K / (1 + ((k - y_0) / y_0) * e (-r * t))$
Gompertz	$y = e (-(-\log (y_0)) * e (-r * t))$
Monomolecular	$y = 1 - (K - y_0) * e (-r * t)$

r : tasa de crecimiento; y_0 : peso inicial; t : días; k : capacidad máxima de acumulación de peso y de degradación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las larvas alimentadas con residuos de restaurante (RR) alcanzaron un peso máximo promedio de 333.2 ± 73.8 mg; con residuos domiciliarios (RD), un peso de 293.2 ± 61.5 mg; con estiércol bovino (EB), 270.7 ± 43.2 mg; y con estiércol porcino (EP), 246.8 ± 51.6 mg. Sólo las diferencias entre RR y EP resultaron estadísticamente significativas (Tukey, $p = 0.05$). Las larvas de *H. illucens* alcanzaron un peso fresco mayor al reportado en otros estudios donde, alimentadas con diversos sustratos, obtuvieron pesos entre 69 y 263 mg por larva (Diener *et al.*, 2009; Ferdousi *et al.*, 2020; Jucker *et al.*, 2017; Oonincx *et al.*, 2015a; Oonincx *et al.*, 2015b; Nguyen *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015).

Dinámica de acumulación de peso en larvas individuales

De los cuatro modelos matemáticos evaluados, el modelo de crecimiento logístico tuvo el mejor ajuste. Su coeficiente de determinación (R^2) fue el más alto y tuvo una alta significancia en las pruebas de hipótesis de sus parámetros (y_0 y r) (Datos no mostrados). Tomando como base los valores máximos observados, se comparó el ajuste del modelo utilizando valores de $K = 0.4$ y $K = 0.5$, obteniéndose un mejor ajuste con $k = 0.4$, donde K representa el peso límite o máximo posible (g), a partir del cual la larva detiene su ganancia de peso llegando a la etapa de prepupa. El ANOVA realizado a los valores de r , indicó diferencias significativas entre tratamientos. El valor más alto de

este parámetro se obtuvo con el tratamiento RR, seguido por (EB), (EP) y finalmente (RD) (Cuadro 2).

El valor de K , derivado del modelo de crecimiento logístico, permite definir que las larvas de MSN pueden llegar a un peso acumulado máximo de alrededor de 0.4 g. Más que la identificación de un peso mínimo requerido para comenzar el proceso de formación de pupa y metamorfosis sugerido por Nijhout and Williams (1974), el valor de K permite identificar cuándo las larvas han llegado a su máxima acumulación de biomasa, lo cual es importante para efectos de su aprovechamiento económico como recurso alimenticio y/o energético.

La dinámica general de acumulación de peso fresco de larvas de *H. illucens* en cada uno de los tratamientos estudiados permite definir el punto donde las larvas llegan a su capacidad máxima de acumulación de peso por día (Figura 1A), lo cual ocurre en $K/2$ (0.2 g). A partir de este momento, la acumulación diaria de biomasa en la larva disminuye paulatinamente hasta llegar al valor de cero en la etapa de prepupa. Las larvas alimentadas con RR alcanzaron una capacidad máxima de acumulación de peso de 0.061 g d^{-1} , dos días antes que las larvas alimentadas con los otros residuos (RD, EP y EB), de las cuales su capacidad máxima de acumulación de peso fue alrededor de 0.040 g d^{-1} . Adicionalmente, las larvas alimentadas con RR alcanzaron una acumulación máxima cinco días antes que las larvas de los tratamientos restantes (RD, EP y EB) (Figura 1B), indicando que completan su peso máximo varios días antes que con los demás residuos.

Existe una clara diferencia entre la dinámica de acumulación de peso en larvas alimentadas con RR en comparación con los tres tratamientos restantes (Figura 1), lo cual puede atribuirse a que este tipo de residuos orgánicos tiene un mayor diversidad de componentes y, presumiblemente, mayor contenido de proteínas y lípidos que los residuos de frutas y verduras (Gold *et al.*, 2018). Aun cuando los residuos de restau-

Cuadro 2. Parámetros del modelo Logístico* estimados para la dinámica de acumulación de peso fresco de larvas de *Hermetia illucens* con diferentes fuentes de alimento. Peso inicial de larvas < 0.090 g.

Fuente de alimento	Parámetro	Promedio estimado del parámetro [†] τ	Parámetro	Promedio estimado del parámetro [§]	Rango de valores de R^2
RD	r	$0.199 \pm 0.064 \text{ b}$	y_0	0.088 ± 0.026	0.681 – 0.992
RR	r	$0.315 \pm 0.090 \text{ a}$	y_0	0.080 ± 0.030	0.882 – 0.988
EP	r	$0.213 \pm 0.064 \text{ b}$	y_0	0.081 ± 0.020	0.901 – 0.987
EB	r	$0.214 \pm 0.054 \text{ b}$	y_0	0.076 ± 0.013	0.899 – 0.979

[†]Estimados para un valor $k = 0.4 \text{ g}$. RD: residuos de alimentos domiciliarios; RR: residuos de alimentos de restaurante; EP: estiércol porcino; EB: estiércol bovino. [‡]Todos los promedios de los estimadores se ajustan a una distribución normal, de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk. El parámetro r está dado en gramos de peso fresco ($\text{g} \cdot \text{día}^{-1}$). [§]Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $P \alpha = 0.05$; $F = 5.37$, $\text{Prob} > F = 0.0041$).

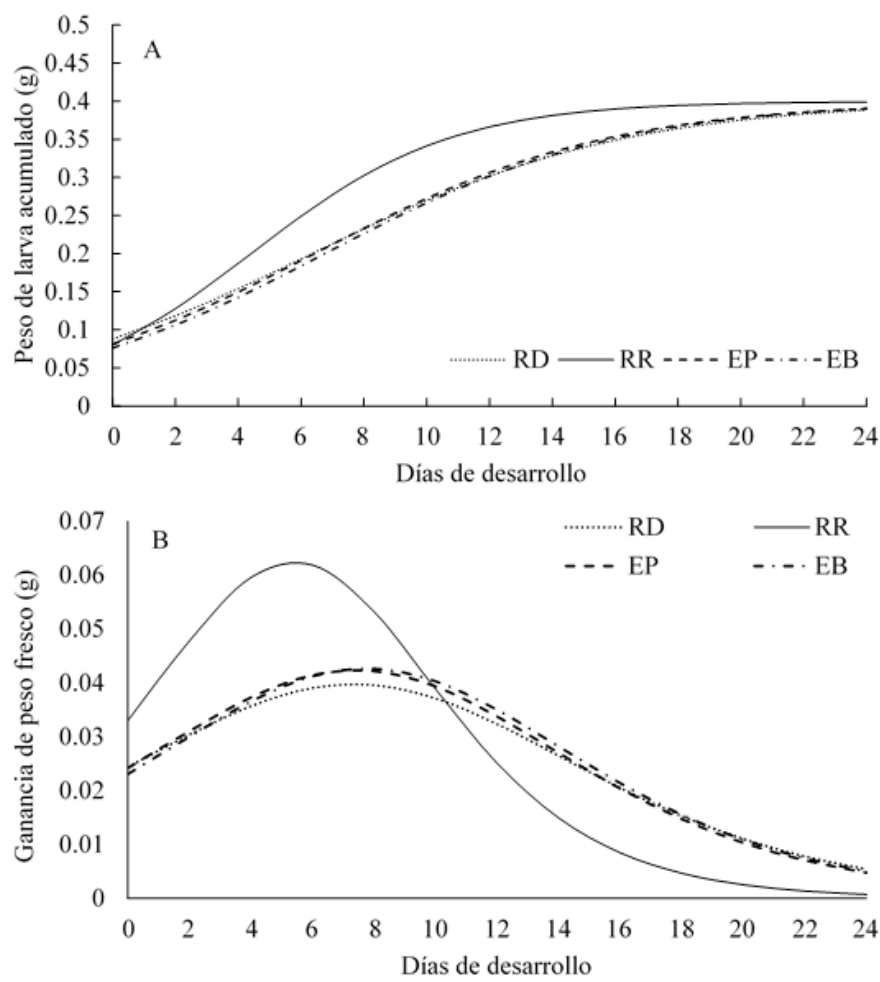


Figura 1. Estimación de la dinámica general de acumulación de biomasa (A) y tasa de ganancia diaria (B) en las larvas de *Hermetia illucens* según el modelo logístico $y = k / (1 + ((k - y_0) / y_0) * e^{-r * t})$, en cuatro tratamientos. RD: residuos domiciliarios; RR: residuos de restaurante; EP: estiércol porcino; EB: estiércol bovino. Peso inicial de larvas < 0.090 g. Para los valores de los parámetros ver Cuadro 2.

rante no contengan desechos de origen animal, proporcionan mayor abundancia de proteína cruda y de determinados aminoácidos, que los residuos de frutas y verduras, según Spranghers *et al.* (2016). Bajo condiciones ambientales óptimas y suficiente disponibilidad de RR, se esperaría que las larvas criadas con dichos residuos tiendan a alcanzar un peso fresco máximo de 0.4 g.

Usando los valores determinados en el proceso de ajustar los datos al modelo logístico, se proyectó la capacidad de acumulación de peso en las larvas previo a su establecimiento en el experimento (Figura 2A). Bajo las mismas consideraciones, se graficó la dinámica general de acumulación de peso fresco en larvas durante todo su desarrollo,

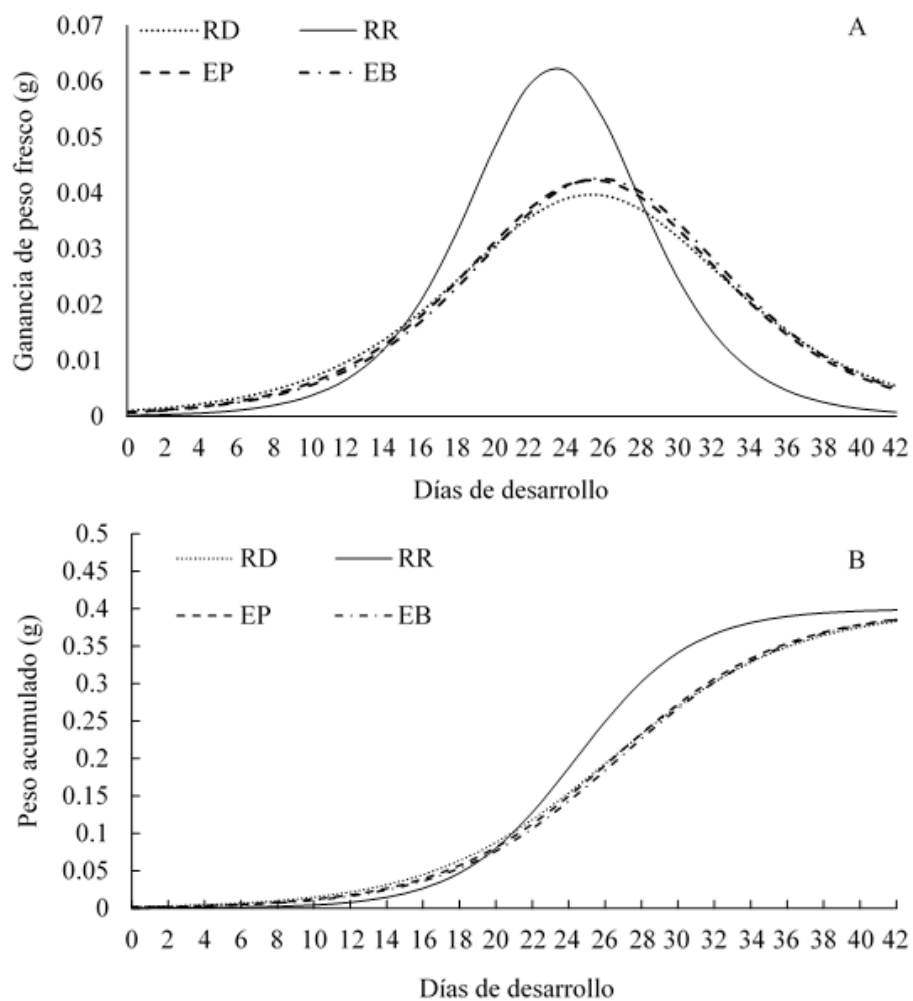


Figura 2. Proyección de la dinámica de acumulación de peso diario (A) y acumulación de peso total (B) durante toda la etapa larval de *H. illucens*, utilizando los parámetros estimados por el modelo logístico $y = k / (1 + ((k - y_0) / y_0) * e^{-r * t})$. RD: residuos domiciliarios; RR: residuos de restaurante; EP: estiércol porcino; EB: estiércol bovino.

alimentándose con los mismos residuos y bajo las mismas condiciones ambientales (Figura 2B). Los valores del día 18 se corresponden con los valores del día 0 de los gráficos anteriores (Figura 1), confirmando que larvas tenían entre 15 y 20 días de edad. De acuerdo con el modelo logístico, la capacidad diaria de acumulación de peso por las larvas de *H. illucens* no es estática, sino que se trata de una acumulación de peso dinámica que varía respecto al tiempo, dependiendo del peso y tamaño actual de la larva; es decir, de su capacidad fisiológica para acumular peso según su edad. De acuerdo con la proyección realizada a partir de los parámetros estimados por el modelo logístico, en condiciones ambientales óptimas las larvas completarían su desarrollo en aproximadamente 42 días, al llegar a las etapas de prepupa y pupa (Nguyen *et al.*,

2013). Además, las larvas alcanzarían un peso óptimo aprovechable aproximadamente un mes después de la eclosión (RR: 32 d; RD, EP y EB: 37 d).

Declinación y estabilización de peso en larvas individuales

De acuerdo con las observaciones realizadas, cuando las larvas llegan al sexto instar (prepupa) su desarrollo se detiene para comenzar la formación de la pupa. En este periodo el peso fresco de las larvas sufre una declinación acentuada, seguido de una estabilización que se mantiene hasta la formación de la pupa. Aunque el modelo empleado para describir esta dinámica muestra un alto valor de R^2 (Cuadro 2), ninguno de sus parámetros pudo estimarse con precisión, ni su estimador mostró una distribución normal de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk (Figura 3).

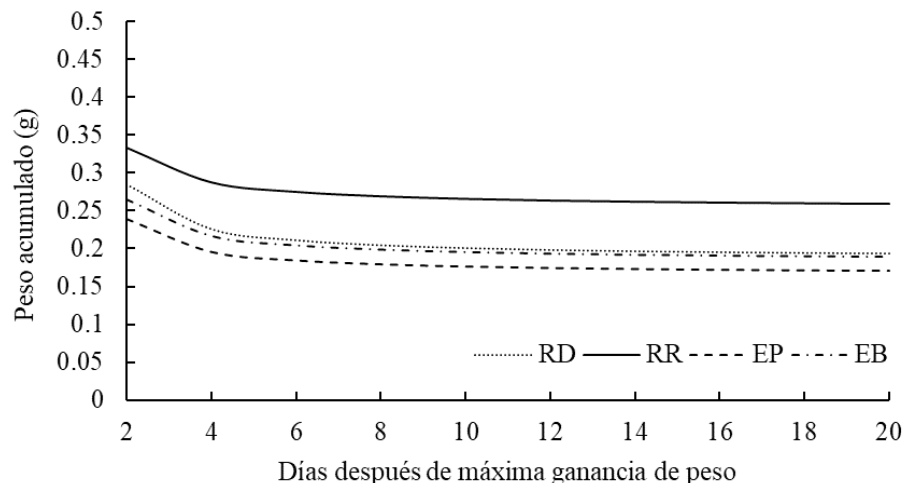


Figure 3. Dinámica general de declinación de peso de las larvas de *H. illucens* con cuatro tratamientos utilizando el modelo $y = t / (A + (B * t))$. RD: residuos domiciliarios; RR: residuos de restaurante; EP: estiércol porcino; EB: estiércol bovino.

En el tratamiento con RR se obtuvo un valor mayor de A y un valor de B ligeramente menor en comparación con los demás tratamientos, lo que indica que la pérdida de peso en las larvas fue menor en este tratamiento y la velocidad de estabilización no difirió de manera pronunciada (Cuadro 2). Se aprecia también la dinámica general de declinación y estabilización del peso de larvas para cada uno de los tratamientos, donde el día dos equivale al comienzo de la declinación (Figura 3). El modelo de declinación y estabilización de peso demuestra la eficiencia que existe en el aprovechamiento del alimento durante el desarrollo larval cuando la nutrición proviene de una fuente más diversa y fresca, asegurándose una mayor conservación del peso fresco durante el paso de larva a prepupa. Aunque se trata de una disminución del 10 al 20 %, ésta sucede tan sólo 2 d después de que la larva alcanza su peso máximo.

Degradación de residuos orgánicos por larvas individuales

El modelo de crecimiento logístico mostró mejor ajuste a los datos de consumo de los distintos sustratos. Su R^2 fue la más alta, como también lo fue su significancia en la prueba de hipótesis de sus parámetros (y_0 y r) (datos no mostrados). Dicho modelo fue evaluado con valores de $K = 5$, $K = 5.5$ y $K = 6$, obteniéndose un mejor ajuste con $K = 5.5$. K representa la máxima degradación de residuos posible por larva en g de peso fresco. Aunque la varianza entre las medias del estadístico r es homogénea según la prueba Bartlett, los residuales del análisis no mostraron normalidad (Cuadro 3), por lo cual se realizaron las pruebas no paramétricas de sumas de rangos de Wilcoxon, en la cual se obtuvo evidencia de que el tratamiento EB tuvo una menor suma de puntuaciones y de Kruskal-Wallis, donde se obtuvo un valor altamente significativo de $P = 0.0013$ (Cuadro 4).

Cuadro 3. Parámetros del modelo Logístico[†] estimados para la dinámica de degradación (peso fresco) de alimento de diferentes fuentes por las larvas de *Hermetia illucen*.

Fuente de alimento	Parámetro	Promedio estimado del parámetro [‡]	Parámetro	Promedio estimado del parámetro	Rango de valores de R^2
RD	r	0.264 ± 0.053 ab	y_0	0.456 ± 0.067	0.853 – 0.981
RR	r	0.299 ± 0.067 a	y_0	0.401 ± 0.097	0.871 – 0.964
EP	r	0.316 ± 0.046 a	y_0	0.434 ± 0.063	0.843 – 0.948
EB	r	0.194 ± 0.062 b	y_0	0.459 ± 0.130	0.732 – 0.959

[†]Estimados para un valor $k = 5.5$ g. RD: Residuos de alimentos domiciliarios; RR: residuos de alimentos de restaurante; EP: estiércol porcino; EB: estiércol bovino; r : gramos de residuo degradado /g·día. [‡]Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $P \alpha = 0.05$).

Cuadro 4. Pruebas de comparación de medianas de la tasa r del modelo Logístico[†], estimado para la dinámica de degradación en peso fresco de residuos de diferentes fuentes, por las larvas de *Hermetia illucens*.

Fuente de alimento	Parámetro	Mediana estimada del parámetro [‡]	Coefficiente de variación	Suma de puntuaciones de Wilcoxon [§]
RD	r	0.257	20.15	158
RR	r	0.278	22.49	203
EP	r	0.287	14.63	236
EB	r	0.175	32.03	69

[†]Estimados para un valor $k=5.5$ g. RD: residuos de alimentos domiciliarios; RR: residuos de alimentos de restaurante; EP: estiércol porcino; EB: estiércol bovino. [‡] r = gramos de residuo degradado (g día)⁻¹. [§]Diferencia entre tratamientos altamente significativa, de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis $Pr = 0.0013$.

Las dinámicas de degradación del sustrato por las larvas que recibieron EP, RR y RD fueron muy similares y superiores a la capacidad de las larvas que recibieron EB (Figura 4A). De acuerdo al modelo logístico, la máxima capacidad de las larvas para degradar los residuos ocurre cuando se alcanza el valor de $K/2$ en el día 8 de nuestras observaciones, coincidente un consumo acumulado de 2.75 g. A partir de entonces, la degradación continúa con un ritmo decreciente hasta llegar a valores cercanos a cero, cuando la larva ha completado su desarrollo e inicia su fase de prepupa. En el tratamiento EP las larvas logran su máxima degradación (0.85 g d^{-1}), un día antes que en los tratamientos RD (0.83 g d^{-1}) y RR (0.72 g d^{-1}). Bajo el tratamiento EB las larvas logran su máxima degradación (0.53 g d^{-1}) 5 y 4 días después que en los otros tratamientos (Figura 4B). La baja capacidad de degradación observada en el EB se atribuye a su alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, como han sugerido Rehman *et al.*, (2017) y Triplehorn y Johnson (2005).

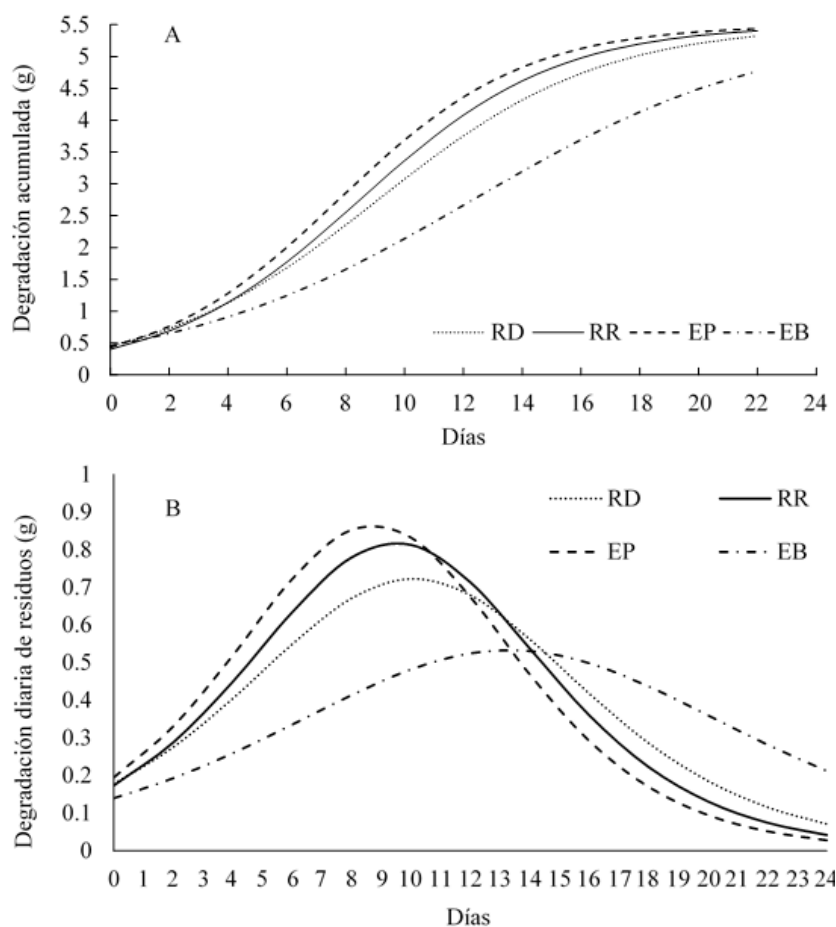


Figure 4. Dinámica de degradación total (A) y degradación diaria (B) de residuos por las larvas de *H. illucens*. Los datos fueron ajustados a un modelo Logístico $y = k / (1 + ((k - y_0) / y_0) * e^{-r * t})$. RD: residuos domiciliarios; RR: residuos de restaurante; EP: estiércol porcino; EB: estiércol bovino.

CONCLUSIONES

Las larvas de *H. illucens* fueron capaces de degradar los cuatro tipos de residuos evaluados. Los modelos ajustados permitieron analizar las tasas de conversión del sustrato en biomasa. La mayor eficiencia en la acumulación de masa corporal fue observada en los residuos con mayor diversidad de componentes como los generados en restaurantes [0.315 ± 0.090 g (g d⁻¹)]. Con este tipo de residuos, las larvas alcanzaron un peso óptimo aprovechable (0.4 g) varios días antes que cuando se alimentan con los demás residuos, sugiriendo una mayor eficiencia de bioconversión. Los residuos orgánicos domiciliarios, de restaurante y estiércol porcino fueron degradados por las larvas de *H. illucens* con tasas muy semejantes entre ellos (0.72–0.85 g d⁻¹); sin embargo, el estiércol bovino fue degradado con menor eficiencia (0.53 g d⁻¹) sugiriendo que su tratamiento con estas larvas podría no ser la mejor opción.

Estas larvas pasan por un proceso de declinación de peso al llegar a la etapa de prepupa. Aunque por ahora no es claro si tal pérdida de peso implica solo pérdida de agua (como ocurre en lepidópteros) o también de biomasa corporal. La información obtenida es de utilidad para considerar el manejo y aprovechamiento de esta especie en procesos industriales de bioconversión, pues presenta un acercamiento al rendimiento productivo de las larvas como recurso.

REFERENCIAS

- Acurio G, Rossin A, Teixeira PF, Zepeda F. 1997. Diagnóstico de la situación del manejo de residuos sólidos municipales en América Latina y el Caribe. Banco Interamericano de Desarrollo 130 p.
- Arango GP., R. Vergara RA, Mejía H. 2004. Análisis composicional, microbiológico y digestibilidad de la proteína de la harina de larvas de *Hermetia illucens* L (Diptera:Stratiomyidae) en Angelópolis, Antioquia, Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía 57 (2): 2491–2500.
- Banks IJ. 2014. To assess the impact of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae on fecal reduction in pit latrines. School of Hygiene and Tropical Medicine. <https://doi.org/10.17037/PUBS.01917781>
- Bernache-Pérez G. 2012. Riesgo de contaminación por disposición final de residuos. Un estudio de la región centro occidente México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 28 (1): 97–105.
- Diener S, Zurbrugg C, Gutiérrez FR, Nguyen DH, Morel A, Koottatep T, Tockner K. 2011. Black soldier fly larvae for organic waste treatment – prospects and constraints. In: Alamgir M, Bari QH, Rafizul IM, Islam SMT, Sarkar G, Howlader MK. (eds.). 2nd International conference on solid waste management in the developing countries. Proceedings of the WasteSafe 2011: Khulna, Bangladesh, pp: 1–8.
- Diener S, Zurbrugg C, Tockner K. 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. Waste Management and Research 27 (6): 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242x09103838>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2013. Climate-Smart Agriculture Sourcebook Summary. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. <https://www.fao.org/3/i7994e/i7994e.pdf> (Recuperado: septiembre 2022).
- Ferdousi L, Sultana N, Helal MA, Momtaz N. 2020. Molecular identification and life cycle of black soldier fly (*Hermetia illucens*) in laboratory. Bangladesh Journal of Zoology 48 (2): 429–440. <https://doi.org/10.3329/bjz.v48i2.52381>

- Fischer-Kowalski M, Haberl H. 2015. Social metabolism: a metric for biophysical growth and degrowth. *In: Handbook of Ecological Economics*, Martinez-Alier J, Muradian R. (eds.). Edward Elgar Publishing: Cheltenham, UK, pp: 100–138. <https://doi.org/10.4337/9781783471416>
- Gold M, Tomberlin JK, Diener S, Zurbrügg C, Mathys A. 2018. Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review. *Waste Management* 82: 302–318. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.022>
- Holmes LA, VanLaerhoven SL, Tomberlin JK. 2016. Lower temperature threshold of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) development. *Journal of Insects as Food and Feed* 2 (4): 255–262. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0008>
- Hoornweg D, Bhada-Tata P. 2012. What a waste: a global review of solid waste management. Urban development series; knowledge papers no. 15. World Bank. Washington, DC, USA. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/17388> (Recuperado: septiembre 2022).
- Jucker C, Erba D, Leonardi MG, Lupi D, Savoldelli S. 2017. Assessment of vegetable and fruit substrates as potential rearing media for *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Environmental Entomology* 46 (6): 1415–1423. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx154>
- IPCC (Panel Intergubernamental del Cambio Climático). 2014. Summary for policymakers. climate change 2014: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press. Cambridge, NY, USA. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324>
- IPCC (Panel Intergubernamental del Cambio Climático). 2015. Climate change 2014 Mitigation of climate change summary for policymakers and technical summary mitigation of climate change. Cambridge University Press. Cambridge, NY, USA. <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg3/> (Recuperado: septiembre 2022).
- Nguyen TTX, Tomberlin JK, Vanlaerhoven S. 2013. Influence of resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larval development. *Journal of Medical Entomology* 50 (4): 898–906. <https://doi.org/10.1603/me12260>
- Nguyen TTX, Tomberlin JK, Vanlaerhoven S. 2015. Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environmental Entomology* 44 (2): 406–410. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv002>
- Nijhout HF, Williams CM. 1974. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation. *Journal of Experimental Biology* 61 (2): 493–501.
- Oonincx DGAB, van Broekhoven S, van Huis A, van Loon JJ. 2015a. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *Plos One* 10 (12): e0144601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>
- Oonincx DGAB, van Broekhoven S, van Huis A, van Loon JJ. 2015b. Nutrient utilisation by black soldier flies fed with chicken, pig, or cow manure. *Journal of Insects as Food and Feed* 1 (2): 131–139. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0023>
- Rehman KU, Cai M, Xiao X, Zheng L, Wang H, Soomro AA, Zhou Y, Li W, Yu Z, Zhang J. 2017. Cellulose decomposition and larval biomass production from the co-digestion of dairy manure and chicken manure by mini-livestock (*Hermetia illucens* L.). *Journal of Environmental Management* (196): 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.03.047>
- Salomone R, Saija G, Mondello G, Giannetto A, Fasulo S, Savastano D. 2017. Environmental impact of food waste bioconversion by insects: application of life cycle assessment to process using *Hermetia illucens*. *Journal of Cleaner Production* 140 (2): 890–905. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.154>
- Sheppard DC. 1983. House fly and lesser fly control utilizing the black soldier fly in manure management systems for caged laying hens. *Environmental Entomology* 12 (5): 1439–1442. <http://dx.doi.org/10.1093/ee/12.5.1439>
- Sheppard DC, Tomberlin JK, Joyce JA, Kiser BC, Sumner SM. 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Medical Entomology* 39 (4): 695–698. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.4.695>
- Spranghers T, Ottoboni M, Klootwijk C, Oryn A, Deboosere S, De Meulenaer B, Michiels J, Eeckhout M, De Clercq P, De Smet S. 2016. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (8): 2594–2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>

- Tomberlin JK, Sheppard DC. 2002. Factors influencing mating and oviposition of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in a colony. *Journal of Entomological Science* 37 (4): 345–352. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-37.4.345>
- Triplehorn CA, Johnson NF. 2005. *Borror and DeLong's Introduction to the study of insects* (7th edition); Cengage Learning: Boston, Massachusetts, USA. 888 p.
- UN (Organización de las Naciones Unidas). 2016. *Transforming our world: the 2030 agenda for sustainable development*. New York, NY, USA. <https://doi.org/10.1201/b20466-7>
- UNEP (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). 2016. *Food systems and natural resources. A report of the working group on food systems of the international resource panel*. <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/7592> (Recuperado: septiembre 2022).
- Üstüner T, Hasbenli A, Rozkošný R. 2003. The first record of *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Stratiomyidae) from the Near East. *Studia Dipterologica* 10: 181–185.
- van Berkum S, Dengerink J, Ruben R. 2018. *The food systems approach: sustainable solutions for a sufficient supply of healthy food*. Wageningen Economic Research 2018: 29. <https://doi.org/10.18174/451505>
- Yuan Z, Bi J, Moriguchi Y. 2006. The Circular Economy: A new development strategy in China. *Journal of Industrial Ecology* 10 (1–2): 4–8. <https://doi.org/10.1162/108819806775545321>

EFFECT OF TEMPERATURE AND ULTRAVIOLET RADIATION ON GROWTH AND PATHOGENICITY OF *Metarhizium anisopliae*

María Elena Márquez-Gutiérrez¹, Evelyn Pérez-Lezcano², Yamilé Baro-Robaina³,
Francisco Paúl Gámez Vázquez⁴, César Aguirre-Mancilla⁵, Gerardo Armando Aguado-Santacruz^{4*}

¹ H52 México. Dr. Alvarado No. 59 entre Galiano y Mazatlán, Uruapan, Michoacán, México. C. P. 60050.

² LABIOFAM. Avenida Independencia km 16.5, Boyeros, Boyeros, Cuba. C. P. 10800.

³ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 entre 5ta B y 5ta F No. 514, Miramar, Cuba. C. P. 11300.

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Celaya, Guanajuato, México. C. P. 38110.

⁵ Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico Roque. Carretera Celaya-Juventino Rosas km 8, Celaya, Guanajuato, México. C. P. 38110.

* Author for correspondence: gaguados@gmail.com

ABSTRACT

The efficacy of entomopathogenic fungi in the field depends on the influence of various environmental factors, including temperature and level of exposure to UV light. It is hypothesized that temperature and level of UV light exposure of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales, Clavicipitaceae) may affect its efficiency in controlling the sweetpotato weevil (*Cylas formicarius*, Fabricius; Coleoptera, Brentidae). The objective of this study was to evaluate the influence of temperature and ultraviolet light radiation on the growth and pathogenicity of different native strains of Cuban origin of the *M. anisopliae* Sorokin complex with biological activity against *C. formicarius*. Colony diameter was measured at 28, 30, 32 and 34 °C temperature and exposed to ultraviolet light (254 nm) for 10, 15, 20, 30, 30, 60 and 120 minutes. Under laboratory conditions, the percentage germination of conidia of strains LBMa-11, LBM-30, LBM-41 and LBM-146 was determined, as well as their pathogenic capacity by means of bioassays with adults of *C. formicarius* in terms of the percentage of cumulative mortality and the mean lethal time (TL50). Results proved that temperature and UV light affect the ability of *M. anisopliae* to control *C. formicarius*. A delay in cumulative mortality was detected for all strains exposed to UV light, with an increase in TL50. The optimum temperature range was between 28 and 30 °C. The strain LBM-127 showed the highest sensitivity to temperature, LBMa-11 the highest tolerance to UV light, and LBM-146 was the most virulent according to Probit regression analysis.

Keywords: *Cylas formicarius*, temperature, ultraviolet radiation.

INTRODUCTION

Entomopathogenic fungi belonging to the genus *Metarhizium* Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) are considered effective biological control agents against a broad spectrum of insect orders (Rezende *et al.*, 2015). Globally, they are used in the

Citation: Márquez-Gutiérrez ME, Pérez-Lezcano E, Baro-Robaina Y, Gámez-Vázquez FP, Aguirre-Mancilla C, Aguado-Santacruz GA. 2022. Effect of temperature and ultraviolet radiation on growth and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae*. *Agrociencia*. 56(8): 1484-1506. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2477>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: October 11, 2021.

Approved: August 25, 2022.

Published in Agrociencia:

December 20, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



prevention and management of various insect species of agricultural interest (López-Lastra *et al.*, 2019).

In Cuba, the use of *Metarhizium* spp. began in 1980 with studies of the physiology and pathogenicity of isolates *in vitro* and in the field against pests such as *Cosmopolites sordidus* Germar, *Lissorhoptrus brevirostris* Kuschel, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel and *Monecphora bicincta fraterna* Uhler. These results allowed the selection of *Metarhizium anisopliae* strain LBMa-11 for the control of *L. oryzophilus* and *Monecphora fraterna* in rice crops and pastures. The implementation of mass production technologies was implemented in the Entomophagous and Entomopathogen Reproduction Centers (CREE), as a strategy for insect control in Integrated Pest Management Programs in crops (Márquez-Gutiérrez *et al.*, 2020).

Different environmental factors such as temperature, solar radiation, pH and humidity can limit the development of *M. anisopliae*, which is one of the disadvantages for its application in the field. Temperature has an influence on conidial germination, germ tube development and penetration, as well as on their ability to colonize and reproduce (Pereira-Junior *et al.*, 2018). The evaluation of growth, sporulation and germination rates in relation to temperature is important to operate an efficient selection of *Metarhizium* spp. isolates with biocontrol potential (Torres *et al.*, 2013).

Solar radiation has a direct impact on the survival and efficiency as a biocontrol agent of this fungus, in addition to play a fundamental role in its permanence on treated crops. Ultraviolet light affects the growth of *Metarhizium* spp. as a function of the intensity of the energy received and the time of exposure, which can limit or retard conidial germination by direct (mutations) or indirect genetic damage (López-Lastra *et al.*, 2019).

Recent research on *Cylas formicarius*, a coleopteran that affects the productivity of several economically important crops, particularly sweet potato (*Ipomoea batatas*), focuses on the study of abiotic factors that influence the growth and development of the fungus. The goal is to select strains with greater potential for the biological control of pests and that can adapt to different environmental conditions to ensure their persistence and efficacy in field conditions.

The research hypothesis assumes that temperature and level of UV light exposure of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales, Clavicipiceae) may affect its efficiency in controlling the sweetpotato weevil (*Cylas formicarius*, Fabricius; Coleoptera, Brentidae). The objective of this study was to evaluate the influence of temperature and the level of exposure to ultraviolet light on the growth and pathogenicity of native strains of Cuban origin of the *Metarhizium anisopliae* Sorokin complex with biological activity against *Cylas formicarius*.

MATERIALS AND METHODS

Strains LBM-5, LBM-10, LBMa-11, LBM-12, LBM-30, LBM-41, LBM-42, LBM-46, LBM-146 and LBM-267 belonging to the *Metarhizium anisopliae* strain complex from the microorganism collection of the Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

(INISAV), Havana, Cuba, were used. These strains were isolated from insects of the orders Hemiptera, Lepidoptera and Coleoptera. In particular, LBMa-11 is the most widely used, as it has been already, for the control of numerous pests under a mass production program of biopesticides in Cuba (Márquez-Gutiérrez *et al.*, 2016).

Reactivation of *Metarhizium anisopliae* strains

The strains were preserved in mineral oil and reactivated by reinoculation on insect hosts in order to enhance the entomopathogenic action of each strain. They were transferred to Petri dishes with complete medium (MC) (Torres *et al.*, 2013) and incubated at 25 ± 2 °C temperature for 10 d until complete sporulation of the cultures. Then, decimal dilutions were made with sterile distilled water and 0.1 % Tween 80 to prepare conidial suspensions at a concentration of 10^7 conidia mL⁻¹; 10 second-generation young adults of *C. formicarius* from a laboratory rearing kept at INISAV at a temperature of 28-30 °C and relative humidity of 85 % were used for insect reinoculation.

Insects were disinfected with 0.1 % sodium hypochlorite for 1 min, rinsed twice in sterile distilled water and immersed for 30 to 50 s in the conidial suspension of each of the previously prepared strains. Treated insects were placed in Petri dishes with sweet potato fragments as natural diet. The dishes were incubated at 25 ± 2 °C in the dark and checked daily until fungal emersion and sporulation were observed. Mycosed insects were re-isolated on MC dishes supplemented with rose bengal (0.5 g L⁻¹) and chloramphenicol (0.05 g L⁻¹) and placed in humid chamber. Monoconidial cultures were obtained, transferred to test tubes with MC and stored at 4 °C (10 replicates per isolate) for assay performance.

Evaluation of temperature on *M. anisopliae* colonies

The growth rate of *M. anisopliae* strains, with the exception of strain LBM-42, was determined at different temperatures. Conidial suspensions were prepared for each monoconidial culture at a concentration of 10^7 conidia mL⁻¹. Taking 0.1 mL of each suspension, surface seeding was performed using a Drigalski spatula. They were then incubated at 26 °C and, at 72 h, 4-mm discs were removed and transferred to the center of Petri dishes (9 cm in diameter) with MC culture medium and incubated at temperatures of 28, 30, 32, and 34 °C. Colony diameter was measured up to 10 d of growth and five replicates were considered per each strain.

Evaluation of ultraviolet light on *M. anisopliae*

The effect of ultraviolet light on the growth and cultural characteristics of *M. anisopliae* strains was evaluated through circular portions of unsporulated cultures, which were obtained by means of a 5 mm diameter borer and placed in the center of Petri dishes. The inoculated plates were exposed to UV light of 254 nm wavelength at a distance of 15 cm height in the biological safety cabinet, for 10, 15, 30, 45, 60 and 120 minutes, four replicates for each variant and a control treatment without UV exposure were

considered. They were then incubated at 25 ± 2 °C temperature and viability test by germ tube emission was performed.

For each replicate, circular portions were obtained and placed in 5 mL of water with Tween 80. Decimal dilutions up to 10^{-4} were then prepared for Neubauer chamber counting to determine the concentration of conidia at the UV exposure times considered; 0.01 mL of the selected dilution was seeded in MC culture medium in humid chamber and incubated at 25 ± 2 °C for 24 h. The viability of the strains was determined by optical microscopic observation of the germ tube emission; it was considered as germinated and viable when the conidium developed hyphal filaments around, and not germinated when visibly spherical conidial structures without lateral extensions were observed. Finally, records were taken (three for each strain) and the percentage of germinated conidia was calculated.

Evaluation of pathogenicity of *M. anisopliae* strains

Evaluation of the pathogenicity of *M. anisopliae* strains exposed to UV light was performed on 70 adults of *C. formicarius* from a laboratory rearing. The insects were disinfected using the same procedure developed for strain reactivation and separated into seven groups, each containing 10 insects. Using *M. anisopliae* strains irradiated with UV light and another group of non-irradiated strains (control +), suspensions were prepared and adjusted to the concentration of 10^7 conidia mL⁻¹ for each treatment. The insects were immersed in the conidial suspensions for 50 s, except the insects in the control group which were not inoculated with the microorganism.

They were then placed on filter paper to remove excess moisture and placed in Petri dishes with the natural sweet potato-based diet, previously disinfected. The dishes were incubated at room temperature and live and dead insects were quantified daily to calculate the percentage of cumulative mortality, according to the formula of Abbott (1925). To evaluate the effect of the treatment on the biocontrol capacity of the strains, at the end of the bioassay, the dead insects that showed incipient mycelium formation and emission were placed in a humid chamber and incubated at 25 ± 2 °C temperature to recover and check the identity of the microorganism.

Statistical analysis

Statistica v. 8.0 was used for statistical analysis of the results. The Kolmogorov-Smirnov normality test was used for all variables and the homogeneity of variance test. The Newman-Keuls parametric test was used to compare means among treatments. By means of Probit regression equations, TL50 was determined to express the correlation between the percentage of cumulative mortality and the time of exposure to UV light.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of temperature on the growth of *Metarhizium anisopliae* colonies

Strains LBM-5, LBM-10, LBMA-11, LBM-12, LBM-30, LBM-41, LBM-127, LBM-146 and LBM-267 of *M. anisopliae* grown on MC culture medium at temperatures of 28, 30, 32

and 34 °C showed similar behaviour to that reported by Gato-Cárdenas *et al.* (2016) on Saboraud Dextrose Agar (SDA) medium. Rodríguez *et al.* (2016) indicated that temperature affects entomopathogenic fungi of the genus *Metarhizium* by affecting their metabolism, altering the processes of enzyme production, toxins, conidia germination, germ tube emission, mechanism of action, colonization and reproduction in the ecological niche. This effect was evident in the growth diameter quantified in the colonies of the different strains of *M. anisopliae* (Figure 1).

The optimum growth temperature was between 28 and 30 °C for these native strains that were isolated from insects collected in different agricultural areas of Cuba (Figure 1). Other authors mentioned a growth optimum between 25 and 30 °C for different strains of *M. anisopliae* isolated in tropical regions of the state of Veracruz, Mexico (Torres *et al.*, 2013). In our study, 32 and 34 °C temperatures were unfavorable in the growth of all strains evaluated; in particular, LBM-5, LBM-12, LBM-41, LBM-127, LBM-146 and LBM-267 were especially sensitive to 34 °C ($p \leq 0.05$). It has been noted that most entomopathogenic fungi are mesophilic with growth between 10 and 40 °C and an optimum between 25 and 35 °C (Chandra and Rahman, 2016).

Strains treated at 34 °C had a marked decrease in growth. Likewise, this temperature limited strains LBM-41 and LBM-267, with growth only at the margins of the disc inoculated on agar. Chandra and Rahman (2017) evaluated four rhizospheric isolates of *M. anisopliae* in India and found increased growth of strains at 30 °C, with a lag from 35 °C, values that agree with the results achieved in this study. A great genetic variability in the thermotolerance of *Metarhizium* spp. was evidenced by Rangel *et al.* (2015), not only in mycelial growth capacity, but also in terms of their conidial germination potential, a characteristic directly linked to the virulence of the strains.

The differential thermal tolerance of this fungus lies in the composition of its cell wall. Souza *et al.* (2014) referred that the tolerance of conidial germination to temperatures

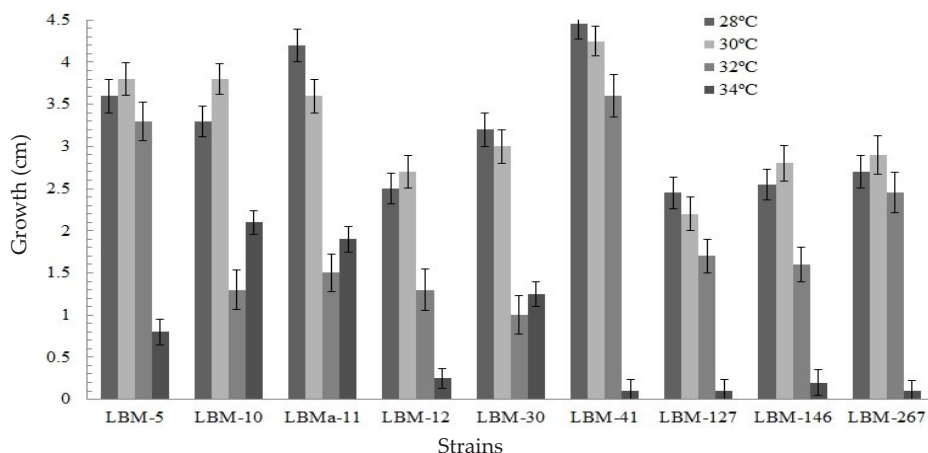


Figure 1. Growth of different strains of *Metarhizium anisopliae* at temperatures of 28, 30, 32 and 34 °C. Different letters indicate significant differences between each strain according to the Newman-Keuls test ($p \leq 0.05$).

above 30 °C is closely related to the presence of hydrophobic proteins in the cell wall of conidia that protect the fungus against heat stress. It is shown that temperature, in addition to affecting growth rate, influences cultural characteristics of *M. anisopliae*, such as sporulation pattern, pigmentation of the culture medium and colony morphology (Gato-Cárdenas *et al.*, 2016).

The cultural characteristics of strain LBM-127 with 10 d of incubation at different temperatures showed very evident differences (Figure 2). At 28 °C it exhibited a cottony colony in the center, white in color, abundant aerial mycelium, incipient sporulation in the center of light olive green color, white mycelial margin and the reverse side of the colony was light yellow with regular edges; it also produced pigments that were exuded to the culture medium. At 30 °C the colony became cottony white with abundant aerial mycelium, diffuse sporulation and white mycelial margin; on the reverse side of the colony, its coloration and margins did not change. At 32 °C it maintained the same texture, but the diffuse sporulation was olive green with no other change of note.

Consistent with our results, Chandra and Rahman (2017) showed that temperature response is an important feature not only in selection, but in the reproduction of fungi and their growth capacity that can be related to their origin and gene pool.

Effect of ultraviolet light on the growth of *M. anisopliae*

The results of the statistical analysis showed significant differences between some of the UV exposure times for the strains evaluated, except the strain LBMa-11 which had no significant differences among treatments ($p > 0.05$). In strains LBM-30 and LBM-41 there were significant differences ($p \leq 0.05$) from 60 and 120 minutes of exposure, respectively, while strain LBM-146 only exhibited statistical differences ($p \leq 0.05$) between the extreme values of UV exposure (10 and 120 minutes) (Table 1). As the time of exposure to ultraviolet light increased, the number of germinated conidia per field decreased. This indicated a gradual decrease in the percentage of conidial germination in the strains evaluated.

The literature reports great variation of entomopathogenic fungi to UV light, although there are isolates very sensitive to high doses of radiation, which cause total mortality of conidia; the response depends on the isolate. Rangel *et al.* (2015) demonstrated that

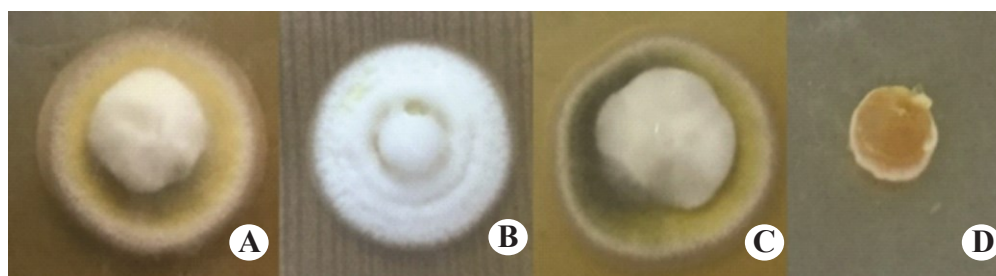


Figure 2. Cultural characteristics of *Metarhizium anisopliae* strain LBM-127 on MC medium at the temperatures evaluated after 10 d of incubation. A: 28 °C, B: 30 °C, C: 32 °C, and D: 34 °C.

Table 1. Diameter of *Metarhizium anisopliae* strains (DC) and percentage germination of conidia (G) at different UV light exposure times.

Strains	Exposure time (minutes)													
	0		10		15		30		45		60		120	
	DC	G	DC	G	DC	G	DC	G	DC	G	DC	G	DC	G
LBMa-11	7.77a [†]	96	7.72a	90	7.12a	88	7.52a	77	7.02a	72	7.52a	70	7.97a	65
LBM-30	5.50a	100	5.27a	98	5.40a	98	5.30a	95	5.40a	95	4.55b	90	5.87c	87
LBM-41	6.65a	99	6.52a	97	6.52a	91	6.65a	91	6.40a	90	6.35a	87	7.10b	80
LBM-146	4.22ab	98	4.02b	88	4.77a	86	4.35ab	80	4.20ab	73	4.17ab	70	4.98a	69

[†] Different letters indicate significant differences between rows for the DC values of each strain, according to the Newman-Keuls test ($p \leq 0.05$).

ultraviolet light impacts the growth and manifestation of morphological characters of *Metarhizium*; a wavelength of 254 nm inhibited conidial germination with direct and indirect DNA damage.

The germination test of the strains showed the presence of conidia with elongation of the germ tube and formation of lateral filaments, which indicated their viability. However, it was noted that the longer the exposure time to ultraviolet light, the lower the number of conidia per field. This represented a gradual decrease in the germination percentage of the strains. In strains LBMa-11 and LBM-146, a conidia germination percentage of 65 and 69 % was obtained at the longest exposure time; the lowest affectation was found in strain LBM-30 with 87 % conidia germination. Strain LBMa-11 (with 10 minutes of exposure), LBM-41 (from 10 to 45 minutes of exposure), and strain LBM-30 in all treatments (except 120 minutes), showed a percentage of conidia germination higher than 90 %.

This characteristic is highly desirable in the agronomic field, since the rapid development of the germinative tube of conidia in entomopathogenic fungi favours the infection process and, consequently, affects the time of exposure to adverse environmental factors when applied under field conditions.

Both damages interfere with DNA replication by causing mutations and even cell death, depending on the energy intensity and time of exposure. It is noted that the olive green coloration of strain LBM-146 changed to yellow in contrast to the control strain, which maintained the intense olive green coloration after 10 d of incubation, typical of some strains grown under appropriate growth conditions.

In general terms, these results agree with those obtained by Rodrigues *et al.* (2016), who obtained a reduction in the growth of *M. anisopliae* and *Beauveria bassiana* strains when exposed to ultraviolet light. Resistance to ultraviolet light may be due to a complex of genes influenced by environmental factors. Among them are those related to the synthesis of pigments such as melanin and carotenoids located on the cell surface that can block radiation. Also included are detoxifying enzymes that inactivate toxic and mutagenic substances such as free radicals, and other enzymes and proteins involved in the repair of radiation damage. Fernandes *et al.* (2015) found that geographic origin

and host are important, as at low latitudes entomopathogenic fungi are more resistant to radiation.

The manifestation of tolerance, according to Fernandes *et al.* (2015), may reflect an adaptive change to environmental conditions. In our study, strain LBMa-11 proved to be the most thermotolerant, a factor that under field conditions influences the mechanism of action of the fungi and affects their persistence. This characteristic may explain, among other aspects, the efficacy achieved in the field by this strain and its extensive application for the reduction of insect pests in Cuba (Márquez *et al.*, 2016).

Evaluation of the pathogenicity of *M. anisopliae* strains exposed to UV radiation against *Cylas formicarius*

The evaluation of *M. anisopliae* strains exposed to UV light treatments in the bioassay to determine the affection of their pathogenic capacity on *C. formicarius* indicated that irradiated strains of the fungus showed a highly variable cumulative mortality percentage among them and among treatments (Figure 3).

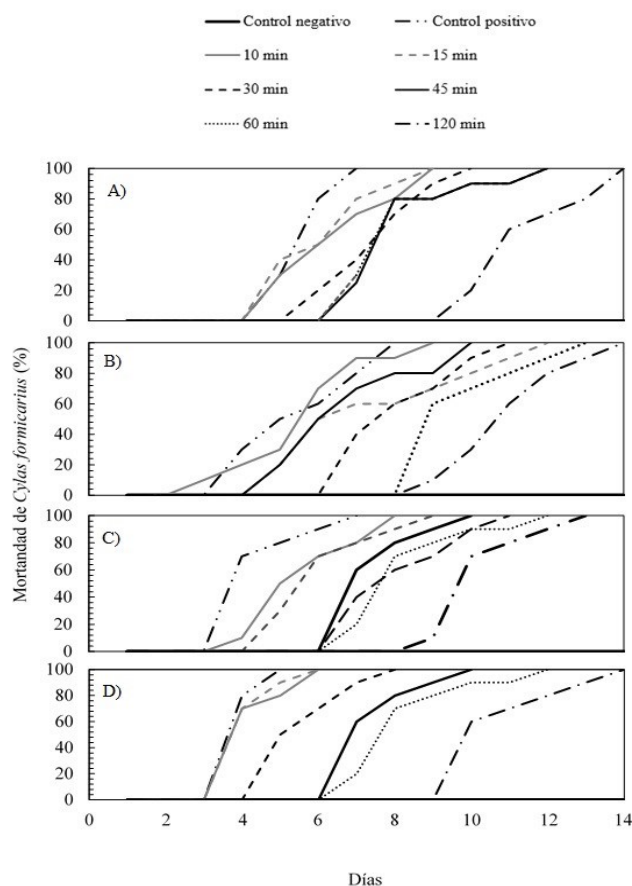


Figure 3. Percentage of cumulative mortality during the bioassay with *Metarhizium anisopliae* strains exposed to 254 nm UV light. A: LBMa-11, B: LBM-30, C: LBM-41, D: LBM-146.

Irradiated as well as non-irradiated (control +) strains reduced the number of live insects from the third day after inoculation and between 4 and 14 d, in contrast to insects not treated with *M. anisopliae* (control -) which remained alive.

Mortality percentages of 100 were achieved in insects treated with strains exposed and not exposed to UV light. However, this action was observed faster in insects infested with strains not irradiated with UV light, which was particularly evident for LBM-146 and LBM-41. No exposure time to UV light at the wavelength equal to 254 nm considered in this study nullified the pathogenic capacity of *M. anisopliae* strains, indicating that there could be other factors related to virulence, such as enzymatic activity involved in the degradation process of the insect cuticle. However, the efficiency of the biological action was affected in relation to the times when the highest percentages of mortality were obtained. The delay in biological action may be due to the fact that the amount of viable conidial inoculum decreased with time of exposure to UV light, as may have occurred in the 45, 60 and 120 min treatments.

The TL50 values obtained by evaluating the time-mortality correlation of each of the UV light treatments (Table 2) indicated that the lowest TL50 corresponded to the non-

Table 2. Relationship between UV radiation exposure time and mortality of *Metarhizium anisopliae* strains.

Strain	Treatment	Equation	R ²	TL50
LBMa-11	Control (+)	Y=17.25X-7.58	0.99	5.4
	10	Y=6.82X-0.29	0.99	6
	15	Y=7.93X-0.93	0.95	5.6
	30	Y=12.10X-5.36	0.99	7.2
	45	Y=4.88X+1.5	0.96	5.2
	60	Y=8.52X-2.34	0.79	7.3
	120	Y=13.38X-8.98	0.95	11.1
LBM-30	Control (+)	Y=5,34X+1,24	0.96	5.1
	10	Y=6,74X+0,24	0.92	5.1
	15	Y=5,27X+0,64	0.92	6.7
	30	Y=9,37X-3,22	0.94	7.5
	45	Y=7,78X-1,70	0.92	7.3
	60	Y=11,82X-6,01	0.98	8.5
LBM-41	120	Y=16,34X-11,84	0.98	10.7
	Control (+)	Y=4.26X+2.93	0.97	3.1
	10	Y=8.69X-1.33	0.9	5.3
	15	Y=6.64X-0.08	0.98	5.8
	30	Y=9.37X-3.22	0.95	7.5
LBM-146	45	Y=9.44X-2.71	0.99	6.6
	60	Y=10.48X-4.33	0.86	7.8
	120	Y=19.53X-14.55	0.87	10
	Control (+)	Y=4.54X+3.11	0.99	2.6
LBM-146	10	Y=3.27X+3.55	0.99	2.8
	15	Y=7.82X+0.82	0.99	3.4
	30	Y=8.71X-1.14	0.98	5.1
	45	Y=9.44X-2.71	0.98	6.6
	60	Y=10.48X-4.33	0.86	7.8
	120	Y=9.81X-3.71	0.98	9.5

irradiated *M. anisopliae* strains (control +). The Probit analysis had a good goodness of fit (R^2) as all values were greater than 0.70.

As the time of exposure to UV light increased, the TL50 of each of the tested strains increased. The intervals were between 2.6 - 11.1 d in all treatments, due to the affectation of the *Metarhizium* strains caused by the time of exposure to ultraviolet light. For reference, Gato-Cárdenas *et al.* (2017) calculated TL50 and TL90, where they obtained values between 1.5 and 7.95 d, and 4.01 and 16 d under optimal conditions. Strain LBM-146 presented the lowest TL50 at 120 minutes, the exposure time of highest incidence, in contrast to strains LBMa-11, LBM-30 and LBM-41. Thus, it proved to be the most virulent and could be a candidate for the development of a new insecticide product. Rojas-Gutiérrez *et al.* (2017) mentioned that differences in pathogenicity among *M. anisopliae* isolates may be related to their origin. Abiotic factors can limit the process and capacity of infection against pest insects. However, the expression of virulence-related factors, particularly through cuticle-degrading enzymes that destroy or modify the structural integrity of the host, inhibit its selective processes and interfere with its regulatory system. Furthermore, intermediate UV light resistance further benefits the effect of this fungus on *C. formicarius* and persistence in the field.

CONCLUSIONS

The results of this research showed that temperature and ultraviolet radiation affect the biocontrol efficiency of *Metarhizium anisopliae* against *Cylas formicarius*. In most cases at 32 and 34 °C radial growth was inhibited by 50 %. Exposure to UV light for 45 to 120 min negatively influenced strain growth and conidial germination. The percentage of cumulative mortality was variable among strains and treatments under the *in vitro* conditions tested. Strain LBMa-11 demonstrated to be the most tolerant to ultraviolet light and temperature. The irradiated strains did not decrease their lethal effect, although the increase in TL50 was notorious, which represented a delay in insecticidal activity.

REFERENCES

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology* 18: 265–267. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Chandra T KNP, Rahman SJ. 2016. Characterisation and evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin strains for their temperature tolerance. *Mycology* 7: 171–179. <https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1247116>
- Chandra T KNP, Rahman SJ. 2017. Effect of media pH on the growth of entomopathogenic fungi isolated from different rhizosphere soils. *International Journal of Bioassays* 6 (3): 5325–5327. <https://doi.org/10.21746/ijbio.2017.03.009>
- Fernandes EKK, Rangel DEN, Braga GUL, Roberts DW. 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics* 61: 427–440. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>
- Gato-Cárdenas Y, Márquez-Gutiérrez ME, Baró Y, Porrás A, Ulloa Y, Quesada Y. 2016. Caracterización de aislados cubanos del complejo de especies *Metarhizium anisopliae* con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Revista Protección Vegetal* 31: 50–56. <http://ref.scielo.org/bw4cgk> (Retrieved: September 2022).

- Gato-Cárdenas Y, Márquez-Gutiérrez ME, Baró Y, Calle-Osorno J. 2017. Detección de enzimas extracelulares en cepas cubanas del complejo *Metarhizium anisopliae* con acción entomopatogénica contra *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Actualidades Biológicas* 39 (106): 71–78. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v39n106a07>
- López-Lastra CC, Manfrino RG, Toledo AV. 2019. *Micopatología de artrópodos: hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: Buenos Aires, Argentina. 262 p.
- Márquez-Gutiérrez ME, Gato-Cárdenas Y, Leclerque A. 2016. El género *Metarhizium* Sorokin y su aplicación en el control de insectos plagas. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 5 (2): 1–13. <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/153> (Retrieved: September 2022).
- Márquez-Gutiérrez ME, Vázquez LL, Rodríguez MG, Ayala JL, Fuentes E, Ramos M, Hidalgo L, Herrera L. 2020. Biological control in Cuba. *In: Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future*. Van JC, Bueno VHP, Luna MG, Colmenarez YC. (eds.); CAB International: Wallingford, Oxfordshire, UK. pp: 176–193.
- Pereira-Junior RA, Huarte-Bonnet C, Paixão FRS, Roberts DW, Luz C, Pedrini N, Fernandes ÉKK. 2018. Riboflavin induces *Metarhizium* spp. to produce conidia with elevated tolerance to UV-B, and upregulates photolyases, laccases and polyketide synthases genes. *Journal of Applied Microbiology* 125 (1): 159–171. <https://doi.org/10.1111/jam.13743>
- Rangel DEN, Alder-Rangel A, Dadachova E, Finlay RD, Kupiec M, Dijksterhuis J, Braga GUL, Corrochano LM, Hallsworth JE. 2015. Fungal stress biology: a preface to the fungal stress responses special edition. *Current Genetics* 61: 231–238. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0500-3>
- Rezende JM, Rigueti Z AB, Da Silva L M, Delalibera Jr I, Rehner SA. 2015. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. *BioControl* 60: 495–505. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9656-5>
- Rojas-Gutiérrez RL, Loza-Murguía MG, VINO-NINA L, Serrano-Canaviri T. 2017. Capacidad biocontroladora de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de pulgones *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal Selva Andina* 8 (81): 48–68.
- Rodríguez I, Forim M, Silva M, Fernandes J, Filho A. 2016. Effect of ultraviolet radiation on fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, pure and encapsulated, and bioinsecticide action on *Diatraea saccharalis*. *Advances in Entomology* 4 (3): 151–162. <https://doi.org/10.4236/ae.2016.43016>
- Souza RKF, Azevedo RFF, Lobo AO, Rangel DEN. 2014. Conidial water affinity is an important characteristic for thermotolerance in entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology* 24 (4): 448–461. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.871223>
- Torres de la C M, Cortez M H, Ortiz G CF, Capello G S, De la Cruz P A. 2013. Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica* en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): 40–46. https://archivos.ujat.mx/2014/divulgacion%20cientifica/2014_articulos_para_divulgacion/51-Characterizacion-de-aislamientos-Magdiel.pdf (Retrieved: September 2022).

EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE CRECIMIENTO Y PATOGENICIDAD DE *Metarhizium anisopliae*

María Elena Márquez-Gutiérrez¹, Evelyn Pérez-Lezcano², Yamilé Baro-Robaina³, Francisco Paúl Gámez Vázquez⁴, César Aguirre-Mancilla⁵, Gerardo Armando Aguado-Santacruz^{4*}

¹ H52 México. Dr. Alvarado No. 59 entre Galiano y Mazatlán, Uruapan, Michoacán, México. C. P. 60050.

² LABIOFAM. Avenida Independencia km 16.5, Boyeros, Boyeros, Cuba. C. P. 10800.

³ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 entre 5ta B y 5ta F No. 514, Miramar, Cuba. C. P. 11300.

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Celaya, Guanajuato, México. C. P. 38110.

⁵ Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico Roque. Carretera Celaya-Juventino Rosas km 8, Celaya, Guanajuato, México. C. P. 38110.

* Autor para correspondencia: gaguados@gmail.com

RESUMEN

La eficacia de los hongos entomopatógenos en campo depende de la influencia de diversos factores ambientales, entre ellos la temperatura y el nivel de exposición a la luz UV. Se parte de la hipótesis de investigación que la temperatura y el nivel de exposición a la luz UV de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales, Clavicipitaceae) pueden afectar su eficiencia en el control del gorgojo de pico recto (*Cylas formicarius*, Fabricius; Coleóptera, Brentidae). El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la temperatura y la radiación de la luz ultravioleta en el crecimiento y la patogenicidad de diferentes cepas nativas de origen cubano del complejo *M. anisopliae* Sorokin con actividad biológica contra *C. formicarius*. El diámetro de la colonia se midió a 28, 30, 32 y 34 °C de temperatura y expuestos a luz ultravioleta (254 nm) por 10, 15, 20, 30, 60 y 120 minutos. Bajo condiciones de laboratorio se determinó el porcentaje de germinación de conidios de las cepas LBMA-11, LBM-30, LBM-41 y LBM-146, al igual que su capacidad patogénica por medio de bioensayos con adultos de *C. formicarius* en términos del porcentaje de mortalidad acumulada y del tiempo letal medio (TL50). Los resultados demostraron que la temperatura y la luz UV afectan la capacidad de *M. anisopliae* para controlar a *C. formicarius*. Se detectó un retardo en la mortalidad acumulada de todas las cepas expuestas a la luz ultravioleta, con un incremento en el TL50. El intervalo de temperatura óptimo se registró entre los 28 y 30 °C. La cepa LBM-127 mostró la mayor sensibilidad a la temperatura, LBMA-11 la mayor tolerancia a la luz UV, y LBM-146 fue la más virulenta de acuerdo con el análisis de regresión Probit.

Palabras clave: *Cylas formicarius*, temperatura, radiación ultravioleta.

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos pertenecientes al género *Metarhizium* Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) se consideran agentes de control biológico efectivos contra

Citation: Márquez-Gutiérrez ME, Pérez-Lezcano E, Baro-Robaina Y, Gámez-Vázquez FP, Aguirre-Mancilla C, Aguado-Santacruz GA. 2022. Efecto de la temperatura y la radiación ultravioleta sobre crecimiento y patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*. *Agrociencia*. 56(8): 1484-1506. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2477>

Editor in Chief:

Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: October 11, 2021.

Approved: August 25, 2022.

Published in *Agrociencia*:

December 20, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



un amplio espectro de órdenes de insectos (Rezende *et al.*, 2015). A nivel mundial se utilizan en la prevención y el manejo de diversas especies de insectos de interés agrícola (López-Lastra *et al.*, 2019).

En Cuba el uso de *Metarhizium* spp. inició desde 1980 con estudios de la fisiología y patogenicidad de aislados en condiciones *in vitro* y en campo contra plagas como *Cosmopolites sordidus* Germar, *Lissorhoptrus brevisrostris* Kuschel, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel y *Monecphora bicincta fraterna* Uhler. Estos resultados permitieron la selección de la cepa LBMa-11 de *Metarhizium anisopliae* para el control de *L. oryzophilus* y *Monecphora fraterna* en cultivos de arroz y pastos. Se llevó a cabo la implementación de tecnologías de producción masiva en los Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE), como estrategia para el control de insectos en los Programas de Manejo Integrado de Plagas en los cultivos (Márquez-Gutiérrez *et al.*, 2020).

Diferentes factores ambientales como la temperatura, la radiación solar, el pH y la humedad pueden limitar el desarrollo de *M. anisopliae*, lo cual constituye una de las desventajas para su aplicación en campo. La temperatura tiene influencia sobre la germinación de los conidios, el desarrollo y penetración del tubo germinativo, así como sobre su capacidad de colonización y reproducción (Pereira-Junior *et al.*, 2018). La evaluación de las tasas de crecimiento, esporulación y germinación en relación con la temperatura es importante para llevar a cabo una selección eficiente de aislados de *Metarhizium* spp. con potencial de biocontrol (Torres *et al.*, 2013).

La radiación solar tiene incidencia directa en la supervivencia y eficiencia como agente de biocontrol de este hongo, además de tener un papel fundamental en su permanencia sobre los cultivos tratados. La luz ultravioleta afecta el crecimiento de *Metarhizium* spp. en función de la intensidad de la energía recibida y el tiempo de exposición, los cuales pueden limitar o retardar la germinación de los conidios por daños genéticos directos (mutaciones) o indirectos (López-Lastra *et al.*, 2019).

Investigaciones recientes sobre *Cylas formicarius*, un coleóptero que afecta la productividad de diversos cultivos de importancia económica, en particular la del boniato (*Ipomoea batatas*), se enfocan en el estudio de los factores abióticos que influyen en el crecimiento y desarrollo del hongo. Se busca seleccionar cepas con mayor potencial para el control biológico de plagas y que puedan adaptarse a condiciones ambientales diferentes para asegurar su persistencia y eficacia en condiciones de campo.

La hipótesis de investigación asume que la temperatura y el nivel de exposición a la luz UV de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales, Clavicipiceae) pueden afectar su eficiencia en el control del gorgojo de pico recto (*Cylas formicarius*, Fabricius; Coleóptera, Brentidae). El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la temperatura y el nivel de exposición a la luz ultravioleta sobre el crecimiento y la patogenicidad de cepas nativas de origen cubano del complejo *Metarhizium anisopliae* Sorokin con actividad biológica contra *Cylas formicarius*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron las cepas LBM-5, LBM-10, LBMa-11, LBM-12, LBM-30, LBM-41, LBM-42, LBM-46, LBM-146 y LBM-267 pertenecientes al complejo de cepas de *Metarhizium ani-*

sopliae de la colección de microorganismos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba. Estas cepas se aislaron a partir de insectos de los órdenes Hemíptera, Lepidóptera y Coleóptera. En particular, LBMA-11 es la de mayor uso al haberse utilizado para el control de numerosas plagas bajo un programa de producción masiva de bioplaguicidas en Cuba (Márquez-Gutiérrez *et al.*, 2016).

Reactivación de las cepas de *Metarhizium anisopliae*

Las cepas se conservaron en aceite mineral y se reactivaron por medio de reinoculación en insectos hospedantes con el fin de potenciar la acción entomopatogénica de cada una. Se transfirieron a placas de Petri con medio completo (MC) (Torres *et al.*, 2013) y se incubaron a 25 ± 2 °C de temperatura por 10 d hasta la esporulación completa de los cultivos. Después, se realizaron diluciones decimales con agua destilada estéril y Tween 80 al 0.1 % para preparar suspensiones conidiales a una concentración de 10^7 conidios mL⁻¹; para la reinoculación de los insectos se utilizaron 10 adultos jóvenes de segunda generación de *C. formicarius* procedentes de una cría de laboratorio mantenida en el INISAV a una temperatura de 28-30 °C y humedad relativa de 85 %. Los insectos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.1 % durante 1 minuto, se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril y se sumergieron de 30 a 50 s en la suspensión conidial de cada una de las cepas preparadas anteriormente. Los insectos tratados se colocaron en placas de Petri con fragmentos de boniato como dieta natural. Las placas se incubaron a 25 ± 2 °C en la oscuridad y se revisaron diario hasta observar la emersión y esporulación del hongo. Los insectos micosados se reaislaron en placas de MC suplementado con rosa de bengala (0.5 g L⁻¹) y cloranfenicol (0.05 g L⁻¹), y se colocaron en cámara húmeda. Se obtuvieron cultivos monoconidiales, que fueron transferidos a tubos de ensayo con MC y se conservaron a 4 °C (10 réplicas por aislado) para la ejecución de los ensayos.

Evaluación de la temperatura sobre las colonias de *M. anisopliae*

La tasa de crecimiento de las cepas de *M. anisopliae*, con excepción de la cepa LBM-42, se determinó a diferentes temperaturas. Se prepararon suspensiones de conidios para cada cultivo monoconidial en concentración de 10^7 conidios mL⁻¹. Se tomó 0.1 mL de cada suspensión, se realizó siembra superficial por medio de espátula de Drigalski. A continuación, se incubaron a 26 °C y, a las 72 h, se extrajeron discos de 4 mm que fueron transferidos al centro de placas de Petri (de 9 cm de diámetro) con medio de cultivo MC y se incubaron a temperaturas de 28, 30, 32 y 34 °C. El diámetro de las colonias se midió hasta los 10 d de crecimiento y se consideraron cinco réplicas por cada cepa.

Evaluación de la luz ultravioleta sobre *M. anisopliae*

El efecto de la luz ultravioleta sobre el crecimiento y las características culturales de las cepas de *M. anisopliae* se evaluó a través de porciones circulares de cultivos sin esporular, las cuales fueron obtenidos por medio de un horador de 5 mm de diámetro y colocados en el centro de placas de Petri. Las placas inoculadas se expusieron a la luz

ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm y a una distancia de 15 cm de altura en el gabinete de seguridad biológica, durante 10, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos, se consideraron cuatro réplicas por cada variante y un tratamiento control sin exposición a UV. Después se incubaron a 25 ± 2 °C de temperatura y se realizó la prueba de viabilidad por emisión de tubo germinativo.

Por cada réplica se obtuvieron porciones circulares que se depositaron en 5 mL de agua con Tween 80. A continuación, se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-4} para el conteo en cámara de Neubauer con el fin de determinar la concentración de conidios en los tiempos de exposición a la luz UV considerados. Se sembraron 0.01 mL de la dilución seleccionada en medio de cultivo MC en cámara húmeda y se incubó a 25 ± 2 °C durante 24 h. La viabilidad de las cepas se determinó por observación al microscopio óptico de la emisión del tubo germinativo; se consideró como germinado y viable donde el conidio desarrolló filamentos de hifas alrededor, y no germinado donde se observaron estructuras de conidios visiblemente esféricos sin extensiones laterales. Por último, se llevaron a cabo registros (tres por cada cepa) y se calculó el porcentaje de conidios germinados.

Evaluación de la patogenicidad de las cepas de *M. anisopliae*

La evaluación de la patogenicidad de las cepas de *M. anisopliae* expuestas a la luz UV se realizó en 70 adultos de *C. formicarius* procedentes de una cría de laboratorio. Los insectos se desinfectaron a través del mismo procedimiento desarrollado para la reactivación de cepas y se separaron en siete grupos, cada uno con 10 insectos. A partir de las cepas de *M. anisopliae* irradiadas con luz UV y de otro grupo de cepas no irradiadas (control +) se prepararon suspensiones que se ajustaron a la concentración de 10^7 conidios mL⁻¹ por cada tratamiento. Los insectos se sumergieron en las suspensiones conidiales durante 50 s, excepto los insectos del grupo control a los cuales no se les inoculó el microorganismo.

Después, se colocaron en papel de filtro para eliminar el exceso de humedad y se introdujeron en placas de Petri con la dieta natural a base de boniato, previamente desinfectada. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y se cuantificaron diario los insectos vivos y muertos para calcular el porcentaje de mortalidad acumulada, según la fórmula de Abbott (1925). Para evaluar el efecto del tratamiento en la capacidad de biocontrol de las cepas, al término del bioensayo los insectos muertos que mostraron formación y emisión de micelio incipiente se colocaron en cámara húmeda e incubaron a 25 ± 2 °C de temperatura para recuperar y cotejar la identidad del microorganismo.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó Statistica v. 8.0. La prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para todas las variables y la prueba de homogeneidad de varianza. La prueba paramétrica de Newman-Keuls se utilizó para realizar la comparación de medias entre los tratamientos. Por medio de ecuaciones de regresión Probit se determinó TL50 para expresar la correlación entre el porcentaje de mortalidad acumulada y el tiempo de exposición a la luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las colonias de *Metarhizium anisopliae*

Las cepas LBM-5, LBM-10, LBMA-11, LBM-12, LBM-30, LBM-41, LBM-127, LBM-146 y LBM-267 de *M. anisopliae* desarrolladas en medio de cultivo MC a las temperaturas de 28, 30, 32 y 34 °C presentaron un comportamiento similar a lo reportado por Gato-Cárdenas *et al.* (2016) en medio Agar Dextrosa Saboraud (SDA). Rodríguez *et al.* (2016) indicaron que la temperatura afecta a los hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* al incidir en su metabolismo y alterar los procesos de producción de enzimas, toxinas, germinación de conidios, emisión del tubo germinativo, mecanismo de acción, colonización y reproducción en el nicho ecológico. Este efecto fue evidente en el diámetro de crecimiento cuantificado en las colonias de las distintas cepas de *M. anisopliae* (Figura 1).

La temperatura óptima de crecimiento estuvo entre 28 y 30 °C para estas cepas nativas que fueron aisladas a partir de insectos colectados en diferentes zonas agrícolas de Cuba (Figura 1). Otros autores mencionaron un óptimo de crecimiento entre 25 y 30 °C para diferentes cepas de *M. anisopliae* aisladas en regiones tropicales del estado de Veracruz, México (Torres *et al.*, 2013). En nuestro estudio, 32 y 34 °C de temperatura resultaron desfavorables en el crecimiento de todas las cepas evaluadas; en particular, LBM-5, LBM-12, LBM-41, LBM-127, LBM-146 y LBM-267 fueron especialmente sensibles a los 34 °C ($p \leq 0.05$). Se ha señalado que la mayor parte de los hongos entomopatógenos son mesófilos con un crecimiento entre 10 y 40 °C y un óptimo entre 25 y 35 °C (Chandra y Rahman, 2016).

Las cepas tratadas a 34 °C tuvieron una disminución notable del crecimiento. Asimismo, esta temperatura limitó a las cepas LBM-41 y LBM-267, con crecimiento única-

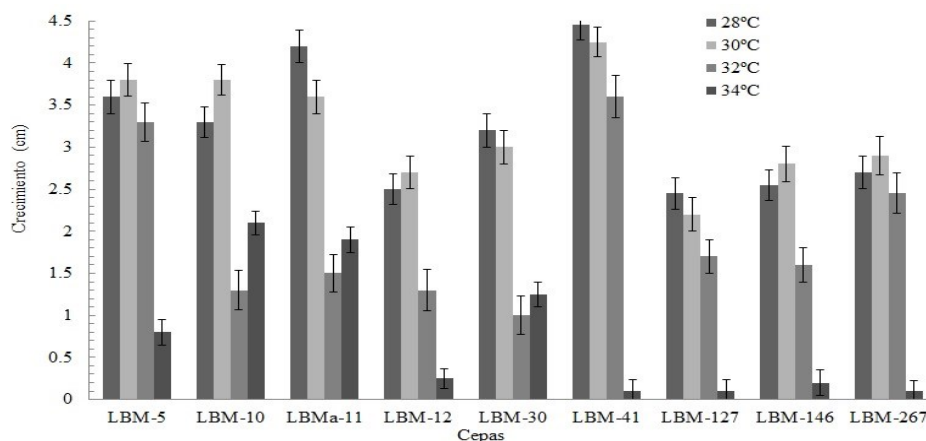


Figura 1. Crecimiento de diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae* a las temperaturas de 28, 30, 32 y 34 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cada cepa según la prueba de Newman-Keuls ($p \leq 0.05$).

mente en los márgenes del disco inoculado en el agar. Chandra y Rahman (2017) evaluaron cuatro aislados rizosféricos de *M. anisopliae* en India, y encontraron un mayor crecimiento de las cepas a 30 °C, con un retardo a partir de 35 °C, valores que están en conformidad con los resultados alcanzados en este estudio. Una gran variabilidad genética en la termotolerancia de *Metarhizium* spp. fue evidenciada por Rangel *et al.* (2015), no sólo en la capacidad de crecimiento micelial, sino también en cuanto a su potencial de germinación conidial, característica vinculada directamente con la virulencia de las cepas.

La tolerancia térmica diferencial de este hongo radica en la composición de su pared celular. Souza *et al.* (2014) refirieron que la tolerancia de la germinación conidial a temperaturas superiores a 30 °C está relacionada estrechamente con la presencia de proteínas hidrofóbicas en la pared celular de los conidios que protegen al hongo contra el estrés térmico. Se ha demostrado que la temperatura, además de incidir en la tasa de crecimiento, influye en las características culturales de *M. anisopliae*, como el patrón de esporulación, pigmentación del medio de cultivo y la morfología de la colonia (Gato-Cárdenas *et al.*, 2016).

Las características culturales de la cepa LBM-127 con 10 d de incubación a diferentes temperaturas mostraron diferencias muy evidentes (Figura 2). A 28 °C exhibió una colonia algodonosa en el centro, de color blanco, abundante micelio aéreo, esporulación incipiente en el centro de color verde olivo claro, margen micelial blanco y el reverso de la colonia fue de color amarillo claro con bordes regulares; además, produjo pigmentos que fueron exudados al medio de cultivo. A 30 °C la colonia se tornó blanca algodonosa con abundante micelio aéreo, con esporulación difusa y margen micelial blanco; en el reverso de la colonia, su coloración y bordes no variaron. A 32 °C mantuvo la misma textura, pero la esporulación difusa fue de color verde olivo sin otro cambio por destacar.

En concordancia con nuestros resultados, Chandra y Rahman (2017) demostraron que la respuesta a la temperatura es una característica importante no sólo en la selección, sino en la reproducción de los hongos entomopatógenos y su capacidad de crecimiento que pueden relacionarse con su origen y acervo genético.

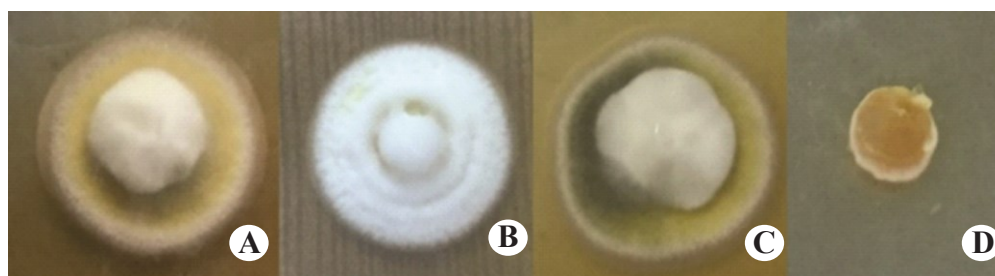


Figura 2. Características culturales de la cepa LBM-127 de *Metarhizium anisopliae* en medio MC a las temperaturas evaluadas después de 10 días de incubación. A: 28 °C, B: 30 °C, C: 32 °C y D: 34 °C.

Efecto de la luz ultravioleta sobre el crecimiento de *M. anisopliae*

Los resultados del análisis estadístico arrojaron diferencias significativas entre algunos de los tiempos de exposición a luz ultravioleta en las cepas evaluadas, con excepción de la cepa LBMa-11 que no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). En las cepas LBM-30 y LBM-41 hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a partir de los 60 y 120 minutos de exposición, respectivamente, mientras que la cepa LBM-146 sólo manifestó diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre los valores extremos de exposición a UV (10 y 120 minutos) (Cuadro 1). A medida que aumentó el tiempo de exposición a la luz ultravioleta se redujo la cantidad de conidios germinados por campo. Esto indicó una disminución gradual en el porcentaje de germinación de los conidios en las cepas evaluadas.

La literatura informa gran variación de los hongos entomopatógenos ante la luz UV, aún cuando existen aislamientos muy sensibles a dosis altas de radiación, las cuales provocan la mortalidad total de los conidios; la respuesta depende del aislado. Rangel *et al.* (2015) demostraron que la luz ultravioleta incide en el crecimiento y la manifestación de los caracteres morfológicos de *Metarhizium*, una longitud de onda de 254 nm inhibió la germinación de los conidios con daños directos e indirectos en el ADN. El ensayo de germinación de las cepas mostró la presencia de conidios con elongación del tubo germinativo y formación de filamentos laterales, lo cual indicó su viabilidad. Sin embargo, se pudo notar que a mayor tiempo de exposición a la luz ultravioleta se redujo el número de conidios por campo. Esto representó una disminución gradual en el porcentaje de germinación de las cepas. En las cepas LBMa-11 y LBM-146 se obtuvo un porcentaje de germinación de conidios de 65 y 69 % en el mayor tiempo de exposición; la afectación menor se encontró en la cepa LBM-30 con un 87 % de germinación de conidios. La cepa LBMa-11 (con 10 minutos de exposición), LBM-41 (desde 10 hasta 45 minutos de exposición), y la cepa LBM-30 en todos los tratamientos (excepto 120 minutos) mostraron un porcentaje de germinación de conidios superior al 90 %.

Esta característica es muy deseable en el ámbito agronómico, ya que el desarrollo rápido del tubo germinativo de los conidios en los hongos entomopatógenos favorece el proceso de infección e incide, en consecuencia, en el tiempo de exposición a factores ambientales adversos cuando se aplican en condiciones de campo.

Cuadro 1. Diámetro de las cepas de *Metarhizium anisopliae* (DC) y porcentaje de germinación de conidios (G) en los diferentes tiempos de exposición a luz UV.

Cepas	Tiempo de exposición (minutos)													
	0		10		15		30		45		60		120	
	DC	G	DC	G	DC	G	DC	G	DC	G	DC	G	DC	G
LBMa-11	7.77a [†]	96	7.72a	90	7.12a	88	7.52a	77	7.02a	72	7.52a	70	7.97a	65
LBM-30	5.50a	100	5.27a	98	5.40a	98	5.30a	95	5.40a	95	4.55b	90	5.87c	87
LBM-41	6.65a	99	6.52a	97	6.52a	91	6.65a	91	6.40a	90	6.35a	87	7.10b	80
LBM-146	4.22ab	98	4.02b	88	4.77a	86	4.35ab	80	4.20ab	73	4.17ab	70	4.98a	69

[†] Letras diferentes indican diferencias significativas entre filas en los valores de DC de cada cepa, según la prueba de Newman-Keuls ($p \leq 0.05$).

Ambos daños interfieren en la replicación del ADN al provocar mutaciones y hasta la muerte celular, en dependencia de la intensidad de energía y del tiempo de exposición. Se hace notar que la coloración verde olivo de la cepa LBM-146 cambió a amarillo a diferencia de la cepa control, que mantuvo la coloración verde olivo intenso a los 10 d de incubación, típico de algunas cepas cultivadas en condiciones adecuadas de crecimiento.

En términos generales, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rodríguez *et al.* (2016), quienes obtuvieron una reducción del crecimiento de cepas de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* al ser expuestas a luz ultravioleta. La resistencia a la luz ultravioleta puede estar dada por un complejo de genes influenciados por factores ambientales. Entre ellos se incluyen los relacionados con la síntesis de pigmentos como melanina y carotenoides, localizados sobre la superficie celular, que pueden bloquear la radiación. También se incluyen las enzimas destoxicantes que inactivan sustancias tóxicas y mutagénicas tales como radicales libres, y otras enzimas y proteínas involucradas en la reparación del daño causado por la radiación. Fernandes *et al.* (2015) encontraron que el origen geográfico y el hospedante son importantes, ya que en latitudes bajas los hongos entomopatógenos son más resistentes a la radiación.

La manifestación de tolerancia, según Fernandes *et al.* (2015), puede reflejar un cambio adaptativo a las condiciones ambientales. En nuestro estudio, la cepa LBMa-11, resultó ser la más termotolerante, factor que en condiciones de campo influye en el mecanismo de acción de los hongos y llega a afectar su persistencia. Esta característica puede explicar, entre otros aspectos, la eficacia alcanzada en campo por esta cepa y su aplicación extensiva para la disminución de insectos plaga en Cuba (Márquez *et al.*, 2016).

Evaluación de la patogenicidad de las cepas de *M. anisopliae* expuestas a radiación UV contra *Cylas formicarius*

La evaluación de las cepas de *M. anisopliae* expuestas a los tratamientos de luz UV en el bioensayo para determinar la afectación de su capacidad patogénica sobre *C. formicarius* indicó que las cepas irradiadas del hongo mostraron un porcentaje de mortalidad acumulada muy variable entre ellas y entre tratamientos (Figura 3).

Las cepas irradiadas, así como las no irradiadas (control +), redujeron el número de insectos vivos a partir del tercer día después de la inoculación y entre los 4 y 14 d, a diferencia de los insectos no tratados con *M. anisopliae* (control -) que permanecieron vivos.

Se alcanzaron porcentajes de mortalidad de 100 en los insectos tratados con las cepas expuestas y no expuestas a luz UV. Sin embargo, esta acción se observó más rápido en los insectos infestados con las cepas no irradiadas con luz UV, y en particular fue evidente en las cepas LBM-146 y LBM-41. Ningún tiempo de exposición a luz UV con longitud de onda igual a 254 nm considerada en este estudio anuló la capacidad patogénica de las cepas de *M. anisopliae*, lo cual indica que podrían existir otros factores relacionados con la virulencia, como la actividad enzimática que interviene en el

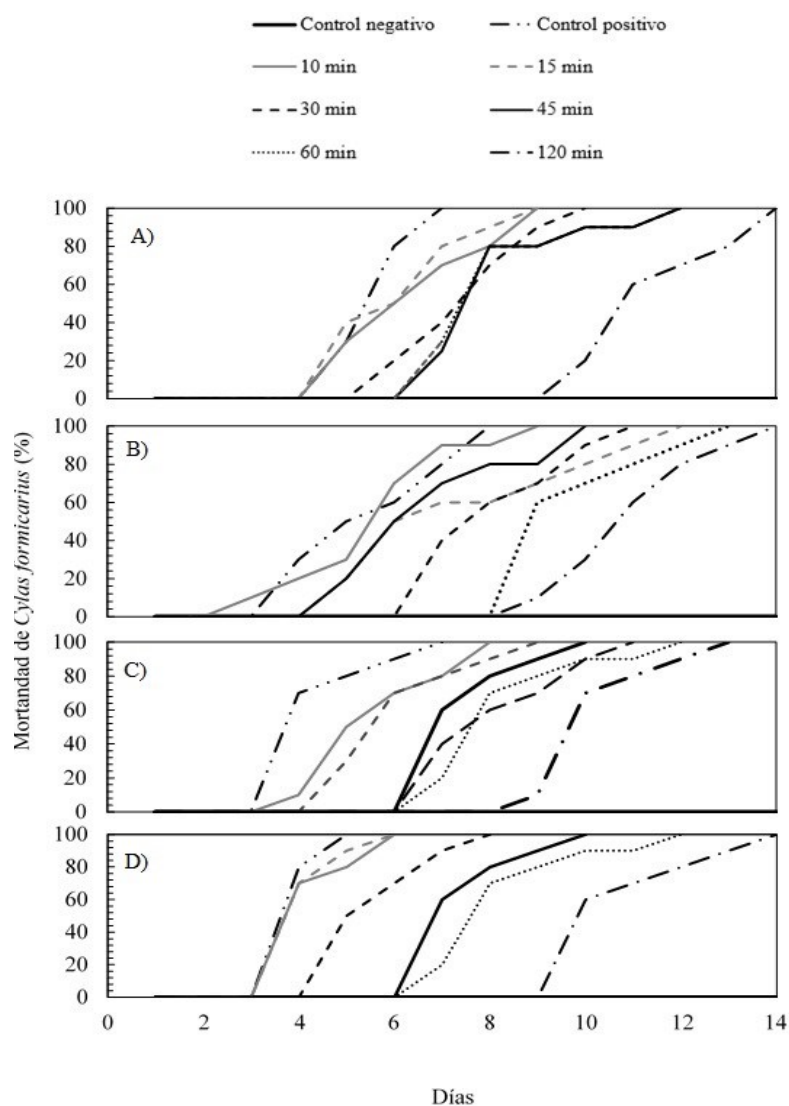


Figura 3. Porcentaje de mortalidad acumulada durante el bioensayo con las cepas de *Metarhizium anisopliae* expuestas a luz UV de 254 nm. A: LBMa-11, B: LBM-30, C: LBM-41, D: LBM-146.

proceso de degradación de la cutícula de los insectos. Sin embargo, se afectó la eficiencia de la acción biológica en relación con los tiempos en los cuales se obtuvieron los porcentajes más altos de mortalidad. El retraso en la acción biológica puede deberse a que la cantidad de inóculo de conidios viables disminuyó con el tiempo de exposición a la luz UV, como pudo haber ocurrido en los tratamientos de 45, 60 y 120 minutos. Los valores de TL50 obtenidos por medio de la evaluación de la correlación tiempo-mortalidad de cada uno de los tratamientos a la luz ultravioleta (Cuadro 2), indicaron que el menor TL50 correspondió a las cepas de *M. anisopliae* no irradiadas (control +).

Cuadro 2. Relación entre tiempo de exposición a radiación UV y mortalidad de las cepas de *Metarhizium anisopliae*.

Cepa	Tratamiento	Ecuación	R ²	TL50
LBMa-11	Control (+)	Y=17.25X-7.58	0.99	5.4
	10	Y=6.82X-0.29	0.99	6
	15	Y=7.93X-0.93	0.95	5.6
	30	Y=12.10X-5.36	0.99	7.2
	45	Y=4.88X+1.5	0.96	5.2
	60	Y=8.52X-2.34	0.79	7.3
	120	Y=13.38X-8.98	0.95	11.1
LBM-30	Control (+)	Y=5,34X+1,24	0.96	5.1
	10	Y=6,74X+0,24	0.92	5.1
	15	Y=5,27X+0,64	0.92	6.7
	30	Y=9,37X-3,22	0.94	7.5
	45	Y=7,78X-1,70	0.92	7.3
	60	Y=11,82X-6,01	0.98	8.5
	120	Y=16,34X-11,84	0.98	10.7
LBM-41	Control (+)	Y=4.26X+2.93	0.97	3.1
	10	Y=8.69X-1.33	0.9	5.3
	15	Y=6.64X-0.08	0.98	5.8
	30	Y=9.37X-3.22	0.95	7.5
	45	Y=9.44X-2.71	0.99	6.6
	60	Y=10.48X-4.33	0.86	7.8
	120	Y=19.53X-14.55	0.87	10
LBM-146	Control (+)	Y=4.54X+3.11	0.99	2.6
	10	Y=3.27X+3.55	0.99	2.8
	15	Y=7.82X+0.82	0.99	3.4
	30	Y=8.71X-1.14	0.98	5.1
	45	Y=9.44X-2.71	0.98	6.6
	60	Y=10.48X-4.33	0.86	7.8
	120	Y=9.81X-3.71	0.98	9.5

El análisis de Probit tuvo una buena bondad de ajuste (R²) ya que todos los valores resultaron superiores a 0.70.

A medida que aumentó el tiempo de exposición a la luz ultravioleta se incrementaron los TL50 de cada una de las cepas ensayadas. Los intervalos se ubicaron entre 2.6 - 11.1 d en todos los tratamientos, debido a la afectación de las cepas de *Metarhizium* provocada por el tiempo de exposición a la luz ultravioleta. Como referencia, Gato-Cárdenas *et al.* (2017) calcularon los TL50 y TL90, donde obtuvieron valores entre 1.5 y 7.95 d, y 4.01 y 16 d bajo condiciones óptimas.

La cepa LBM-146 presentó el menor TL50 a los 120 minutos, tiempo de exposición de mayor incidencia, a diferencia de las cepas LBMa-11, LBM-30 y LBM-41. Por esta razón demostró ser la más virulenta y podría ser candidata para la obtención y desarrollo de un nuevo producto insecticida. Rojas-Gutiérrez *et al.* (2017) mencionaron que las diferencias en patogenicidad entre aislados de *M. anisopliae* pueden estar relacionadas con su origen. Los factores abióticos pueden limitar el proceso y capacidad de

infección contra los insectos plaga. Sin embargo, la expresión de factores relacionados con la virulencia, en particular a través de enzimas degradadoras de la cutícula que destruyen o modifican la integridad estructural del hospedante, inhiben sus procesos selectivos e interfieren con su sistema regulatorio. Además, la resistencia intermedia a la luz UV beneficia aún más el efecto de este hongo sobre *C. formicarius* y la persistencia en el campo.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación mostraron que la temperatura y la radiación ultravioleta afectan la eficiencia del biocontrol de *Metarhizium anisopliae* contra *Cylas formicarius*. En la mayoría de los casos a 32 y 34 °C se inhibió el crecimiento radial en un 50 %. La exposición a la luz ultravioleta de 45 a 120 minutos influyó negativamente en el crecimiento de las cepas y la germinación de los conidios. El porcentaje de mortalidad acumulada fue variable entre las cepas y los tratamientos bajo las condiciones *in vitro* ensayadas. La cepa LBMa-11 fue la más tolerante a la luz ultravioleta y a la temperatura. Las cepas irradiadas no disminuyeron su efecto letal, aunque fue notorio el incremento en los TL50, lo cual representó un retardo de la actividad insecticida.

REFERENCIAS

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology* 18: 265–267. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Chandra T KNP, Rahman SJ. 2016. Characterisation and evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin strains for their temperature tolerance. *Mycology* 7: 171–179. <https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1247116>
- Chandra T KNP, Rahman SJ. 2017. Effect of media pH on the growth of entomopathogenic fungi isolated from different rhizosphere soils. *International Journal of Bioassays* 6 (3): 5325–5327. <https://doi.org/10.21746/ijbio.2017.03.009>
- Fernandes EKK, Rangel DEN, Braga GUL, Roberts DW. 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics* 61: 427–440. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>
- Gato-Cárdenas Y, Márquez-Gutiérrez ME, Baró Y, Porras A, Ulloa Y, Quesada Y. 2016. Caracterización de aislados cubanos del complejo de especies *Metarhizium anisopliae* con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Revista Protección Vegetal* 31: 50–56. <http://ref.scielo.org/bw4cgk> (Recuperado: septiembre 2022).
- Gato-Cárdenas Y, Márquez-Gutiérrez ME, Baró Y, Calle-Osorno J. 2017. Detección de enzimas extracelulares en cepas cubanas del complejo *Metarhizium anisopliae* con acción entomopatógena contra *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Actualidades Biológicas* 39 (106): 71–78. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v39n106a07>
- López-Lastra CC, Manfrino RG, Toledo AV. 2019. Micopatología de artrópodos: hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: Buenos Aires, Argentina. 262 p.
- Márquez-Gutiérrez ME, Gato-Cárdenas Y, Leclerque A. 2016. El género *Metarhizium* Sorokin y su aplicación en el control de insectos plagas. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 5 (2): 1–13. <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/153> (Recuperado: septiembre 2022).
- Márquez-Gutiérrez ME, Vázquez LL, Rodríguez MG, Ayala JL, Fuentes E, Ramos M, Hidalgo L, Herrera L. 2020. Biological control in Cuba. *In: Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future*. Van JC, Bueno VHP, Luna MG, Colmenarez YC. (eds.); CAB International: Wallingford, Oxfordshire, UK. pp: 176–193.

- Pereira-Junior RA, Huarte-Bonnet C, Paixão FRS, Roberts DW, Luz C, Pedrini N, Fernandes ÉKK. 2018. Riboflavin induces *Metarhizium* spp. to produce conidia with elevated tolerance to UV-B, and upregulates photolyases, laccases and polyketide synthases genes. *Journal of Applied Microbiology* 125 (1): 159–171. <https://doi.org/10.1111/jam.13743>
- Rangel DEN, Alder-Rangel A, Dadachova E, Finlay RD, Kupiec M, Dijksterhuis J, Braga GUL, Corrochano LM, Hallsworth JE. 2015. Fungal stress biology: a preface to the fungal stress responses special edition. *Current Genetics* 61: 231–238. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0500-3>
- Rezende JM, Riguetti Z AB, Da Silva L M, Delalibera Jr I, Rehner SA. 2015. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. *BioControl* 60: 495–505. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9656-5>
- Rojas-Gutiérrez RL, Loza-Murguía MG, Vино-Nina L, Serrano-Canaviri T. 2017. Capacidad biocontroladora de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de pulgones *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal Selva Andina* 8 (81): 48–68.
- Rodríguez I, Forim M, Silva M, Fernandes J, Filho A. 2016. Effect of ultraviolet radiation on fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, pure and encapsulated, and bioinsecticide action on *Diatraea saccharalis*. *Advances in Entomology* 4 (3): 151–162. <https://doi.org/10.4236/ae.2016.43016>
- Souza RKF, Azevedo RFF, Lobo AO, Rangel DEN. 2014. Conidial water affinity is an important characteristic for thermotolerance in entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology* 24 (4): 448–461. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.871223>
- Torres de la C M, Cortez M H, Ortiz G CF, Capello G S, De la Cruz P A. 2013. Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica* en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): 40–46. https://archivos.ujat.mx/2014/divulgacion%20cientifica/2014_articulos_para_divulgacion/51-Characterizacion-de-aislamientos-Magdiel.pdf (Recuperado: septiembre 2022).

GRAIN YIELD STABILITY AND BIOCHEMICAL NUTRIENT CONTENT IN WHITE CORN EXPERIMENTAL CROSSES

Francisco Javier **Sánchez-Ramírez**¹, Ma. del Carmen **Mendoza-Castillo**^{2*}, Carmen Gabriela **Mendoza-Mendoza**², Adriana **Delgado-Alvarado**³, Etzael **Núñez-Terrones**²

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25315.

² Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56264.

³ Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla No. 205, Santiago Momoxplan, San Pedro Cholula, Puebla, México. C. P. 72760.

* Author for correspondence: camen@colpos.mx

ABSTRACT

In Mexico, about half of white corn production is used for human consumption. In a breeding program, in addition to increasing the yield and genotypes stability, the aim is to improve grain quality. Assuming that there is genetic variation among the elite genotypes evaluated in this research, at least one genotype was considered to be outstanding for its high productive potential and desirable characteristics for grain quality. The objective of this work was to determine the genetic variation present in experimental hybrids in terms of yield potential and grain quality, as well as to identify the most outstanding genotypes.

In 2016, twenty white corn experimental crosses were evaluated under a randomized block design with three replications in two locations of the ecological area of the High Valleys of Mexico and one location in a transitional area. Yield stability was determined using the additive main effects and multiplicative interaction model. Grain quality was evaluated through starch, protein and oil content. Most of the crosses had higher yield and stability than the controls (commercial hybrids). Likewise, nutrient content varied among them for each biochemical compound; oil concentration ranged from 3.5 to 6.4 g 100 g⁻¹ dry matter (ms); protein, from 5.5 to 9.8 g 100 g⁻¹ ms; and starch, from 72.6 to 96.6 g 100 g⁻¹ ms.

Based on their phenotypic stability, yield and grain quality, we observed that crosses 1213, 1217, 1218, 1314, 1418, and 1812 were outstanding, which can be used to produce grain with promising starch and oil content. In general, we infer that the crosses showed potential for starch utilization and tortilla production.

Keywords: *Zea mays* L., phenotypic stability, grain quality.

INTRODUCTION

Because of its high carbohydrate content, corn is one of the three main sources of energy for the world population (Serna-Saldivar and Perez, 2019). In Mexico, it is the most produced (24.2 million tons) and consumed (25.0 million tons) cereal (SIAP, 2019).

Citation: Sánchez-Ramírez FJ, Mendoza-Castillo MC, Mendoza-Mendoza CG, Delgado-Alvarado A, Núñez-Terrones E. 2022. Grain yield stability and biochemical nutrient content in white corn experimental crosses. *Agrociencia*. 56(8): 1507-1532. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2423>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: August 31, 2021.
Approved: November 08, 2022.
Published in Agrociencia:
January 16, 2023.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



It is reported that 49 % of the national white corn production is destined for human consumption (SIAP, 2020), particularly as tortillas, the main element of the Mexican diet (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014). Corn kernels are mainly composed of carbohydrates, proteins and lipids (Arendt and Zannini, 2013). Among the carbohydrates present in this grain, starch represents about 85 % of the total weight of the endosperm and 72 % of the total weight of the grain.

Worldwide, corn is the largest commercial source of starch and is the basis for the production of a large number of chemically, enzymatically, and physically modified functional products, as well as hydrolyzed maltodextrins and syrups. Recently, non-gelatinized native corn starch has been shown to be a source of slowly digested starch, which stands out for its glycemic index (Hamaker *et al.*, 2019). In addition, it has gained importance for its use in the preparation of gluten-free foods (Serna-Saldivar and Perez, 2019).

The endosperm is also made up of protein (between 8 and 15%), and is the second most abundant biomolecule in the kernel. Zein constitutes 60 to 70 % of endosperm protein. It is not an ideal nutrient for humans, but due to its abundance, hydrophobicity and price, it is valuable for its wide range of industrial applications, such as the production of plasticizers, coatings, fibers, inks and moldings. Nutritionally, QPM (quality protein maize) corns have improved protein quality with respect to essential amino acids, such as lysine and tryptophan, which has increased their nutritional value (Arendt and Zannini, 2013). Although corn is not considered an oilseed, as it has only 3-6% oil, it is important as a by-product of the wet milling process (Wang and White, 2019). In the case of tortilla making, there is evidence that oil can confer desirable characteristics such as softness, flexibility and chewiness (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014).

In Mexico, the demand for white corn is covered by domestic production, which represents 86 % of the total grain produced (SIAP, 2019). This sufficiency of white corn has been achieved through the optimization of agronomic practices and genetic improvement. However, although there are precedents in the country on grain quality improvement (CIMMYT, 2017), until a few years ago breeding was mainly focused on increasing grain yield and less work was done to improve grain quality. Recently, Serna-Saldivar and Perez (2019) have reported that native maize populations represent a valuable genetic resource to increase the grain quality and nutritional content.

The incorporation of native maize in the genetic improvement programs of national public research institutions has also been evidenced, generating genotypes with outstanding nutritional characteristics such as starch, oil and protein content (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2018).

Based on the above, it is considered of utmost necessity to characterize the biochemical nutritional content of the genetic material of the current breeding programs in order to know its variation, potential for utilization and to define breeding strategies.

In Mexico, 94 % of the improved seed used for maize crop establishment is obtained from private transnational companies (Luna-Mena *et al.*, 2012). Although production can supply the demand for grain, genetic improvement is still required to supply

seeds at a lower cost, with competitive yields and grain quality for tortilla production (one of its main uses). Therefore, this research evaluated germplasm obtained from a maize breeding program by hybridization for the High Valleys of Mexico, whose main objectives were: increase grain yield, generate rustic genotypes (low fertilization doses, scarce humidity and minimal cultivation work), and improve grain quality, the latter carried out in a non-systematized sensory way.

The evaluation was carried out to test the existence of genetic variation among the elite genotypes studied, and consequently identify at least one outstanding genotype for its high productive potential and desirable characteristics for grain quality. Thus, the potential of the outstanding experimental crosses for grain yield was determined in different locations and compared to commercial hybrids. Their quality was characterized through the quantification of starch, protein, and oil in order to detect suitable crosses for the production of food for human consumption.

MATERIALS AND METHODS

Germplasm

At the Plant Genetic Resources Program from Colegio de Postgraduados, Mexico, we evaluated ten inbred lines (S_6) that were donated by Dr. Moisés Mendoza Rodríguez† and derived from a maize breeding program developed for the High Valleys.

These lines were formed from broad-based populations that were obtained from variants of the Chalqueño and Cónico landraces; they were selected under rustic production conditions and were characterized by their outstanding attributes (ear weight, 100 kernel weight, ear diameter and ear length) for grain yield. From these lines, all the possible direct and reciprocal crosses were formed, which were evaluated agronomically in 2014. From them, in 2016, twenty outstanding crosses were selected and evaluated for grain yield, incorporating as controls the commercial hybrids: H-San Josecito®, H-San José®, Caimán®, Águila®, and Jabali®. In the same cycle, in Montecillo, Mexico, controlled pollinations were performed in each cross to obtain the required grain samples to perform the quality analysis.

The grain obtained came from a conventional agronomic management suitable for production, where a 120N-60P-60K fertilization rate was used (60N-60P-60K before planting, and 60N-00P-00K at the time of hilling), and six irrigations were made according to the needs of the crop. The biological cycle was allowed to develop without agronomic restrictions.

Experimental design

The trial was established under a randomized complete block design with three replications. The experimental unit consisted of a 5 m long furrow and a distance between furrows of 0.80 m; and a density of 65,000 plants ha⁻¹ was used.

The experiment was established in three locations: Montecillo (20° 17' N, 98° 36' W), and Tecámac (19° 42' N, 98° 96' W), State of Mexico, and Mixquiahuala, Hidalgo (20°

09' N, 99° 06' W). The first two showed the environmental conditions of the High Valleys: altitude of 2200 masl, mean annual temperature (Temp) of 16.2 and 15.6 °C, annual precipitation (PPA) of 590 and 440 mm, respectively.

In Mixquiahuala, located in the Valle del Mezquital, the ecological conditions corresponded to a transition area: altitude of 1850 m, semi-dry temperate climate, Temp 18.3 °C and 400 mm PPA.

Agronomic management

In Montecillo, the assay establishment was done on May 2, 2016, using the fertilization rate 120N-60P-60K, and the crop cycle under irrigated conditions. In Tecámac, the trial was established on June 6, and the same fertilization rate was applied; irrigation was provided after planting and the rest of the cycle was conducted under rainfed conditions. In Mixquiahuala, planting took place on May 5; fertilization was not applied due to the use of sewage water, in accordance with the agronomic practices of the region. Three irrigations were applied during the growing cycle: before planting, twenty days after planting and during flowering.

The agronomic conditions of each site correspond to the local production system, and from these, the yield of each experimental cross was differentiated.

Evaluated characteristics

Grain yield

Grain yield per experimental unit (R_{to}) was determined as:

$$R_{to1} = (PMz * Id * (100 - \% Hum) / 100) / 0.86$$

where PMz was the weight of the harvested ears per experimental unit; Id, the shelling index; % Hum, the humidity of the field sample; and 0.86, a correction factor to adjust the yield to 14 % humidity. With this result and the area of the useful plot, the grain yield (R_{to}) was estimated in Megagrams (tons) per hectare ($Mg ha^{-1}$).

Genotype-by-environment interaction for grain yield

The genotype-by-environment interaction was assessed using the additive main effects and multiplicative interaction model (AMMI) (Zobel *et al.*, 1988) for grain yield. Both data analysis and two-dimensional plot (biplot) were performed using GEA-R software (Pacheco *et al.*, 2015).

Biochemical and nutritional composition of the grain

The sample for the study of each cross consisted of 72 g of grain obtained from the central part of five cobs from controlled pollination from Montecillo, State of Mexico; the grain was pulverized with a cyclone mill (UDY Corporation®, Fort Collins, CO, USA), from which homogenized flour with a particle size of 0.5 mm was obtained.

Samples, reagents and other materials were weighed on an analytical balance (A&D®, Model GR 202, San Jose, CA, USA).

The methods used for biochemical analysis were as follows: method 30-25.01 for oil content, method 46-11.02 for protein (AACC, 2009), the methodology of Brunt *et al.* (1998), and method 76-13.01 of AACC (2009) to starch determination.

The determination of biochemical content was carried out in three replicates per cross. The concentration obtained was expressed in g 100 g⁻¹ of dry matter (ms).

With the information obtained from the nutritional biochemical components, the analysis of variance was carried out under the model of a completely randomized experimental design complemented with Tukey's test of means ($p \leq 0.05$). Statistical analysis was performed with the Statistical Analysis System software (SAS Institute, 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of variance obtained using the AMMI model showed statistical differences ($p \leq 0.01$) in the genetic component and locations (Table 1); it also indicated significant interaction ($p \leq 0.01$) between both components.

Zobel *et al.* (1988) and Gauch (2013) mentioned in their studies that these results are a generalized response showing variation among genotypes, differences in environmental potential, and variation in the ordering of genotypes in each location; which allows differentiating genotypes by yield and stability.

According to the sum of squares of treatments (SCT), the genotypes x locations interaction (GenxLoc) concentrated the greatest variation (51.1 %), which highlighted the importance of this phenomenon, both in the evaluation and selection of genotypes and, therefore, in genetic improvement. The full AMMI model represented 85.7 % of the sum of squares of the treatments and the residual was 14.2 %. Under this

Table 1. Combined analysis of variance across locations for grain yield of experimental crosses and commercial hybrids of white maize.

SV	DF	SS	MS	SSPercentage
Treatments	74	1169.75	15.8	
Genotypes	24	159.76	6.65 [†]	13.66 [¶]
Locations	2	411.90	205.9 [†]	35.21 [¶]
GenxLoc	48	597.85	12.45 [†]	51.11 [¶]
CP1	25	431.67	17.26 [†]	72.20 [§]
Residual	23	166.18	7.22	14.2 [¶]
Error	225	284.76	1.26	
Total	299	1454.51		

[†] $p \leq 0.01$; SV: Source of variation; DF: Degrees of freedom; SS: Sum of squares; MS: Mean squares; CP1: Principal component one; [¶]: Proportion with respect to the sum of squares of the treatment design; [§]: Proportion with respect to the sum of squares of the GenxLoc interaction.

consideration and according to Zobel *et al.* (1988), the model adequately represented the data. For the explanation of the interaction, only principal component one (CP1) was significant ($p \leq 0.01$), comprising 77.2 % of the interaction variance. This allows its representation in a biplot figure (AMMI1) through CP1 and grain yield.

Genotype-by-location interaction (GenxLoc)

The biplot figure showed the differences in environmental potential between locations (Figure 1), particularly between Montecillo and the rest, since the former had a higher grain yield ($> 9.0 \text{ Mg ha}^{-1}$).

The high productivity of the locality was attributed to the environmental potential basically defined by the possibility of irrigation, as well as the adaptation of the genotypes to this environment. It was also found that, given the vector length, Montecillo had a greater interaction effect, which indicated that there was more variation in grain yield among genotypes and facilitated both discrimination and selection of genotypes.

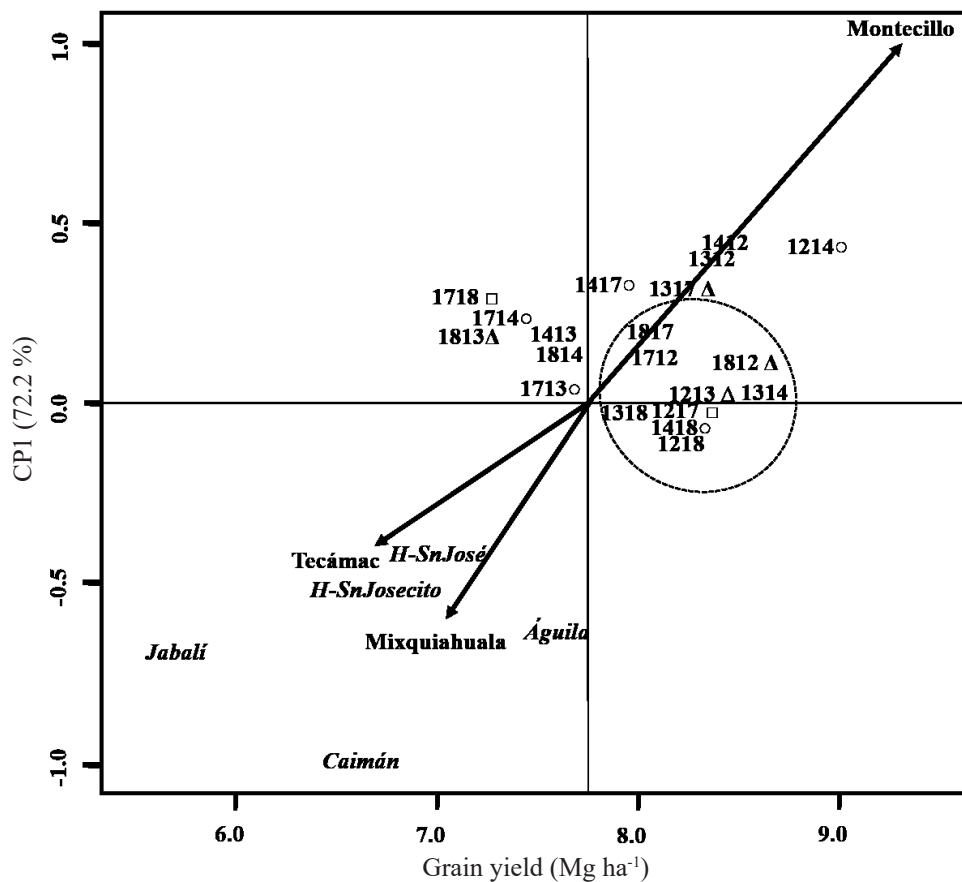


Figure 1. AMMI. Grain yield and interaction of genotypes (experimental crosses and commercial hybrids) by location. ○, □, Δ are crosses with outstanding starch, oil and protein content, respectively. The oval surrounds the outstanding crosses for their stability and grain yield.

In contrast, in Mixquiahuala and Tecámac the yield was lower than the average of the localities (7.8 Mg ha^{-1}); this was mainly due to the lower availability of water, since moisture shortage was considered to be the most limiting environmental factor for production; however, such a restriction represents the production conditions of those locations.

In the case of the interaction effect, the angle between the vectors and the mean yield value was similar in both locations, so that an analogous classification of the genotypes' behavior could be made. This implied that there was a lower discrimination capacity among the crosses evaluated, since the variation in the expressed yield was reduced. According to Zobel *et al.* (1988), genotypes that are located in the same direction as the locations show positive interaction with these; that is, they have adaptation and higher production. Although in this study, in general, the crosses showed positive interaction with Montecillo, it was also observed that their genetic constitution had an important effect on the expression of superior yield compared to commercial hybrids. Among genotypes, 14 crosses were observed that exceeded the average yield (close to 8 Mg ha^{-1}) (Figure 1); the average yield of commercial hybrids ($< 7.0 \text{ Mg ha}^{-1}$) was considered outstanding, which demonstrated the hardiness of the crosses under adverse production conditions. Likewise, ten of them were found to have superior performance in Montecillo (Figure 1, quadrant I). It was also identified that crosses 1214, 1412, and 1312 were adapted to this location and had yields $\geq 8.5 \text{ Mg ha}^{-1}$. Although their performance was considered adequate, given the high GenXLoc interaction, these crosses were defined as suitable to be used in Montecillo for grain production.

Based on the criteria of Zobel *et al.* (1988), crosses 1213, 1314, 1812, 1218, 1418, 1217, 1318, 1712, and 1817 presented interaction values close to zero; consequently, they were identified as stable, with an average yield of 8.5 Mg ha^{-1} , and were defined as outstanding crosses for their yield and stability. Within this group, 4 crosses were also observed with contrasting behavior between direct and reciprocal cross for grain yield and environment interaction (1718-1817, 1813-1318 and 1317-1713, 1213-1312, respectively).

Despite the differences, common parents were identified in crosses 1713, 1318, 1213, and 1314, where parent 13 participated; and crosses 1812, 1213, 1217, and 1218, where parent 12 participated. It was deduced that, depending on their interaction with another line, parents 13 and 12 possess stability characteristics that could be inherited to their offspring, which shows the possibility of obtaining stable crosses from the identification of parents with this attribute

The grain yield of the commercial hybrids was lower than the overall mean, and they exhibited the largest interaction effects. These genotypes were associated with the Mixquiahuala and Tecamac locations. Although their phenotypic expression was lower than expected (because they are hybrids marketed in the region), it corresponds to their areas of adaptation: Águila®, Jabalí® and Caimán® are hybrids recommended for the Mezquital Valley, while H-San José® and H-San Josecito® are recommended

for production conditions with water deficit. Caimán® had the highest GenxLoc interaction, and Jabalí® had the lowest grain yield. It was also suggested that the limited expression of the commercial hybrids, especially Águila®, Caimán® and Jabalí®, was due to the low water availability present in both locations; however, these restrictions helped to easily identify the potential of the experimental crosses and to differentiate them from the commercial hybrids.

Nine outstanding crosses were identified (Figure 1) that showed stability across locations and had acceptable yields superior to those of commercial materials. Their use is feasible for grain production in the evaluation localities and other similar ones.

Biochemical nutritional content of the grain

Analysis of variance showed that there were statistical differences ($p \leq 0.01$) in the three biochemical components evaluated in the grain of the twenty experimental crosses (Table 2).

The range of the biochemical nutrient content of the crosses (Table 3) showed a higher variation than that reported in maize grains by Arendt and Zannini (2013). It was also greater than the variation found in improved varieties (Méndez-Montealvo *et al.*, 2005), hybrids from the High Valleys of Mexico (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2018), and in populations with high oil content (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014).

In the present study, lower and higher contents were observed for the defined elements, and higher extremes were desirable.

Oil content fluctuated between 3.5 and 6.4 g 100 g⁻¹ ms, with a mean value of 5.2 g 100 g⁻¹. Crosses 1718 and 1217 stood out, with oil concentrations greater than 6.0 g 100 g⁻¹ ms, which exceeded the concentration found by Méndez-Montealvo *et al.* (2005), and were similar to the maximum value (6.7 %) found by Vázquez-Carrillo *et al.* (2014). According to the same authors, an average loss of 30 % of oil during the nixtamalization and tortilla manufacturing process was considered. Based on the results, we inferred that crosses with concentrations ≥ 5.0 g 100 g⁻¹ can form soft, firm tortillas, with remarkable chewiness and an acceptable shelf life.

Regarding protein content, it was observed that, although there was variation (Table 3) and there were crosses with more than 9.0 g 100 g⁻¹ of ms (1813, 1317, 1213, and 1812),

Table 2. Mean squares of analysis of variance for biochemical composition of grain in single crosses of white maize.

SV	DF	Oil	Protein	Starch
Genotypes	19	1.72 [†]	4.46 [†]	78.50 [†]
Repetitions	2	0.004	0.27	14.07
Error	38	0.051	0.61	32.76
CV (%)		4.46	10.75	6.51

[†] $p \leq 0.01$; SV: Source of variation; DF: Degrees of freedom; CV: Coefficient of variation.

Table 3. Mean values of biochemical nutrient content of grain from single crosses of high yielding white maize.

Cross	Starch g 100 g ⁻¹	Protein g 100 g ⁻¹	Oil g 100 g ⁻¹
1813	90.1 ab	9.8 a	3.5 k
1317	84.9 ab	9.2 ab	5.2 cdef
1213	72.6 b	9.1 abc	5.6 bc
1812	87.1 ab	9 abcd	5.4 cd
1318	86.1 ab	8.2 abcde	4.7 efghi
1413	85.6 ab	7.8 abcdef	4.5 fghi
1214	92.4 a	7.6 abcdef	3.7 jk
1412	85.9 ab	7.6 abcdef	5.5 cd
1417	95.5 a	7.2 bcdef	4.2 ijk
1314	85.3 ab	7.2 bcdef	4.5 ghi
1714	93.8 a	6.9 bcdef	5.3 cde
1712	87.1 ab	6.9 bcdef	4.7 efghi
1713	92.1 a	6.7 bcdef	5.3 cde
1718	87.7 ab	6.6 cdef	6.4 a
1217	87.2 ab	6.6 cdef	6.3 ab
1817	87.6 ab	6.4 ef	5.6 c
1218	84.6 ab	6.3 ef	5.1 cdefg
1814	89 ab	5.9 ef	4.9 efgh
1418	96.6 a	5.7 f	4.4 hij
1312	85 ab	5.5 f	5.6 cd
HSD	17.8	2.4	0.7

Concentrations expressed in g 100 g⁻¹ of dry matter (dm). HSD: Honest Significant Difference. Means with different letters indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

the grain of the twenty crosses had an average protein content in accordance with that reported by Arendt and Zannini (2013).

Concentrations were lower than those reported in hybrids for High Valleys (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014), and also with respect to protein quality genotypes (Coutiño-Estrada and Vázquez-Carrillo, 2018).

The limited protein content of most genotypes, determined from grain produced under irrigated conditions, could be attributed to that found by Thomison *et al.* (2014). They reported that conventional hybrids exposed to irrigation conditions reduced their protein content compared to those exposed to drought during grain filling.

The variation in protein content associated with genotypes coincided with that reported by Aguilar-Carpio *et al.* (2016), who also mentioned that genotypes respond differently to fertilization rates. Thomison *et al.* (2014) found a consistent response of protein increase associated with nitrogen increase.

Aguilar-Carpio *et al.* (2016), in soils similar to those of the present study, found a positive response with doses of 160 kg ha⁻¹ of N, similar to those used in the evaluation (120N-60P-00K).

Based on the above arguments, we considered that although the fertilization dose was adequate, protein expression and variation among crosses were defined by the genotype.

The starch concentration found in the crosses ranged from 72.6 to 96.6 g 100 g⁻¹ of dm (Table 3); these values were higher than the ranges defined for previously studied maize (Arendt and Zannini, 2013), with different origin and level of improvement (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2018; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014; Agama-Acevedo *et al.*, 2011). Crosses 1214, 1417, 1418, 1713, 1714, and 1813 had more than 92 g 100 g⁻¹ of dm and were rated as outstanding in this trait. Grain from these crosses is considered suitable for use in the food industry, where starch is used in a variety of processes to thicken, gelatinize, retain moisture, and improve the texture of a wide range of foods (Hamaker *et al.*, 2019).

It is important to take into account that the rheological and functional characteristics of starch are determined by the amylose:amylopectin ratio and the structure of its molecules (Salinas-Moreno *et al.*, 2003), which is why studies on the starch characteristics of these corns are required.

Commonly, starch in a corn kernel is represented by 75 to 80 % amylopectin, and 20 to 25 % is amylose (Hamaker *et al.*, 2019).

A modification of the proportions promotes changes in the hardness, color and moisture conservation of the tortillas (Salinas-Moreno *et al.*, 2003); therefore, although the starch content of the crosses was outstanding, they also require complementary studies to know with greater certainty the final destination of the grain produced.

Grain yield stability and biochemical nutrient content

When grain yield stability and nutrient content were analyzed together, it was found that the stable crosses with acceptable yield (≥ 8.0 Mg ha⁻¹) were: 1213, 1217, 1712, 1218, 1812, 1314, 1318, 1418, and 1817 (Figure 1); these also had outstanding starch content (> 85 g 100 g⁻¹ of dm), with the exception of 1213 (72.6 g 100 g⁻¹ of dm).

Cross 1418 showed the highest value (96.6 g 100 g⁻¹ of dm). Since corn starch represents one of the main sources of this compound, it is considered that these crosses could be directed towards its production and benefit. However, it is still necessary to identify the type and quality of starch in each for optimal utilization. The high starch content of the crosses was associated with racial origin, although the variation exceeded the content found by Agama-Acevedo *et al.* (2011) in populations of the Chalqueño landrace.

Cross 1217 showed acceptable yield and stability, as well as high starch (≥ 85 g 100 g⁻¹ of dm) and oil (6.3 g 100 g⁻¹ of dm) content, which are attributes that can improve the rheological characteristics of tortillas made with this grain, according to Vázquez-Carrillo *et al.* (2014).

Although cross 1812 was found to have acceptable yield, stability and starch content, and ranked among the crosses named as outstanding for protein concentration (9.0 g 100 g⁻¹ of ms), its protein content was considered to be in the normal range of variation,

in agreement with the values reported by Vázquez-Carrillo *et al.* (2014) and Vázquez-Carrillo *et al.* (2018).

In general, it was observed that the higher the protein content, the lower the starch concentration. This behavior had already been described by Vázquez-Carrillo *et al.* (2014), who found significant correlations of oil and protein ($r = 0.33$), oil and starch ($r = -0.39$) and starch and protein ($r = -0.84$). Lambert *et al.* (1998) explained that oil and starch accumulation are mutually exclusive.

Based on the results obtained, despite finding crosses with high grain yield and starch content, no relationship was observed between grain yield and biochemical content, which was anticipated, given that no direct selection had been made for the specific quality components evaluated, but basically for yield. However, it is possible to commercially exploit outstanding genotypes and initiate selection for biochemical components based on the characterization of nutrient content and yield expression.

With respect to stability, grain yield and nutrient content, crosses 1213, 1217, 1218, 1314, 1418, and 1812 were outstanding, with significant starch content. This is deduced by taking as a reference the values of Vázquez-Carrillo *et al.* (2014) and Vázquez-Carrillo *et al.* (2018), from which the grain can be destined to the production of quality tortillas. Because of the oil content, they could also be improved in softness, firmness and chewiness (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014); however, studies of the nixtamalization and industrialization processes are required.

CONCLUSIONS

Of all the experimental crosses evaluated, six (1812, 1314, 1213, 1217, 1418, and 1218) showed outstanding characteristics of stability, grain yield and starch and oil content; therefore, in the breeding program defined, there is genetic material with outstanding characteristics that could be used commercially. There was also sufficient genetic diversity to continue improving nutrient content, particularly starch and oil. Protein content, although with variations, was considered basic and in accordance with a normal corn grain.

REFERENCES

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 2009. Crude fat in wheat, corn, and soy flour, feeds, and mixed feeds. *In*: AACC International Approved Methods. AACC International. St. Paul, Minn, USA. <https://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-30-25.01>
- Agama-Acevedo E, Salinas-Moreno Y, Pacheco-Vargas G, Bello-Pérez LA. 2011. Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2: 317–329.
- Aguilar-Carpio C, Escalante-Estrada JAS, Aguilar-Mariscal I, Mejía-Contreras JA, Conde-Martínez VF, Trinidad-Santos A. 2016. Eficiencia agronómica, rendimiento y rentabilidad de genotipos de maíz en función del nitrógeno. *Terra Latinoamericana* 34: 419–429.
- Arendt EK, Zannini E. 2013. Maizes. *In*: Cereal grains for the food and beverage industries; Arendt EK, Zannini E. (eds.). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Philadelphia, PA, USA, pp: 67–113. <https://doi.org/10.1533/9780857098924.67>
- Brunt K, Sanders P, Rozema T. 1999. The enzymatic determination of starch in food, feed and raw materials of the starch industry. *Starch* 50 (10): 413–419. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-379x\(199810\)50:10<413::aid-star413>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-379x(199810)50:10<413::aid-star413>3.0.co;2-f)

- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). 2017. Tributo a Evangelina Villegas Co-creadora del maíz con calidad proteica y correceptora del premio mundial de alimentación 2000. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40: 117–118.
- Coutiño-Estrada B, Vázquez-Carrillo G. 2018. V238AC: nueva variedad de maíz de grano amarillo QPM. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9: 1089–1092. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i5.1513>.
- Galicia L, Miranda A, Gutiérrez MG, Custodio O, Rosales A, Ruiz N, Surlés R, Palacios-Rojas N. 2012. Protocolos de Laboratorio 2012. Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz y Análisis de Tejido Vegetal. CIMMYT: México, D.F. 50 p. <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/1349/97125.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Recuperado: julio, 2019)
- Gauch HG. 2013. A simple protocol for AMMI analysis of yield trials. *Crop Science* 53: 1860–1869. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.04.0241>
- Hamaker BR, Tuncil YE, Shen X. 2019. Carbohydrates of the kernel. *In: Corn, Chemistry and Technology* (3rd. Edition); Serna-Saldivar SO. (ed.). Woodhead Publishing: Duxford, UK, pp: 305–318. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00011-5>
- Lambert RJ, Alexander DE, Han ZJ. 1998. A high oil pollinator enhancement of kernel oil and effects on grain yields of maize hybrids. *Agronomy Journal* 90 (2): 211–215. <https://doi.org/10.2134/agronj1998.00021962009000020016x>
- Larkins BA. 2019. Proteins of the kernel. *In: Corn, Chemistry and Technology* (3rd. Edition); Serna-Saldivar SO. (ed.). Woodhead Publishing: Duxford, UK, pp: 319–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00012-7>
- Luna-Mena BM, Hinojosa-Rodríguez MA, Ayala-Garay O, Castillo-González F, Mejía-Contreras JA. 2012. Perspectivas de desarrollo de la industria semillera de maíz en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35 (1): 1–7.
- Méndez-Montevalvo G, Solorza-Feria J, Velázquez-Valle M, Gómez-Montiel N, Paredes-López O, Bello-Pérez LA. 2005. Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México. *Agrociencia* 39 (2): 267–274.
- Pacheco A, Vargas G, Alvarado M, Rodríguez F, Crossa J, Burgueño J. 2015. GEA-R (Genotype Environment Analysis with R for Windows) Version 2.0. CIMMYT. <http://hdl.handle.net/11529/10203> (Recuperado: enero, 2021).
- Salinas-Moreno Y, Pérez-Herrera P, Castillo-Merino J, Álvarez-Rivas LA. 2003. Relación de amilosa:amilopectina en el almidón de harina nixtamalizada de maíz y su efecto en la calidad de la tortilla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26 (2): 115–121.
- SAS Institute, Inc. 2003. SAS® 9.1 User's Guide: Statistics. Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, NC, USA. 694 p.
- Serna-Saldivar SO, Perez CE. 2019. Food uses of whole corn and dry-milled fractions. *In: Corn, Chemistry and Technology* (3rd. Edition); Serna-Saldivar SO. (ed.). Woodhead Publishing: Duxford, UK, pp: 435–467. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00016-4>
- SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). 2019. Producción Agropecuaria y Pesquera. Monografías: Maíz Grano. Servicio de Información Agropecuaria. SADER. México. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual> (Recuperado: Septiembre, 2020).
- SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). 2020. Boletín trimestral. Balanza disponibilidad-consumo. Maíz blanco. Octubre 2020. SADER. México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/597368/Boleti_n_trimestral_balanza_disponibilidad__6.pdf (Recuperado: Noviembre, 2022)
- Thomison PR, Geyer AB, Bishop BL, Young JR, Lentz, E. 2004. Nitrogen fertility effects on grain yield, protein, and oil of corn hybrids with enhanced grain quality traits. *Crop Management* 3 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1094/cm-2004-1124-02-rs>
- Vázquez-Carrillo MG, Santiago-Ramos D, Salinas-Moreno Y, López-Cruz J, Ybarra-Moncada MC, Ortega-Corona A. 2014. Genotipos de maíz (*Zea mays* L.) con diferente contenido de aceite y su relación con la calidad y textura de la tortilla. *Agrociencia* 48: 159–172.
- Vázquez-Carrillo MG, Preciado-Ortiz RE, Santiago-Ramos D, Palacios-Rojas N, Terrón IA, Hernández-Calette A. 2018. Estabilidad del rendimiento y calidad de grano y tortilla de

- nuevos híbridos de maíz con valor agregado para el subtrópico de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 41 (4a): 509–518.
- Zobel RW, Wright MJ, Gauch HG. 1988. Statistical analysis of a yield trial. *Agronomy Journal*. 80 (3): 388–393. <https://doi.org/10.2134/agronj1988.00021962008000030002x>
- Wang T, White PJ. Lipids of the kernel. 2019. *In: Corn, Chemistry and Technology* (3rd. Edition); Serna-Saldivar SO. (ed.). Woodhead Publishing: Duxford, UK, pp: 337–368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00013-9>

ESTABILIDAD DEL RENDIMIENTO DE GRANO Y CONTENIDO BIOQUÍMICO NUTRIMENTAL EN CRUZAS EXPERIMENTALES DE MAÍZ BLANCO

Francisco Javier **Sánchez-Ramírez**¹, Ma. del Carmen **Mendoza-Castillo**^{2*}, Carmen Gabriela **Mendoza-Mendoza**²,
Adriana **Delgado-Alvarado**³, Etzael **Núñez-Terrones**²

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25315.

² Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56264.

³ Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla No. 205, Santiago Momoxplan, San Pedro Cholula, Puebla, México. C. P. 72760.

* Autor para correspondencia: camen@colpos.mx

RESUMEN

En México cerca de la mitad de la producción de maíz blanco se destina al consumo humano. En un programa de mejoramiento genético, además de aumentar el rendimiento y la estabilidad de los genotipos, se propone mejorar la calidad del grano. Asumiendo que existe variación genética entre los genotipos élite evaluados en esta investigación, se consideró que al menos un genotipo sería sobresaliente por su alto potencial productivo y características deseables para la calidad del grano. Este trabajo tuvo como objetivo conocer la variación genética presente en híbridos experimentales en cuanto a su potencial de rendimiento y calidad del grano, así como identificar a los genotipos superiores. En el año 2016, en un diseño en bloques al azar con tres repeticiones se evaluaron veinte cruza experimentales de maíz blanco en dos localidades del área ecológica de Valles Altos de México y en una de transición. Mediante el modelo de efectos principales aditivos y de interacción multiplicativa se determinó la estabilidad del rendimiento. La calidad del grano se evaluó a través del contenido de almidón, proteína y aceite. En su mayoría, las cruza tuvieron rendimiento y estabilidad superior a los testigos (híbridos comerciales). Asimismo, el contenido nutrimental varió entre éstas para cada compuesto bioquímico; la concentración de aceite fue de 3.5 a 6.4 g 100 g⁻¹ de materia seca (ms); de proteína, entre 5.5 y 9.8 g 100 g⁻¹ de ms; y de almidón, de 72.6 a 96.6 g 100 g⁻¹ de ms. Con base en su estabilidad fenotípica, rendimiento y calidad del grano se observó que las cruza 1213, 1217, 1218, 1314, 1418 y 1812 fueron sobresalientes, las cuales se pueden utilizar para producir grano con contenido destacado de almidón y aceite. En general las cruza mostraron potencial para el aprovechamiento del almidón y la elaboración de tortillas.

Palabras clave: *Zea mays* L., estabilidad fenotípica, calidad del grano.

Citation: Sánchez-Ramírez FJ, Mendoza-Castillo MC, Mendoza-Mendoza CG, Delgado-Alvarado A, Núñez-Terrones E. 2022. Estabilidad del rendimiento de grano y contenido bioquímico nutrimental en cruza experimentales de maíz blanco. *Agrociencia*. 56(8): 1507-1532. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2423>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: August 31, 2021.
Approved: November 08, 2022.
Published in Agrociencia:
January 16, 2023.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



INTRODUCCIÓN

Por su alto contenido de carbohidratos, el maíz es una de las tres principales fuentes de energía para la población mundial (Serna-Saldivar y Perez, 2019). En México es el cereal más producido (24.2 millones de toneladas) y consumido (25.0 millones de toneladas) (SIAP, 2019). Se reporta que 49 % de la producción nacional de grano blanco se destina al consumo humano (SIAP, 2020), especialmente en forma de tortilla, el componente primario de la dieta mexicana (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014).

El grano de maíz está constituido principalmente por carbohidratos, proteínas y lípidos (Arendt y Zannini, 2013). Entre los carbohidratos presentes en este grano, el almidón representa alrededor de 85 % del peso total del endospermo y 72 % del peso total del grano. A nivel mundial, el maíz es la fuente comercial de almidón más grande y es la base para la elaboración de un gran número de productos funcionales modificados química, enzimática y físicamente, así como de maltodextrinas hidrolizadas y jarabes. Recientemente, se ha demostrado que el almidón del maíz nativo no gelatinizado es una fuente de almidón de digestión lenta, que resalta por su índice glucémico (Hamaker *et al.*, 2019). Además, ha cobrado importancia por su uso en la elaboración de alimentos libres de gluten (Serna-Saldivar y Perez, 2019).

El endospermo también está constituido por proteína (entre 8 y 15 %), y es la segunda biomolécula más abundante en el grano de maíz. La zeína constituye del 60 al 70 % de la proteína del endospermo. Ésta no es un nutriente ideal para el ser humano, pero debido a su abundancia, hidrofobicidad y precio, es valiosa por su amplia gama de aplicaciones industriales, como la elaboración de plastificantes, recubrimientos, fibras, tintas y molduras. Nutricionalmente, los maíces QPM (quality protein maize) han mejorado la calidad de la proteína respecto a los aminoácidos esenciales, como lisina y triptófano, lo cual ha elevado su valor nutrimental (Arendt y Zannini, 2013). Aunque el maíz no se considera una oleaginosa, pues sólo posee entre 3 y 6 % de aceite, es importante como un derivado del proceso de molienda húmeda (Wang y White, 2019). En el caso de la elaboración de tortillas, hay evidencia de que el aceite puede conferir características deseables como suavidad, flexibilidad y masticabilidad (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014).

En México la demanda de grano blanco es cubierta por la producción nacional, que representa 86 % del total de grano producido (SIAP, 2019). Esta suficiencia de grano blanco se ha logrado a través de la optimización de las prácticas agronómicas y el mejoramiento genético. No obstante, aunque en el país hay antecedentes sobre la mejora de la calidad del grano (CIMMYT, 2017), hasta hace pocos años el mejoramiento se centraba principalmente en el incremento del rendimiento de grano y se trabajaba en menor grado para mejorar su calidad.

Recientemente, Serna-Saldivar y Perez (2019) han corroborado que las poblaciones nativas de maíz representan un recurso genético valioso para aumentar la calidad y el contenido nutrimental del grano. También se ha evidenciado la incorporación de maíces nativos en los programas de mejoramiento genético de las instituciones de investigación pública nacional, generando genotipos con características nutrimentales

sobresalientes como el contenido de almidón, aceite y proteína (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2018). Con base en lo anterior, se considera de suma necesidad caracterizar el contenido bioquímico nutrimental del material genético de los programas de mejoramiento actuales para conocer su variación, potencial de aprovechamiento y definir las estrategias de fitomejoramiento.

En México, 94 % de la semilla mejorada usada para el establecimiento del cultivo de maíz se obtiene de empresas privadas transnacionales (Luna-Mena *et al.*, 2012). Aunque la producción puede abastecer la demanda de grano, aún se requiere realizar mejoramiento genético para suministrar semillas a un costo menor, con rendimiento competitivo y calidad de grano para la elaboración tortillas (uno de sus principales usos). Ante esta necesidad, en la presente investigación se evaluó germoplasma obtenido de un programa de mejoramiento de maíz por hibridación para los Valles Altos de México, el cual tuvo como objetivos primordiales: incrementar el rendimiento de grano, generar genotipos rústicos (dosis de fertilización baja, humedad y labores de cultivo mínimas) y mejorar la calidad de grano, ésta última realizada de forma sensorial no sistematizada.

La evaluación se llevó a cabo para probar la existencia de variación genética entre los genotipos élite estudiados, y en consecuencia identificar al menos un genotipo sobresaliente por su alto potencial productivo y características deseables para la calidad del grano. Así, se determinó el potencial de las cruzas experimentales sobresalientes para rendimiento de grano a través de diferentes localidades y en comparación con híbridos comerciales, y se caracterizó su calidad a través de la cuantificación de almidón, proteína y aceite con el fin de detectar cruzamientos adecuados para la producción de alimentos destinados al consumo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En el Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Posgraduados se evaluaron diez líneas endogámicas (S_0) derivadas del programa de mejoramiento genético de maíz para Valles Altos donadas por el Dr. Moisés Mendoza Rodríguez[†]. Dichas líneas se formaron a partir de poblaciones de amplia base genética de variantes de las razas Chalqueño y Cónico; éstas fueron seleccionadas bajo condiciones de producción rústicas y se caracterizaron por sus atributos sobresalientes (peso de mazorca, peso de 100 granos, diámetro y longitud de la mazorca) para rendimiento de grano.

De estas líneas se formaron las cruzas directas y recíprocas posibles, las cuales se evaluaron agrónomicamente en 2014. De ellas, en 2016, se seleccionaron y evaluaron veinte cruzas sobresalientes por rendimiento de grano, incorporando como testigos a los híbridos comerciales: H-San Josecito[®], H-San José[®], Caimán[®], Águila[®] y Jabalí[®]. En el mismo ciclo, en Montecillo, México, se realizaron polinizaciones fraternales en cada craza para obtener las muestras de grano para el análisis de calidad. El grano obtenido

derivó de un manejo agronómico convencional adecuado para la producción, donde se empleó una dosis de fertilización 120N-60P-60K (60N-60P-60K antes de la siembra y 60N-00P-00K en el momento del aporque) y se suministraron seis riegos acordes con las necesidades del cultivo. Se procuró que el ciclo biológico se desarrollara sin restricciones agronómicas.

Diseño experimental

El ensayo se estableció bajo un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en un surco de 5 m de longitud y una distancia entre surcos de 0.80 m; se utilizó una densidad de población de 65,000 plantas ha⁻¹. El experimento se estableció en tres localidades: Montecillo (20° 17' N, 98° 36' O) y Tecámac (19° 42' N, 98° 96' O), Estado de México, y Mixquiahuala, Hidalgo (20° 09' N, 99° 06' O). Las dos primeras presentan condiciones ambientales de los Valles Altos: altitud de 2200 msnm, temperatura media anual (Temp) de 16.2 y 15.6 °C, precipitación anual (PPA) de 590 y 440 mm, respectivamente. En Mixquiahuala, ubicada en el Valle del Mezquital, las condiciones ecológicas corresponden a áreas de transición: altitud de 1850 m, clima templado semiseco, Temp 18.3 °C y 400 mm de PPA.

Manejo agronómico

En Montecillo la siembra se realizó el 2 de mayo de 2016, empleando la dosis de fertilización 120N-60P-60K y el ciclo del cultivo bajo condiciones de riego. En Tecámac, el ensayo se estableció el 6 de junio y se aplicó la misma dosis de fertilización; se suministró un riego posterior a la siembra y el resto del ciclo se condujo bajo condiciones de temporal. En Mixquiahuala se sembró el 5 de mayo; no se fertilizó dado el uso de aguas negras, acorde a las prácticas agronómicas de la región. Durante el ciclo de cultivo se aplicaron tres riegos: antes de la siembra, veinte días posteriores a la siembra y durante la floración. Las condiciones agronómicas de cada sitio corresponden con el sistema de producción local, y a partir de éstas, se diferenció la expresión del rendimiento de cada cruza experimental.

Características evaluadas

Rendimiento de grano

El rendimiento de grano por unidad experimental (Rto₁) se determinó como:

$$Rto1 = (PMz * Id * (100 - \% Hum) / 100) / 0.86$$

donde PMz fue el peso de las mazorcas cosechadas por unidad experimental; Id, el índice de desgrane; % Hum, la humedad de la muestra en campo; y 0.86, un factor de corrección para reajustar el rendimiento a 14 % de humedad. Con este resultado y el área de la parcela útil se estimó el rendimiento de grano (Rto) en Megagramos (toneladas) por hectárea (Mg ha⁻¹).

Interacción genotipo por ambiente para el rendimiento de grano

La interacción genotipo por ambiente se valoró mediante el modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa (AMMI, por sus siglas en inglés) (Zobel *et al.*, 1988) para el rendimiento de grano. Tanto el análisis de los datos como el gráfico de dos dimensiones (biplot) se realizaron mediante el software GEA-R (Pacheco *et al.*, 2015).

Composición bioquímica nutricional del grano

La muestra para el estudio de cada cruza se integró de 72 g de grano obtenido de la parte central de cinco mazorcas provenientes de polinización controlada de la localidad de Montecillo, Edo. de México; el grano fue pulverizado con un molino ciclónico (UDY Corporation®, Fort Collins, CO, EUA), de la que se obtuvo harina homogeneizada con un tamaño de partícula de 0.5 mm. Las muestras, los reactivos y demás materiales se pesaron en una balanza analítica (A&D®, Modelo GR 202, San Jose, CA, EUA). Los métodos usados para los análisis bioquímicos fueron los siguientes: método 30-25.01 para el contenido de aceite, método 46-11.02 para proteína (AACC, 2009), y la metodología de Brunt *et al.* (1998) y el método 76-13.01 de AACC (2009) para cuantificar almidón. La determinación del contenido bioquímico se realizó en tres repeticiones por cruza. La concentración obtenida se expresó en g 100 g⁻¹ de materia seca (ms). Con la información obtenida de los componentes bioquímicos nutricionales se realizó el análisis de varianza bajo el modelo de un diseño experimental completamente al azar que se complementó con la prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el software Statistical Analysis System (SAS Institute, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza obtenido mediante el modelo AMMI mostró diferencias estadísticas ($p \leq 0.01$) en el componente genético y en las localidades (Cuadro 1); asimismo,

Cuadro 1. Análisis de varianza combinado a través de localidades para el rendimiento de grano de cruza experimentales e híbridos comerciales de maíz blanco.

FV	GL	SC	CM	Porcentaje SC
Tratamientos	74	1169.75	15.8	
Genotipos	24	159.76	6.65 [†]	13.66 [¶]
Localidades	2	411.90	205.9 [†]	35.21 [¶]
GenxLoc	48	597.85	12.45 [†]	51.11 [¶]
CP1	25	431.67	17.26 [†]	72.20 [§]
Residual	23	166.18	7.22	14.2 [¶]
Error	225	284.76	1.26	
Total	299	1454.51		

[†] $p \leq 0.01$; FV: Fuente de variación; GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; CM: Cuadrados medios; CP: Componente principal uno; [¶]: Proporción respecto a la suma de cuadrados del diseño de tratamientos; [§]: Proporción respecto a la suma de cuadrados de la interacción GenxLoc.

indicó interacción significativa ($p \leq 0.01$) entre ambos componentes. Zobel *et al.* (1988) y Gauch (2013) en sus estudios, mencionaron que estos resultados son una respuesta generalizada que muestra la variación entre los genotipos, diferencias en el potencial ambiental y variación en el ordenamiento de los genotipos en cada localidad; lo cual permite diferenciar a los genotipos por su rendimiento y su estabilidad.

De acuerdo con la suma de cuadrados de los tratamientos (SCT), la interacción genotipos x localidades (GenxLoc) concentró la mayor variación (51.1 %), lo que resaltó la importancia de este fenómeno, tanto en la evaluación como en la selección de los genotipos y, por lo tanto, en el mejoramiento genético. El modelo completo AMMI representó 85.7 % de la suma de cuadrados de los tratamientos y el residual fue de 14.2 %. Bajo esta consideración y de acuerdo con Zobel *et al.* (1988) el modelo representó adecuadamente los datos.

Para la explicación de la interacción sólo el componente principal uno (CP1) fue significativo ($p \leq 0.01$), comprendiendo el 77.2 % de la variación de la interacción. Esto permite su representación en una figura biplot (AMMI1) a través del CP1 y el rendimiento de grano.

Interacción genotipos por localidades (GenxLoc)

La figura biplot evidenció las diferencias del potencial ambiental entre localidades (Figura 1), particularmente entre Montecillo y el resto, pues en la primera se tuvo un rendimiento de grano superior ($> 9.0 \text{ Mg ha}^{-1}$). Se atribuyó la alta productividad de la localidad al potencial ambiental básicamente definido por la posibilidad de riego, así como la adaptación de los genotipos a dicho ambiente. Asimismo, se encontró que, dada la longitud del vector, en Montecillo hubo mayor efecto de interacción, lo que indicó que hubo más variación del rendimiento de grano entre genotipos y facilitó tanto la discriminación como la selección de los mismos.

En contraste, en Mixquiahuala y Tecámac el rendimiento fue inferior al promedio de las localidades (7.8 Mg ha^{-1}); esto se debió principalmente a la menor disponibilidad de agua, pues se consideró que la escasez de humedad es el factor ambiental más limitante para la producción; sin embargo, tal restricción representa las condiciones de producción de esas localidades.

En el caso del efecto de interacción, el ángulo entre los vectores y el valor medio de rendimiento fue similar en ambas localidades, por lo que se pudo hacer una clasificación análoga del comportamiento de los genotipos. Esto implicó que hubiera una menor capacidad de discriminación entre las cruza evaluadas, pues la variación del rendimiento expresado fue reducida.

De acuerdo con Zobel *et al.* (1988), los genotipos que se ubican en la misma dirección que las localidades muestran interacción positiva con éstas; es decir, tienen adaptación y una mayor producción. Aunque en este estudio, en general, las cruza mostraron interacción positiva con Montecillo, también se observó que su constitución genética tuvo un efecto importante en la expresión de rendimiento superior comparada con los híbridos comerciales.

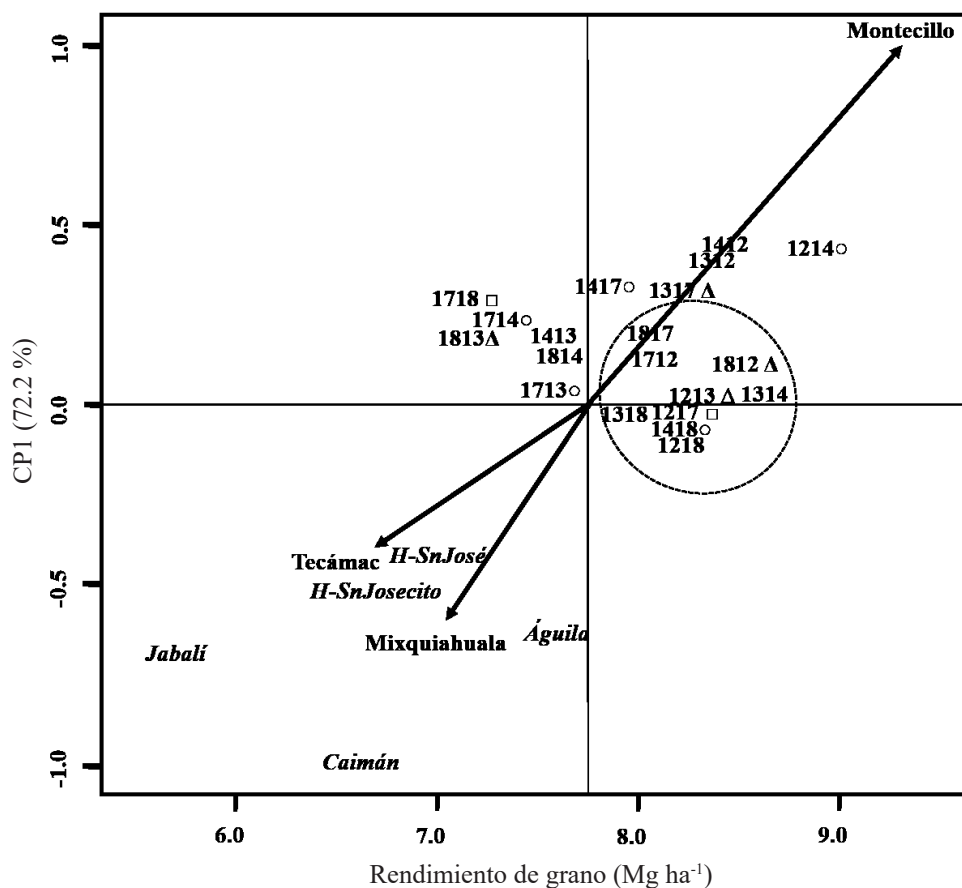


Figura 1. AMMI. Rendimiento de grano e interacción de los genotipos (cruzas experimentales e híbridos comerciales) por localidad. ○, □, △ son cruzas con contenido destacado de almidón, aceite y proteína, respectivamente. El óvalo rodea a las cruzas sobresalientes por su estabilidad y rendimiento de grano.

Entre genotipos, se observaron 14 cruzas que superaron al rendimiento promedio (cerca a 8 Mg ha⁻¹) (Figura 1); dado el rendimiento medio de los híbridos comerciales (< 7.0 Mg ha⁻¹) se consideraron sobresalientes, lo cual demostró la rusticidad de las cruzas ante condiciones de producción adversas. Asimismo, se encontró que diez de ellas tuvieron un desempeño superior en Montecillo (Figura 1, cuadrante I). También se identificó que las cruzas 1214, 1412 y 1312 se adaptaron a esta localidad y tuvieron rendimientos ≥ 8.5 Mg ha⁻¹. Aunque su rendimiento se consideró adecuado, dada la alta interacción GenxLoc, se definió que dichas cruzas se pueden utilizar en Montecillo para la producción de grano.

Con base en los criterios de Zobel *et al.* (1988), las cruzas 1213, 1314, 1812, 1218, 1418, 1217, 1318, 1712 y 1817 presentaron valores de interacción cercanos a cero; en consecuencia, se identificaron como estables, con rendimiento promedio de 8.5 Mg ha⁻¹, y

se definieron como cruzas sobresalientes por su rendimiento y estabilidad. Dentro de este grupo también se observaron 4 cruzas con comportamiento contrastante entre la craza directa y recíproca para el rendimiento de grano e interacción con el ambiente (1718-1817, 1813-1318 y 1317-1713, 1213-1312, respectivamente).

A pesar de las diferencias, se identificaron progenitores comunes en las cruzas 1713, 1318, 1213 y 1314, donde participó el progenitor 13; y las cruzas 1812, 1213, 1217 y 1218, donde participó el progenitor 12. Se dedujo que, dependiendo de su interacción con otra línea, los progenitores 13 y 12 poseen características de estabilidad que pudieran heredar a su descendencia, resultado que muestra la posibilidad de obtener cruzas estables a partir de la identificación de progenitores con dicho atributo.

El rendimiento de grano de los híbridos comerciales fue inferior a la media general, además de haber exhibido los efectos de interacción más amplios. Estos genotipos se asociaron a las localidades de Mixquiahuala y Tecámac. Aunque su expresión fenotípica fue inferior a la esperada (por ser híbridos comercializados en la región), ésta corresponde con sus áreas de adaptación: Águila®, Jabalí® y Caimán® son híbridos recomendados para el Valle del Mezquital, mientras que H-San José® y H-San Josecito® lo son para condiciones de producción con déficit hídrico. Caimán® tuvo la mayor interacción GenxLoc y Jabalí® el menor rendimiento de grano.

También se planteó que la expresión limitada de los híbridos comerciales, en especial Águila®, Caimán® y Jabalí®, obedeció a la baja disponibilidad de agua presente en ambas localidades; sin embargo, dichas restricciones ayudaron a identificar con facilidad el potencial de las cruzas experimentales y a diferenciarlas de los híbridos comerciales. Se identificaron 9 cruzas sobresalientes (Figura 1) que expresaron estabilidad a través de las localidades y que tuvieron un rendimiento aceptable y superior al de los materiales comerciales. Su aprovechamiento es factible para la producción de grano en las localidades de evaluación y otras similares.

Contenido bioquímico nutrimental del grano

El análisis de varianza mostró que hubo diferencias estadísticas ($p \leq 0.01$) en los tres componentes bioquímicos evaluados en el grano de las veinte cruzas experimentales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza de la composición bioquímica del grano en cruzas simples de maíz blanco.

FV	GL	Aceite	Proteína	Almidón
Genotipos	19	1.72 [†]	4.46 [†]	78.50 [†]
Repeticiones	2	0.004	0.27	14.07
Error	38	0.051	0.61	32.76
CV (%)		4.46	10.75	6.51

[†] $p \leq 0.01$; FV: Fuente de variación; GL: Grados de libertad; CV: Coeficiente de variación.

El intervalo del contenido bioquímico nutrimental de las cruzas (Cuadro 3) mostró una variación superior a la reportada en granos de maíz por Arendt y Zannini (2013). Asimismo, fue mayor que la variación encontrada en variedades mejoradas (Méndez-Montealvo *et al.*, 2005) e híbridos de los Valles Altos de México (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2018) y en poblaciones con alto contenido de aceite (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014). En el presente estudio se observaron contenidos menores y mayores para los elementos definidos, y fueron deseables los extremos superiores.

El contenido de aceite fluctuó entre 3.5 y 6.4 g 100 g⁻¹ ms, con valor medio de 5.2 g 100 g⁻¹. En esta característica sobresalieron las cruzas 1718 y 1217, con concentraciones mayores a 6.0 g 100 g⁻¹ de ms, las cuales superaron la concentración encontrada por Méndez-Montealvo *et al.* (2005) y fueron similares al valor máximo (6.7 %) encontrado por Vázquez-Carrillo *et al.* (2014). De acuerdo con los mismos autores, se consideró una pérdida promedio de 30 % de aceite durante el proceso de nixtamalización y elaboración de tortillas. Con base en los resultados, se infirió que las cruzas con concentraciones ≥ 5.0 g 100 g⁻¹ pueden formar tortillas suaves, firmes, de masticabilidad notable y con vida de anaquel larga.

Cuadro 3. Valores medios del contenido bioquímico nutrimental del grano de cruzas simples de maíz blanco de alto rendimiento.

Cruza	Almidón g 100 g ⁻¹	Proteína g 100 g ⁻¹	Aceite g 100 g ⁻¹
1813	90.1 ab	9.8 a	3.5 k
1317	84.9 ab	9.2 ab	5.2 cdef
1213	72.6 b	9.1 abc	5.6 bc
1812	87.1 ab	9 abcd	5.4 cd
1318	86.1 ab	8.2 abcde	4.7 efghi
1413	85.6 ab	7.8 abcdef	4.5 fghi
1214	92.4 a	7.6 abcdef	3.7 jk
1412	85.9 ab	7.6 abcdef	5.5 cd
1417	95.5 a	7.2 bcdef	4.2 ijk
1314	85.3 ab	7.2 bcdef	4.5 ghi
1714	93.8 a	6.9 bcdef	5.3 cde
1712	87.1 ab	6.9 bcdef	4.7 efghi
1713	92.1 a	6.7 bcdef	5.3 cde
1718	87.7 ab	6.6 cdef	6.4 a
1217	87.2 ab	6.6 cdef	6.3 ab
1817	87.6 ab	6.4 ef	5.6 c
1218	84.6 ab	6.3 ef	5.1 cdefg
1814	89 ab	5.9 ef	4.9 efgh
1418	96.6 a	5.7 f	4.4 hij
1312	85 ab	5.5 f	5.6 cd
HSD	17.8	2.4	0.7

Concentraciones expresadas en g 100 g⁻¹ de materia seca. DHS: Diferencia Honesta Significativa. Medias con letras diferentes indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Para el contenido de proteína se observó que, aunque hubo variación (Cuadro 3) y se tuvieron cruzas con más de $9.0 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms (1813, 1317, 1213 y 1812), el grano de las veinte cruzas tuvo un contenido de proteína promedio acorde al señalado por Arendt y Zannini (2013). Las concentraciones fueron inferiores a las reportadas en híbridos para los Valles Altos (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014) y con respecto a genotipos de calidad proteica (Coutiño-Estrada y Vázquez-Carrillo, 2018). El limitado contenido de proteína de la mayoría de los genotipos, determinada a partir de granos producidos bajo condiciones de riego, se pudo atribuir a lo encontrado por Thomison *et al.* (2014), quienes mencionaron que los híbridos convencionales expuestos a condiciones de riego redujeron su contenido de proteína comparados con aquellos que durante el llenado de grano fueron expuestos a sequía.

La variación en el contenido de proteína asociada a genotipos coincidió con lo reportado por Aguilar-Carpio *et al.* (2016), quienes también mencionaron que los genotipos responden de manera distinta a las dosis de fertilización. Thomison *et al.* (2014) encontraron una respuesta consistente del incremento de proteína asociada al incremento de nitrógeno. Aguilar-Carpio *et al.* (2016), en suelos similares al de la investigación, encontraron una respuesta positiva con dosis de 160 kg ha^{-1} de N, similar a la empleada en la evaluación (120N-60P-00K). Con los argumentos anteriores, se consideró que, si bien la dosis de fertilización fue adecuada, la expresión de la proteína y la variación entre las cruzas estuvo definida por el genotipo.

La concentración de almidón encontrada en las cruzas fue de 72.6 a $96.6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms (Cuadro 3); estos valores fueron superiores a los intervalos definidos para maíces previamente estudiados (Arendt y Zannini, 2013), con diferente origen y nivel de mejoramiento (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2018; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014; Agama-Acevedo *et al.*, 2011). Las cruzas 1214, 1417, 1418, 1713, 1714 y 1813 tuvieron más de $92 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms y se valoraron como sobresalientes en esta característica. Se considera que el grano de estas cruzas se puede utilizar en la industria alimentaria, pues en ésta se usa el almidón en diversos procesos para espesar, gelatinizar, retener humedad y mejorar la textura de una gran cantidad de alimentos (Hamaker *et al.*, 2019). Es importante tomar en cuenta que las características reológicas y funcionales del almidón son determinadas por la proporción de amilosa:amilopectina y la estructura de sus moléculas (Salinas-Moreno *et al.*, 2003), motivo por el cual se requieren estudios sobre las características del almidón de estos maíces.

Comúnmente el almidón en un grano de maíz es representado por 75 a 80 % de amilopectina y de 20 a 25 % es amilosa (Hamaker *et al.*, 2019). Una modificación de las proporciones promueve cambios en la dureza, color y en la conservación de la humedad de las tortillas (Salinas-Moreno *et al.*, 2003); por lo tanto, si bien el contenido de almidón de las cruzas fue sobresaliente, también requieren estudios complementarios para conocer con mayor certeza el destino final del grano producido.

Estabilidad del rendimiento de grano y contenido bioquímico nutricional

Al analizar en conjunto la estabilidad del rendimiento de grano y su contenido nutricional, se encontró que las cruzas estables y con rendimiento aceptable ($\geq 8.0 \text{ Mg ha}^{-1}$)

fueron: 1213, 1217, 1712, 1218, 1812, 1314, 1318, 1418 y 1817 (Figura 1); éstas también tuvieron un contenido de almidón destacable ($> 85 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms), con excepción de 1213 ($72.6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms). La cruza 1418 mostró el valor más alto ($96.6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms). Puesto que el almidón del maíz representa una de las principales fuentes de este compuesto, se considera que estas cruzas podrían encausarse hacia su producción y beneficio. No obstante, todavía es necesario identificar el tipo y la calidad del almidón de cada una para su aprovechamiento óptimo. El alto contenido de almidón de las cruzas se asoció con el origen racial, aunque la variación superó al contenido encontrado por Agama-Acevedo *et al.* (2011) en poblaciones de la raza Chalqueño.

La cruza 1217 presentó rendimiento y estabilidad aceptables, así como alto contenido de almidón ($\geq 85 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms) y de aceite ($6.3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms), los cuales son atributos que pueden mejorar las características reológicas de las tortillas elaboradas con este grano, según Vázquez-Carrillo *et al.* (2014). Si bien se encontró que la cruza 1812 tiene rendimiento, estabilidad y contenido de almidón aceptable, y se ubicó entre las cruzas denominadas como sobresalientes por la concentración de proteína ($9.0 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ms), el contenido de esta última se consideró en el intervalo normal de variación, de acuerdo con los valores reportados por Vázquez-Carrillo *et al.* (2014) y Vázquez-Carrillo *et al.* (2018).

En general se observó que a mayor contenido de proteína se presentó menor concentración de almidón. Este comportamiento ya había sido descrito por Vázquez-Carrillo *et al.* (2014), quienes encontraron correlaciones significativas de aceite y proteína ($r = 0.33$), aceite y almidón ($r = -0.39$) y de almidón y proteína ($r = -0.84$). Lambert *et al.* (1998) explicaron que la acumulación de aceite y almidón son mutuamente excluyentes.

Con base en los resultados obtenidos, a pesar de encontrar cruzas con rendimiento de grano y contenido de almidón elevado, no se observó relación entre el rendimiento de grano y el contenido bioquímico, lo cual fue anticipado dado que no se había realizado una selección directa sobre los componentes específicos de calidad evaluados, sino básicamente para rendimiento. Sin embargo, es posible aprovechar los genotipos sobresalientes de manera comercial e iniciar la selección para los componentes bioquímicos a partir de la caracterización del contenido nutrimental y la expresión del rendimiento.

Respecto a estabilidad, rendimiento de grano y contenido nutrimental fueron sobresalientes las cruzas 1213, 1217, 1218, 1314, 1418 y 1812, destacando su contenido de almidón. Esto al tomar como referencia los valores de Vázquez-Carrillo *et al.* (2014) y Vázquez-Carrillo *et al.* (2018), a partir de los cuales el grano se puede destinar a la elaboración de tortillas de calidad. Dado el contenido de aceite, también podrían mejorar la suavidad, firmeza y masticabilidad (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014); no obstante, se requieren estudios de los procesos de nixtamalización e industrialización.

CONCLUSIONES

De la totalidad de cruzas experimentales evaluadas, seis (1812, 1314, 1213, 1217, 1418, y 1218) presentaron características sobresalientes de estabilidad, rendimiento de gra-

no y contenido de almidón y aceite; por lo tanto, en el programa de mejoramiento definido existe material genético con características destacadas susceptibles de aprovecharse de manera comercial.

También existió diversidad genética suficiente para continuar con el mejoramiento del contenido nutrimental, en particular del almidón y aceite. El contenido de la proteína, aunque con variaciones, se consideró básico y acorde con un grano normal de maíz.

REFERENCIAS

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 2009. Crude fat in wheat, corn, and soy flour, feeds, and mixed feeds. *In: AACC International Approved Methods*. AACC International. St. Paul, Minn, USA. <https://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-30-25.01>
- Agama-Acevedo E, Salinas-Moreno Y, Pacheco-Vargas G, Bello-Pérez LA. 2011. Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2: 317–329.
- Aguilar-Carpio C, Escalante-Estrada JAS, Aguilar-Mariscal I, Mejía-Contreras JA, Conde-Martínez VF, Trinidad-Santos A. 2016. Eficiencia agronómica, rendimiento y rentabilidad de genotipos de maíz en función del nitrógeno. *Terra Latinoamericana* 34: 419–429.
- Arendt EK, Zannini E. 2013. Maizes. *In: Cereal grains for the food and beverage industries; Arendt EK, Zannini E. (eds.)*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Philadelphia, PA, USA, pp: 67–113. <https://doi.org/10.1533/9780857098924.67>
- Brunt K, Sanders P, Rozema T. 1999. The enzymatic determination of starch in food, feed and raw materials of the starch industry. *Starch* 50 (10): 413–419. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-379x\(199810\)50:10<413::aid-star413>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-379x(199810)50:10<413::aid-star413>3.0.co;2-f)
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). 2017. Tributo a Evangelina Villegas Co-creadora del maíz con calidad proteica y correceptora del premio mundial de alimentación 2000. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40: 117–118.
- Coutiño-Estrada B, Vázquez-Carrillo G. 2018. V238AC: nueva variedad de maíz de grano amarillo QPM. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9: 1089–1092. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i5.1513>.
- Galicia L, Miranda A, Gutiérrez MG, Custodio O, Rosales A, Ruiz N, Surlés R, Palacios-Rojas N. 2012. Protocolos de Laboratorio 2012. Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz y Análisis de Tejido Vegetal. CIMMYT: México, D.F. 50 p. <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/1349/97125.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Recuperado: julio, 2019)
- Gauch HG. 2013. A simple protocol for AMMI analysis of yield trials. *Crop Science* 53: 1860–1869. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.04.0241>
- Hamaker BR, Tuncil YE, Shen X. 2019. Carbohydrates of the kernel. *In: Corn, Chemistry and Technology* (3rd. Edition); Serna-Saldivar SO. (ed.). Woodhead Publishing: Duxford, UK, pp: 305–318. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00011-5>
- Lambert RJ, Alexander DE, Han ZJ. 1998. A high oil pollinator enhancement of kernel oil and effects on grain yields of maize hybrids. *Agronomy Journal* 90 (2): 211–215. <https://doi.org/10.2134/agronj1998.00021962009000020016x>
- Larkins BA. 2019. Proteins of the kernel. *In: Corn, Chemistry and Technology* (3rd. Edition); Serna-Saldivar SO. (ed.). Woodhead Publishing: Duxford, UK, pp: 319–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00012-7>
- Luna-Mena BM, Hinojosa-Rodríguez MA, Ayala-Garay O, Castillo-González F, Mejía-Contreras JA. 2012. Perspectivas de desarrollo de la industria semillera de maíz en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35 (1): 1–7.
- Méndez-Montealvo G, Solorza-Feria J, Velázquez-Valle M, Gómez-Montiel N, Paredes-López O, Bello-Pérez LA. 2005. Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México. *Agrociencia* 39 (2): 267–274.
- Pacheco A, Vargas G, Alvarado M, Rodríguez F, Crossa J, Burgueño J. 2015. GEA-R (Genotype Environment Analysis with R for Windows) Version 2.0. CIMMYT. <http://hdl.handle.net/11529/10203> (Recuperado: enero, 2021).

- Salinas-Moreno Y, Pérez-Herrera P, Castillo-Merino J, Álvarez-Rivas LA. 2003. Relación de amilosa:amilopectina en el almidón de harina nixtamalizada de maíz y su efecto en la calidad de la tortilla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26 (2): 115–121.
- SAS Institute, Inc. 2003. SAS® 9.1 User's Guide: Statistics. Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, NC, USA. 694 p.
- Serna-Saldivar SO, Perez CE. 2019. Food uses of whole corn and dry-milled fractions. *In: Corn, Chemistry and Technology* (3rd. Edition); Serna-Saldivar SO. (ed.). Woodhead Publishing: Duxford, UK, pp: 435–467. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00016-4>
- SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). 2019. Producción Agropecuaria y Pesquera. Monografías: Maíz Grano. Servicio de Información Agropecuaria. SADER. México. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual> (Recuperado: Septiembre, 2020).
- SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). 2020. Boletín trimestral. Balanza disponibilidad-consumo. Maíz blanco. Octubre 2020. SADER. México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/597368/Boleti_n_trimestral_balanza_disponibilidad_6.pdf (Recuperado: Noviembre, 2022)
- Thomison PR, Geyer AB, Bishop BL, Young JR, Lentz, E. 2004. Nitrogen fertility effects on grain yield, protein, and oil of corn hybrids with enhanced grain quality traits. *Crop Management* 3 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1094/cm-2004-1124-02-rs>
- Vázquez-Carrillo MG, Santiago-Ramos D, Salinas-Moreno Y, López-Cruz J, Ybarra-Moncada MC, Ortega-Corona A. 2014. Genotipos de maíz (*Zea mays* L.) con diferente contenido de aceite y su relación con la calidad y textura de la tortilla. *Agrociencia* 48: 159–172.
- Vázquez-Carrillo MG, Preciado-Ortiz RE, Santiago-Ramos D, Palacios-Rojas N, Terrón IA, Hernández-Calette A. 2018. Estabilidad del rendimiento y calidad de grano y tortilla de nuevos híbridos de maíz con valor agregado para el subtrópico de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 41 (4a): 509–518.
- Zobel RW, Wright MJ, Gauch HG. 1988. Statistical analysis of a yield trial. *Agronomy Journal*. 80 (3): 388–393. <https://doi.org/10.2134/agronj1988.00021962008000030002x>
- Wang T, White PJ. Lipids of the kernel. 2019. *In: Corn, Chemistry and Technology* (3rd. Edition); Serna-Saldivar SO. (ed.). Woodhead Publishing: Duxford, UK, pp: 337–368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00013-9>

NATIVE BACTERIA IN RASPBERRY CROWN GALL REDUCE THE SEVERITY OF *Agrobacterium tumefaciens*

Elizabeth Sánchez-Jiménez¹, Sergio Aranda-Ocampo^{1*},
Daniel Leobardo Ochoa-Martínez¹, Dimas Mejía-Sánchez²

¹ Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Posgrado en Fitosanidad. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56264.

² Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

* Author for correspondence: saranda@colpos.mx

ABSTRACT

Native bacterial populations in crown galls caused by *Agrobacterium tumefaciens* may harbour bacteria of interest for biocontrol of this pathogen. In this study, we explored the density of native bacterial populations in crown galls of raspberry (*Rubus ideaus*) and evaluated their *in vitro* and *in vivo* antagonism against *A. tumefaciens*. Bacteria morphologically similar to *A. tumefaciens* were isolated from six gall samples and identified by *virD2* gene sequencing. Bacterial population density was calculated by direct plate count on nutrient agar and R2A media. The *in vitro* antagonism efficiency index against *A. tumefaciens* of the most frequent bacteria was evaluated by dual confrontation on nutrient agar medium, and *in vivo* by inoculation of 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ in the root of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants under greenhouse conditions. By direct sequencing and biovar characterization, it was identified as *A. tumefaciens* biovar 1 in raspberry galls. Native bacterial populations in galls have variable density and their diversity is limited. By partial amplification of the *16S rRNA* gene, 13 strains were identified with the highest frequency in the genera *Pseudomonas* (61.5 %), *Bacillus* (15.3 %), *Alcaligenes* (15.3 %) and *Delftia* (7.6 %). Among these, *Alcaligenes faecalis* showed the highest *in vitro* antagonism index ($p \leq 0.05$) against *A. tumefaciens*, followed by *Delftia* sp. and *Pseudomonas citronellolis*. *In vivo* inoculation of tomato plants with these antagonists against *Agrobacterium tumefaciens* did not prevent infection; however, *Alcaligenes faecalis* significantly reduced ($p \leq 0.05$) the severity of plant stem tumours. *A. faecalis* is the most efficient antagonist *in vitro* and *in vivo* against *A. tumefaciens*.

Keywords: antagonism, biocontrol, *Rubus* sp., tumour.

INTRODUCTION

Agrobacterium tumefaciens causes tumours (also known as “crown gall”) in a wide range of dicotyledonous plants; infection occurs by transfer and insertion of the tumour-inducing (Ti) plasmid into the host plant genome.

During tumour development oncogenic cells synthesize opines, which are specific compounds used as a source of carbon, nitrogen and energy by *A. tumefaciens* populations (Gelvin, 2018; Wang *et al.*, 2019). Tumours caused by *A. tumefaciens* are

Citation: Sánchez-Jiménez E, Aranda-Ocampo S, Ochoa-Martínez DL, Mejía-Sánchez D. 2022. Native bacteria in raspberry crown gall reduce the severity of *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrociencia. 56(8): 1533-1557. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2871>

Editor in Chief:

Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: July 01, 2022.

Approved: October 03, 2022.

Published in Agrociencia:

December 15, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



considered specific ecological niches in which approximately 40 types of opines of different chemical composition have been identified (Meyer *et al.*, 2019).

Agrobacterium species harbouring the Ti plasmid produce opines in the tumour that can be chemoattractants for other bacterial populations within the same genus, creating a highly specific ecological niche, reducing competition from other microorganisms that are not able to use these opines as an energy source (Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017). However, other studies report that efficient long-term tumour colonization by *Agrobacterium* depends largely on competition for the availability of opines and other nutrients among *Agrobacterium* populations, as well as interaction with the host's native microbiota with the ability to transform these same compounds and colonize the tumour tissue (Meyer *et al.*, 2019).

The use of antagonistic microorganisms in plant pathogen control can be an efficient tool to reduce agrochemical application and integrate ecologically sustainable disease management alternatives (van Lenteren *et al.*, 2018). Research on native microbial antagonists in specific ecological niches has shown that they can be an important source of new bacterial isolates for antibiosis-mediated biological control, nutrient and space competition against phytopathogenic microorganisms (Saikia *et al.*, 2022).

In recent years, the incidence and severity of *A. tumefaciens* has increased in raspberry (*Rubus idaeus*) crops, mainly in nursery-grown seedlings. This is due to the use of grafting or pruning techniques, and the inefficient chemical control of this pathogen. Therefore, it is necessary to generate alternatives that contribute to the efficient management of this pathogen. In this research, it is assumed that raspberry tumour tissue harbours culturable bacterial populations antagonistic against *A. tumefaciens*. The objectives were i) to identify tumorigenic *A. tumefaciens* in raspberry crown gall, ii) to determine the density of native bacterial populations in the crown gall, and iii) to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antagonism against *A. tumefaciens* of the bacteria most frequently isolated from the crown gall.

MATERIALS AND METHODS

Location and duration of the study

This research was carried out in the laboratory of Phytopathogenic Bacteria of the Phytosanitary postgraduate program, and the greenhouse area of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, State of Mexico. The first stage involved the isolation of bacterial populations associated with raspberry crown gall tissue and *Agrobacterium tumefaciens*. The most frequently isolated bacteria were molecularly identified by amplification and partial sequencing of the 16S *rRNA* gene. *A. tumefaciens* was biochemically characterized and identified by direct sequencing of the *virD2* plasmid region and *in vitro* pathogenicity tests. In the second stage, the *in vitro* antagonism of the bacteria most frequently isolated from the crown gall was evaluated, among which the strains with the highest antagonism index against *A. tumefaciens* were selected. In the third stage, the most efficient antagonists were evaluated in

an *in vivo* model on tomato plants inoculated with *A. tumefaciens* under greenhouse conditions, with relative humidity > 70 %, and temperature between 30 and 33 °C. The research process began in March 2020 and ended in October 2021.

Plant material

In March and August 2020, six samples of raspberry var. Elvira plants were collected from Driscoll's nurseries in Tlaxcala, Mexico (19° 19' 03.9" N, 97° 55' 44.7" W) with crown gall symptoms. The galls collected were of different size and colour (non-lignified tissue). The galls were kept in a cooler with plastic bags for transfer to the laboratory, where they were disinfected with 2 % sodium hypochlorite for 2 min; then, they were washed twice with sterile distilled water and dried on absorbent paper for 5 minutes.

Isolation, pathogenicity and determination of *Agrobacterium tumefaciens* biovar

Isolation of *A. tumefaciens* was performed from 1 g of tissue from the periphery of the gall in 100 mL of sterile distilled water that was kept in agitation at 90 rpm for 30 min, to allow bacterial diffusion. From this suspension, 20 µL were plated on D1-M culture medium (Schaad *et al.*, 2001; Alippi *et al.*, 2011) and incubated at 28 °C for 72 h. Six colonies (one per gall from each raspberry plant) were purified from the bacterial growth with the morphology described for *A. tumefaciens* on D1-M medium (Alippi *et al.*, 2011). Pathogenicity was determined by inoculation of carrot slices and tomato (*Solanum lycopersicum*) and sunflower (*Helianthus annuus*) plants. Biovar determination was carried out by the method described by Cubero and López (2001).

Isolation of bacterial populations from crown gall

From each gall (n = 6), 1 g of tissue was used in 10 mL of sterile water that was kept at rest for 30 min. From this suspension, serial dilutions were made from 10⁻¹ to 10⁻³, and 100 µL of each dilution were plated with three replicates on nutrient agar (AN) and R2A agar culture medium. Plates were incubated at 28 °C for 48 h. Total bacterial density (UFC g⁻¹ of tissue) was estimated by direct plate count. From the bacterial growth, 13 bacterial colonies with the highest frequency of isolation among the six gall samples were selected by morphology.

Molecular identification of *A. tumefaciens* and native bacteria in the gall

Genomic DNA was obtained with the commercial kit Qiagen® Germany. DNA concentration and quality were checked in a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). The identification of *A. tumefaciens* was performed by direct sequencing of the *virD2* gene with primers A (59-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT) and C (59-TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA), and PCR conditions described by Haas *et al.* (1995). The *virD2* gene sequences were compared with homologous sequences in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

The most frequently isolated native bacteria (n = 13) were identified by partial amplification of the *16S rRNA* gene with primers 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG

CTC AG-3') and 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3'), and PCR conditions described by Baker *et al.* (2003). Amplification was performed on a thermal cycler (C1000 Touch TM Thermal Cycler). The amplified fragments were sequenced at Macrogen Inc. (Korea) and compared at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) using the Blastn algorithm.

In vitro* antagonism of crown gall bacteria against *A. tumefaciens

In vitro antagonism against *A. tumefaciens* of 13 most frequently isolated strains was performed by dual culture on AN medium. Plates were inoculated with 250 μL of a suspension of *A. tumefaciens* with 1×10^7 UFC mL^{-1} adjusted with the McFarland scale and confirmed by plate count on AN medium. Then, the bacteria were inoculated by puncture using a sterile toothpick with bacterial mass and incubated at 28 °C for 72 h. Antagonism was evaluated with four replicates. With the inhibition halo data (mm), an analysis of variance and comparison of means by the Tukey's test ($p \leq 0.05$) were performed with the R program version 3.6.1. Likewise, the Antagonist Efficiency Index (IEA) was calculated by the method described by El-Yazeid *et al.* (2007), which consists of the area of the halo produced by the antagonist divided by the area of colony growth, as it follows:

$$\text{IEA} = \frac{\text{Halo area}}{\text{Colony area}}$$

In vivo* antagonism of crown gall bacteria against *A. tumefaciens

Three bacterial strains that showed *in vitro* antagonism against *A. tumefaciens* were inoculated individually; likewise, eight strains identified as *Pseudomonas* sp. were selected for consortium inoculation from a 48-h pure culture incubated at 28 °C on AN. Individual and consortium inoculation was performed by immersion of root and stem collar of tomato var. Ramses plants 20 d after germination in a suspension containing 1.5×10^8 UFC mL^{-1} for 30 min. The inoculated plants were transplanted in black plastic bags (2 kg) with sterile soil-Agrolita® substrate (75:25), and kept in a greenhouse for seven days with relative humidity > 70 %, and temperature between 30 and 33 °C.

Inoculation of *A. tumefaciens*

Tomato plants were inoculated with *A. tumefaciens* directly on the substrate for seven days with 150 mL of a bacterial suspension of 1×10^7 UFC mL^{-1} . As controls, the following were used: 1) plants inoculated with *A. tumefaciens* without antagonists, and 2) plants irrigated with 150 mL of sterile water on the substrate. The plants were maintained in the greenhouse under the environmental conditions described above for 40 d; the variable analysed was stem length (mm) with tumour development, which was measured with a vernier caliper (Mitutoyo series 530 standard model).

Statistical analysis

The *in vivo* experiment was set up in a greenhouse as a completely randomized design with five replicates. With the data of stem length (mm) with tumours, a descriptive statistical analysis was performed; normality and homogeneity of the data were performed with Shapiro-Wilks and Levene tests respectively, analysis of variance and comparison of means by Tukey's test ($p \leq 0.05$) in R-UCA 4.1.1 (Proyecto R Universidad de Cádiz, <https://knuth.uca.es>).

RESULTS AND DISCUSSION

Six strains (A1-A6) with morphology similar to *A. tumefaciens* were isolated from raspberry galls; out of these, strain A1 caused abnormal tissue proliferation in carrot slices and tumours in tomato and sunflower plants. The observed symptoms confirm the presence of tumorigenic strains of *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes* (Schaad *et al.*, 2001). Strain A1 metabolized sucrose, melezitose, but not dulcitol, erythritol, L-tartaric acid or citrate, and was included in biovar 1, according to the description of biovars by Cubero and López (2001). These results are consistent with the relationship of tumorigenic strains of *A. tumefaciens* with biovar 1, which have high adaptive capacity to colonize niches such as soil, water, and plants (Gelvin, 2018). By PCR, strain A1 amplified an approximate 450 bp fragment reported by Haas *et al.* (1995) for the *virD2* gene.

Sequence comparison at the National Center of Biotechnology Information (NCBI) gene bank showed 98 % similarity to the *Agrobacterium tumefaciens virD2* gene sequence (Accession number LC05233232.1). The *virD2* gene is part of the Ti plasmid sequence and is considered essential for the initiation of the infection process, colonization and insertion of the plasmid into the host plant genome. *Agrobacterium* species lacking the *virD2* gene lose their tumorigenic capacity (Gelvin, 2018); therefore, the results confirm that strain A1 used in this research corresponds to tumorigenic *A. tumefaciens*. The results of this research demonstrated that different densities (UFC g⁻¹ of tissue) of native bacterial populations outside the genus *Agrobacterium* colonize raspberry gall tissue. However, the results of the statistical analysis showed no significant difference in population density between the galls in both culture media (AN and R2A). Among the bacterial populations isolated from the six galls, diversity was limited, identifying 13 different bacterial morphotypes with the highest frequency of isolation.

Bacteria colonizing the same niche can establish beneficial or competitive relationships (Platt *et al.*, 2012). It is known that *A. tumefaciens* can coexist with a large number of bacteria in the soil and rhizosphere; however, coexistence in the tumour with other microorganisms has been little explored. During gall development, *A. tumefaciens* can induce the production of various kinds of opines such as nopaline, agrocinopine and octopine, which *A. tumefaciens* uses as carbon and energy sources, creating a highly specific ecological niche for its life cycle (Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017). However, the specific opines used by *A. tumefaciens* could favour the establishment of other bacterial species (Nester, 2015), able to use these same compounds as carbon sources,

colonize the gall tissue and possibly establish a competitive relationship (Lacroix and Citovsky, 2019).

In other plant species, approximately 40 different opine types have been characterized in tumours caused by *A. tumefaciens* (Meyer *et al.*, 2019); therefore, the results of this research would suggest that the types of opine synthesized in the raspberry tumour and other organic and mineral compounds defined by the host, influence the density and limit the bacterial diversity that colonize the same tumour tissue. Among the bacterial populations in raspberry tumours, 83 bacteria were isolated, among which 13 morphotypes (16 %) were identified with the highest frequency of isolation.

Comparison of 16S rRNA gene sequences in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene bank identified 8 strains (61.5 %) in the genus *Pseudomonas*, with a percentage of similarity between 95.9 and 100 %: *P. putida*, *P. citronellolis*, and *P. plecoglossicida*; 2 strains (15.3 %) in the genus *Bacillus*: *B. subtilis* and *B. halotolerans*; and 3 strains (23 %) as *Delftia* sp. and *Alcaligenes faecalis*. *Pseudomonas* spp. were the most abundant colonizers in the tumour tissue (Table 1).

Pseudomonas is the genus with the highest abundance and adaptation in numerous ecological niches; they are identified as microorganisms with great competitive ability due to their capacity to metabolize a wide range of organic compounds as energy sources (Hesse *et al.*, 2018). The results of this research are congruent with other studies demonstrating that *Pseudomonas* and *Agrobacterium* species can establish close communication in tumour tissue. Some *Pseudomonas* species have been found to coexist efficiently with *Agrobacterium* due to the expression of genes for the biotransformation of opines produced in the tumour by *A. tumefaciens* (An *et al.*, 2006).

In this study, *P. putida* (15.3 % frequency) was identified (Table 1) as the most frequent *Pseudomonas* species within crown gall tissue. Some strains of *P. putida* can metabolize specific opines such as mannopine in tumours caused by *A. tumefaciens* (Meyer *et*

Table 1. Molecular identification by partial amplification of the 16S rRNA gene of 13 strains most frequently isolated from raspberry gall tissue.

ID strain	Gall sample	Identification	Accession number
AAC2	A2	<i>Delftia</i> sp.	OP740740
AAC12	A3	<i>Pseudomonas putida</i>	OP763643
AAC8	A5	<i>Pseudomonas</i> sp.	OP740746
AAC3	A6	<i>Pseudomonas</i> sp.	OP740741
AAC11	A1	<i>Pseudomonas putida</i>	OP776662
AAC9	A4	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	OP740745
AAC1	A4	<i>Alcaligenes faecalis</i>	OP776337
AAC4	A2	<i>Pseudomonas</i> sp.	OP740742
AAC13	A3	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	OP740747
AAC10	A1	<i>Bacillus subtilis</i>	OP776663
AAC6	A2	<i>Bacillus halotolerans</i>	OP740743
AAC5	A6	<i>Alcaligenes faecalis</i>	OP776661
AAC7	A5	<i>Pseudomonas</i> sp.	OP740744

al., 2019). Also, a study by Bell *et al.* (1990) showed that some *Pseudomonas* species were more efficient at metabolizing octopine *in vitro* in co-culture with *A. tumefaciens*. *Pseudomonas* spp. are natural root colonizers, mainly inhabiting the epidermis and exudation sites in plants (An *et al.*, 2006). In tumours caused by *A. tumefaciens*, abundant exudation of water and nutrients occur, which may also explain the more frequent success in colonizing these tissues.

In vitro antagonism against *A. tumefaciens* of the 13 bacterial strains most frequently isolated from raspberry tumours showed that strains *Delftia* sp. (AAC2), *Alcaligenes faecalis* (AAC5), and *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) were antagonistic against *A. tumefaciens*. Results of the IEA statistical analysis showed differences ($p \leq 0.05$) among the strains. The highest degree of antagonism was observed with *Alcaligenes faecalis* (AAC5), followed by *Delftia* sp. (AAC2). With *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) there was no significant difference (Figure 1).

In the *in vivo* antagonism assay, tomato var. Ramses plants were susceptible to *A. tumefaciens* infection. With the interaction of antagonists + *A. tumefaciens*, no treatment suppressed infection and tumour development; however, with the data of length (mm) of infected stem (tumour development), the results of the statistical analysis showed differences ($p \leq 0.05$) between treatments. With the inoculation of *Alcaligenes faecalis* (AAC5), stem length with tumours was less than the rest of the antagonists, followed by *Delftia* sp. (AAC2) and *Pseudomonas citronellolis* (AAC9). With the inoculation of *Pseudomonas* spp. consortium (CPS) there was no difference with the control (Table 2). At 40 d after inoculation (ddi), tumours of different sizes developed in the neck and stem of the plants in all treatments. Inoculation with *Alcaligenes faecalis* (AAC5) was less severe than the rest of the treatments (Figure 2).

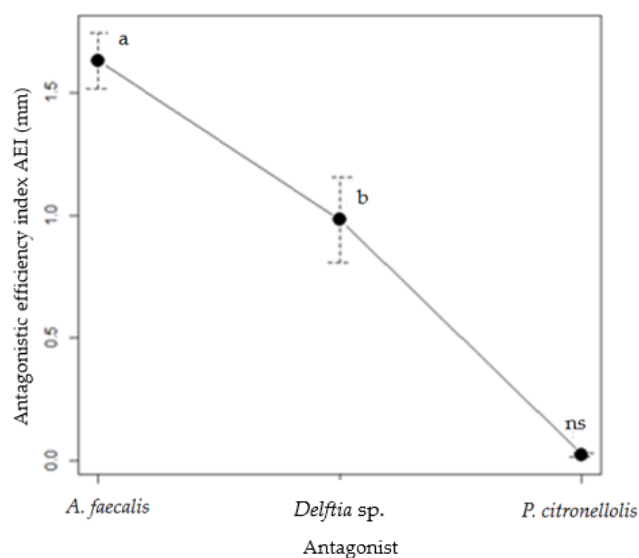


Figure 1. Antagonism Efficiency Index (mm) of native bacteria on raspberry gall against *A. tumefaciens*. According to Tukey's test, a and b are statistically significant; ns, non-significant.

Table 2. Stem length infected (mm) with tumours on tomato plants with the interaction of antagonists + *A. tumefaciens*. According to Tukey's test, different letters indicate significant variables ($p \leq 0.05$); ns, non-significant.

<i>A. tumefaciens</i> inoculation	Treatment	Average length of infected stems (mm)
Soil-Agrolita® (75:25) sterile substrate	Positive control	106
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	28.92a
	<i>Delftia</i> sp.	39.06b
	<i>P. citronellolis</i>	47.7c
	CPS (<i>Pseudomonas</i> spp. consortium)	66.7ns

With *Delftia* sp. (AAC2), tumours of different sizes developed, dispersed, and a widening of the stem was observed, which may be a response to infection by *A. tumefaciens*. With *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) the tumours were larger and longer on the stem. With the *Pseudomonas* spp. consortium, greater severity was observed. In some areas of the stem, the smaller tumours coalesced to form large areas with tissue protrusions (Figure 2). Control plants watered with sterile water in the substrate did not develop any symptoms.

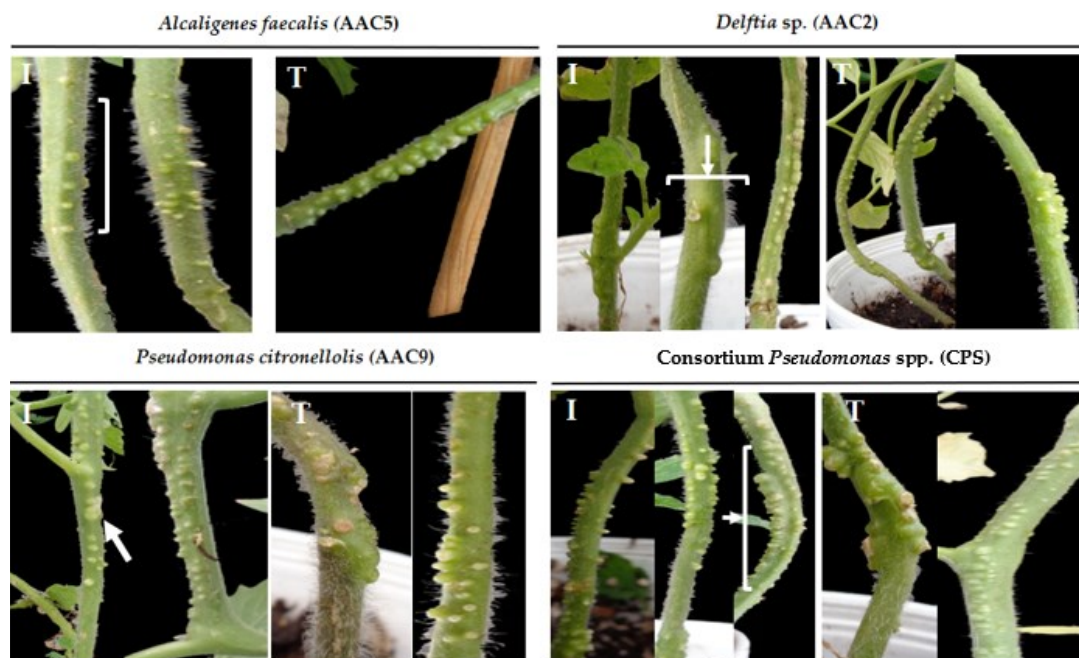


Figure 2. Severity of tumours in the stem of tomato plants var. Ramses after 40 d of antagonistic interaction with *A. tumefaciens*. I: root inoculation 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ of the antagonist + 1×10^7 UFC mL⁻¹ of *A. tumefaciens* for 7 d on substrate; T: inoculation of *A. tumefaciens* on substrate without antagonist.

In this research, *Alcaligenes faecalis* (strain AAC5) showed the highest degree of *in vitro* antagonism and *in vivo* protection in tomato plants against *A. tumefaciens*. Other *A. faecalis* strains used as biocontrol agents showed that their genome harbours genes to produce proteins, antimicrobial peptides and siderophores. *A. faecalis* is considered an ecologically important species and its potential for use in agriculture is broad and functional (Lahlali *et al.*, 2020; Saikia *et al.*, 2022). The *A. faecalis* strain (AAC5) did not suppress *A. tumefaciens* infection in tomato plants; however, it significantly (27 %) reduced tumour severity. Yokoyama *et al.* (2013) related the antagonism of *A. faecalis* to its bacteriostatic activity, which may explain why in this study it only reduced tumour severity without showing bactericidal activity. The high frequency of *A. faecalis* isolation in raspberry tumours may be related to the efficiency to metabolize the type of opines produced in that tissue; other strains of *A. faecalis* have been characterized for their metabolization of phenolic and amino acid compounds (Ray *et al.*, 2020). The interaction between *A. faecalis* and *A. tumefaciens* in other plant species was reported in the study by Limanska *et al.* (2019), who analysed the bacterial community in flowers and grape berries of *Agrobacterium* sp. infected plants. They showed that *A. faecalis* and *Agrobacterium* coexist in this niche, highlighting the ability of the latter to coexist with antagonistic bacteria. This suggests that the presence of *A. faecalis* in raspberry tumours may be related to the interaction with *A. tumefaciens*. Therefore, further studies should focus on elucidating the factors that determine such a relationship, in order to better understand *A. faecalis* potential as a biological control agent against *A. tumefaciens*.

Species within the genus *Delftia* are considered efficient colonizers in different types of plant tissue due to their higher efficiency to metabolize various carbon and amino acid sources (Braña *et al.*, 2016) and to biotransform organic and inorganic compounds, which is why their application in agriculture has been of interest (Cagide *et al.*, 2018). These metabolic characteristics may explain their higher prevalence in raspberry tumour tissue. There are currently no reports of *Delftia* spp. antagonizing *A. tumefaciens* in *in vitro* and *in vivo* assays; however, other research has reported its biocontrol efficiency against phytopathogenic bacteria and as a plant growth promoter mediated by nitrogen fixation and the production of phytohormones, such as gibberellins and auxins that promote root development. Likewise, some species stand out for the production of siderophores, establishing competition for space and nutrients in different niches (Cagide *et al.*, 2018) which can be related to reduced severity and protection in the development of tumours in this research.

Delftia tsuruhatensis, *D. lacustris*, and *D. acidovorans* have been identified as antagonists and biocontrol agents (Han *et al.*, 2005). In this study, identification by partial sequencing of the 16S rRNA gene evidenced the presence of bacteria of the genus *Delftia* in raspberry gall tissue. Phylogenetic analysis showed that this strain is related to *D. acidovorans*, which is identified as a plant growth promoter (Khalifa and Almalki, 2019).

Pseudomonas citronellolis (AAC9) caused less protection against *A. tumefaciens*. However, strains of *P. citronellolis* are considered efficient colonizers of diverse

niches such as root and phyllosphere in plants. Where this bacterium establishes a competitive interaction mainly by the production of siderophores, displacing other bacteria (Remus-Emsermann *et al.*, 2016). The efficient root colonization of this species may explain the protection against *A. tumefaciens*. As a biocontrol agent, strains of *P. citronellolis* are identified as efficient antagonists in the suppression of bacterial diseases in agricultural soils. As well as with *Delftia* sp. there are no reports to our knowledge on the antagonism and protection against *A. tumefaciens* by *P. citronellolis*. Therefore, this study provides the first information on *P. citronellolis* potential as a biocontrol agent against *A. tumefaciens*.

Inoculation of the consortium (strains AAC8, AAC3, AAC4, AAC12, AAC11, AAC9, AAC7, AAC13) of *Pseudomonas* spp. showed no differences with the control. In this regard, the cooperative dynamics between bacterial species for the colonization of a particular niche is known to demand a high competition for nutrients; thus, an optimal population density among bacteria is essential for the functionality of a bacterial consortium (Platt *et al.*, 2012). Due to this, it is possible that the bacterial density of the *Pseudomonas* spp. consortium inoculated in this study (1.5×10^8 UFC mL⁻¹) could be below the appropriate cell density threshold for optimal consortium functionality in protection against *A. tumefaciens*.

In this research, *A. faecalis* (AA5), *Delftia* sp. (AAC2) and *P. citronellolis* (AAC9) strains reduced the severity of tumours caused by *A. tumefaciens*. Other studies highlighted that the efficiency of *A. faecalis* antagonism against bacteria depends on the synthesis of antimicrobial compounds of protein and enzymatic origin, produced mainly in the exponential growth stage (Lahlali *et al.*, 2020). Likewise, Remus and Emsermann *et al.* (2016) demonstrated that efficient protection against plant pathogens by *P. citronellolis* depends on high inoculum densities. On this account, in this study, the antagonistic strains were inoculated at a density of 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ from a pure culture with 48 h of growth. Which requires further study of different inoculum densities, mainly at concentrations over the threshold of 1.5×10^8 UFC mL⁻¹, and growth stages of the antagonists evaluated here onto a plausible increased protection against *A. tumefaciens*.

CONCLUSIONS

Pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 was found in raspberry crown gall tissue with the presence of the *virD2* gene of the tumour-inducing (Ti) plasmid. Different densities of other bacterial populations were found to colonize these galls with limited diversity, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes* and *Delftia* were the most frequent genera. Among these, *Pseudomonas* were the most abundant and frequent colonizers.

Raspberry crown galls harbour bacteria antagonistic against *A. tumefaciens*. *Alcaligenes faecalis*, *Delftia* sp., and *Pseudomonas citronellolis* proved to be *in vitro* antagonists against *A. tumefaciens*. *In vivo* inoculation of these antagonists did not inhibit *A. tumefaciens* infection but did reduce tumour severity. *A. faecalis* isolated from raspberry crown gall was the most efficient *in vitro* and *in vivo* antagonist against *A. tumefaciens*.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Driscoll's Inc., Tlaxcala for providing the raspberry plant material with crown gall. To the Phytosanitary-Phytopathology Postgraduate Program under the Colegio de Postgraduados Campus Montecillo and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of Mexico for the support to conduct this research.

REFERENCES

- Alippi AM, López AC, Balatti PA. 2011. Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Revista Argentina de Microbiología* 43 (4): 278–286.
- An D, Danhorn T, Fuqua C, Parsek MR. 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (10): 3828–3833. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511323103>
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal Microbiological Methods* 55 (3): 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Bell CR, Cummings NE, Canfield ML, Moore LW. 1990. Competition of octopine-catabolizing *Pseudomonas* spp. and octopine-type *Agrobacterium tumefaciens* for octopine in chemostats. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (9): 2840–2846. <https://doi.org/10.1128/aem.56.9.2840-2846.1990>
- Braña V, Cagide C, Morel MA. 2016. The sustainable use of *Delftia* in agriculture, bioremediation, and bioproducts synthesis. In: *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability. Microorganisms for Sustainability*, vol. 1. Castro-Sowinski S. (ed.); Springer: Singapore. pp: 227–247. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_11
- Cagide C, Riviezzi B, Minteguiaga M, Morel MA, Castro-Sowinski S. 2018. Identification of plant compounds involved in the microbe-plant communication during the coinoculation of soybean with *Bradyrhizobium elkanii* and *Delftia* sp. strain JD2. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31 (11): 1192–1199. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-18-0080-CR>
- Cubero J, Lopez MM. 2001. An efficient microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. *European Journal of Plant Pathology* 107: 757–760. <https://doi.org/10.1023/A:1011906912755>
- El-Yazeid AA, Abou-Aly HE, Mady MA, Moussa SAM. 2007. Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using Phosphate dissolving microorganisms (Bio phos-phor®) combined with Boron foliar spray. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3 (4): 274–286.
- Gelvin SB. 2018. *Agrobacterium* Biology: From Basic Science to Biotechnology, Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 418. Springer International Publishing: Cham, Switzerland. 509 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-03257-9>
- Haas JH, Moore LW, Ream W, Manulis S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8): 2879–2884. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2879-2884.1995>
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology* 28 (1): 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.003>
- Hesse C, Schulz F, Bull CT, Shaffer BT, Yan Q, Shapiro N, Hassan KA, Varghese N, Elbourne, LDH, Paulsen IT, Kyrpides N, Woyke T, Loper JE. 2018. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology* 20 (6): 2142–2159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14130>
- Khalifa AYZ, Almalki M. 2019. Polyphasic characterization of *Delftia acidovorans* ESM-1, a facultative methylotrophic bacterium isolated from rhizosphere of *Eruca sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26 (6): 1262–1267. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.015>
- Lacroix B, Citovsky V. 2019. Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. *Annual Review of Phytopathology* 57: 231–251. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100101>

- Lahlali R, Aksissou W, Lyousfi N, Ezrari S, Blenzar A, Tahiri A, Ennahli S, Hrustić J, MacLean D, Amiri S. 2020. Biocontrol activity and putative mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* (SF14 and SP10), *Alcaligenes faecalis* ACBC1, and *Pantoea agglomerans* ACBP1 against brown rot disease of fruit. *Microbial Pathogenesis* 139: 103914. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103914>
- Limanska N, Galkin M, Marynova I, Ivanytsia V. 2019. Detection of phytopathogens *Agrobacterium* spp. and their antagonists *Bacillus thuringiensis*, *Alcaligenes faecalis* and *Lactobacillus plantarum* in flowers and berries of grape. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal* 81 (4): 42–53. <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.042>
- Meyer T, Thiour-Mauprivez C, Wisniewski-Dyé F, Kerzaon I, Comte G, Vial L, Lavire C. 2019. Ecological conditions and molecular determinants involved in *Agrobacterium* lifestyle in tumors. *Frontiers in Plant Science* 10: 978. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00978>
- Nester EW. 2015. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Frontiers in Plant Science* 5: 730. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
- Platt TG, Fuqua C, Bever JD. 2012. Resource and competitive dynamics shape the benefits of public goods cooperation in a plant pathogen. *Evolution* 66 (6): 1953–1965. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01571.x>
- Quispe-Huamanquispe DG, Gheysen G, Kreuze JF. 2017. Horizontal gene transfer contributes to plant evolution: the case of *Agrobacterium* T-DNAs. *Frontiers in Plant Science* 8: 02015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02015>
- Ray S, Swapnil P, Singh P, Singh S, Sarma BK, Singh HB. 2020. Endophytic *Alcaligenes faecalis* mediated redesigning of host defense itinerary against *Sclerotium rolfsii* through induction of phenolics and antioxidant enzymes. *Biological Control* 150: 104355. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104355>
- Remus-Emsermann MNP, Schmid M, Gekenidis M-T, Pelludat C, Frey JE, Ahrens CH, Drissner D. 2016. Complete genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* P3B5, a candidate for microbial phyllo-remediation of hydrocarbon-contaminated sites. *Standards in Genomic Sciences* 11: 75. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0190-6>
- Saikia B, Gogoi S, Savani AK, Bhattacharyya A. 2022. Chapter 5 – Metabolites and peptides of endophytic origin in plant growth promotion and defense reactions in *Solanaceous* crop tomato. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Singh HB, Vaishnav A. (eds.); Elsevier: Amsterdam, Netherlands. pp: 89–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85579-2.00005-8>
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. *Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3rd Edition). American Phytopathological Society Press: St. Paul, MN, USA. 373 p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>
- van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A. 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63: 39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Wang C, Ye F, Chang C, Liu X, Wang J, Wang J, Yan X-F, Fu Q, Zhou J, Chen S, Gao Y-G, Zhang L-H. 2019. *Agrobacterium* reprogram virulence gene expression by controlled release of host-conjugated signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (44): 22331–22340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903695116>
- Yokoyama S-I, Adachi Y, Asakura S, Kohyama E. 2013. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. *The Journal of General and Applied Microbiology* 59 (2): 89–95. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.089>

BACTERIAS NATIVAS EN LA AGALLA DE LA CORONA DE FRAMBUESA REDUCEN LA SEVERIDAD DE *Agrobacterium tumefaciens*

Elizabeth Sánchez-Jiménez¹, Sergio Aranda-Ocampo^{1*},
Daniel Leobardo Ochoa-Martínez¹, Dimas Mejía-Sánchez²

¹ Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Posgrado en Fitosanidad. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56264.

² Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230.

* Autor para correspondencia: saranda@colpos.mx

RESUMEN

Las poblaciones bacterianas nativas en agallas de la corona causadas por *Agrobacterium tumefaciens* pueden albergar bacterias de interés para el biocontrol de este patógeno. En este estudio, se exploró la densidad de poblaciones bacterianas nativas de la agalla de la corona en frambuesa (*Rubus ideaus*) y se evaluó su antagonismo *in vitro* e *in vivo* contra *A. tumefaciens*. De seis muestras de agallas, se aislaron bacterias morfológicamente similares a *A. tumefaciens*, y se identificaron por medio de la secuenciación del gen *virD2*. La densidad de población bacteriana se calculó por conteo directo en placa en los medios agar nutritivo y R2A. El índice de eficiencia de antagonismo *in vitro* contra *A. tumefaciens* de las bacterias más frecuentes se evaluó por confrontación dual en medio agar nutritivo, e *in vivo* por medio de inoculación de 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ en la raíz de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de invernadero. Por secuenciación directa y de caracterización de biovar, se identificó como *A. tumefaciens*, biovar 1 en las agallas de frambuesa. Las poblaciones bacterianas nativas en agallas tienen densidad variable y su diversidad es limitada. Por amplificación parcial del gen *16S rRNA*, se identificaron 13 cepas con mayor frecuencia en los géneros *Pseudomonas* (61.5 %), *Bacillus* (15.3 %), *Alcaligenes* (15.3 %) y *Delftia* (7.6 %). Entre estos, *Alcaligenes faecalis* mostró el mayor índice de antagonismo *in vitro* ($p \leq 0.05$) contra *A. tumefaciens*, seguido de *Delftia* sp. y *Pseudomonas citronellolis*. La inoculación *in vivo* en plantas de tomate de estos antagonistas con *Agrobacterium tumefaciens* no evitan la infección; sin embargo, *Alcaligenes faecalis* redujo significativamente ($p \leq 0.05$) la severidad de tumores en el tallo de las plantas. *A. faecalis* es el antagonista más eficiente *in vitro* e *in vivo* contra *A. tumefaciens*.

Palabras clave: antagonismo, biocontrol, *Rubus* sp., tumor.

INTRODUCCIÓN

Agrobacterium tumefaciens causa tumores (también conocido como “agalla de la corona”) en un amplio rango de plantas dicotiledóneas; la infección ocurre por la transferencia e inserción del plásmido inductor de tumores (Ti) en el genoma de la planta hospedante. Durante el desarrollo del tumor las células oncogénicas sintetizan opinas,

Citation: Sánchez-Jiménez E, Aranda-Ocampo S, Ochoa-Martínez DL, Mejía-Sánchez D. 2022. Bacterias nativas en la agalla de la corona de frambuesa reducen la severidad de *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrociencia. 56(8): 1533-1557. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2871>

Editor in Chief:

Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: July 01, 2022.

Approved: October 03, 2022.

Published in *Agrociencia*:

December 15, 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



que son compuestos específicos utilizados como fuente de carbono, nitrógeno y energía por las poblaciones de *A. tumefaciens* (Gelvin, 2018; Wang *et al.*, 2019). Los tumores causados por *A. tumefaciens* se consideran nichos ecológicos específicos en los cuales se han caracterizado aproximadamente 40 tipos de opinas de composición química diferente (Meyer *et al.*, 2019).

Las especies de *Agrobacterium* que albergan el plásmido Ti producen opinas en el tumor que pueden ser quimioatrayentes para otras poblaciones de bacterias dentro del mismo género, crean un nicho ecológico altamente específico, y reducen la competencia de otros microorganismos que no son capaces de utilizar estas opinas como fuente de energía (Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017). Sin embargo, otros estudios consignan que la colonización eficiente a largo plazo del tumor por *Agrobacterium*, depende en gran medida de la competencia por la disponibilidad de opinas y otros nutrientes entre poblaciones de *Agrobacterium*; así como de la interacción con la microbiota nativa del hospedante con capacidad de transformar estos mismos compuestos y colonizar el tejido del tumor (Meyer *et al.*, 2019).

El uso de microorganismos antagonistas en el control de patógenos en plantas puede ser una herramienta eficiente para reducir la aplicación de agroquímicos e integrar alternativas de manejo de enfermedades ecológicamente sustentables (van Lenteren *et al.*, 2018). Investigaciones sobre antagonistas microbianos nativos en nichos ecológicos específicos han mostrado que pueden ser una fuente importante de nuevos aislamientos bacterianos para el control biológico mediado por antibiosis, competencia por nutrientes y espacio contra microorganismos fitopatógenos (Saikia *et al.*, 2022).

En años recientes, se ha incrementado la incidencia y severidad de *A. tumefaciens* en el cultivo de frambuesa (*Rubus idaeus*), principalmente en plántulas producidas en vivero. Lo anterior es debido al manejo de técnicas de injertos o podas y al ineficiente control químico de este patógeno. Por lo tanto, es necesario generar alternativas que contribuyan al manejo eficiente de este patógeno. En esta investigación, se asume que el tejido de los tumores de frambuesa alberga poblaciones bacterianas cultivables antagonistas contra *A. tumefaciens*. Los objetivos fueron i) identificar a *A. tumefaciens* tumorigénico en la agalla de la corona en frambuesa, ii) determinar la densidad de poblaciones bacterianas nativas en la agalla de la corona, y iii) evaluar el antagonismo *in vitro* e *in vivo* contra *A. tumefaciens* de las bacterias aisladas con mayor frecuencia de la agalla de la corona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y duración de la investigación

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Bacterias Fitopatógenas del área de Fitosanidad e invernaderos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. En la primera etapa se realizó el aislamiento de poblaciones bacterianas asociadas con el tejido de la agalla de la corona de frambuesa y de *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias aisladas con mayor frecuencia se identificaron molecularmente

por amplificación y secuenciación parcial del gen *16S rRNA*. *A. tumefaciens* se caracterizó bioquímicamente y se identificó por secuenciación directa de la región plasmídica *virD2* y por pruebas de patogenicidad *in vitro*. En la segunda etapa se evaluó el antagonismo *in vitro* de las bacterias aisladas con mayor frecuencia de la agalla de la corona, entre las cuales se seleccionaron las cepas con el mayor índice de antagonismo contra *A. tumefaciens*. En la tercera etapa se evaluaron los antagonistas más eficientes en un modelo *in vivo* en plantas de tomate inoculadas con *A. tumefaciens* en condiciones de invernadero, con una humedad relativa > 70 % y temperatura entre 30 y 33 °C. El proceso de investigación inició en marzo del 2020 y finalizó en octubre del 2021.

Material vegetal

En marzo y agosto del 2020, se recolectaron seis muestras de plantas de frambuesa var. Elvira en viveros de Driscoll's Tlaxcala, México (19° 19' 03.9" N, 97° 55' 44.7" O) con síntomas de agalla de la corona. Las agallas recolectadas fueron de diferente tamaño y color (tejido no lignificado). Las agallas se mantuvieron en una hielera con bolsas plásticas para su traslado al laboratorio, donde se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min; luego, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente durante 5 minutos.

Aislamiento, patogenicidad y determinación del biovar de *Agrobacterium tumefaciens*

El aislamiento de *A. tumefaciens* se realizó a partir de 1 g de tejido de la periferia de la agalla en 100 mL de agua destilada estéril que se mantuvo en agitación a 90 rpm durante 30 min para permitir la difusión bacteriana. De esta suspensión, se sembraron 20 µL en medio de cultivo D1-M (Schaad *et al.*, 2001; Alippi *et al.*, 2011) y se incubaron a 28 °C durante 72 h. A partir del crecimiento bacteriano se purificaron seis colonias (una por agalla de cada planta de frambuesa) con la morfología descrita para *A. tumefaciens* en el medio D1-M (Alippi *et al.*, 2011). La patogenicidad se determinó por inoculación en rodajas de zanahoria y plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y girasol (*Helianthus annuus*). La determinación del biovar se llevó a cabo por el método descrito por Cubero y López (2001).

Aislamiento de poblaciones bacterianas de la agalla de la corona

De cada agalla (n = 6), se utilizó 1 g de tejido en 10 mL de agua estéril que se mantuvo en reposo durante 30 min. De esta suspensión, se realizaron diluciones en serie desde 10⁻¹ hasta 10⁻³ y se sembraron 100 µL de cada dilución con tres repeticiones en medio de cultivo agar nutritivo (AN) y agar R2A. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Se estimó la densidad bacteriana total (UFC g⁻¹ de tejido) por conteo directo en placa. Del crecimiento bacteriano se seleccionaron por morfología 13 colonias bacterianas con mayor frecuencia de aislamiento entre las seis muestras de agallas.

Identificación molecular de *A. tumefaciens* y de bacterias nativas en la agalla

El DNA genómico se obtuvo con el kit comercial Qiagen® Alemania. La concentración y calidad del DNA se verificó en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La identificación de *A. tumefaciens* se realizó por secuenciación directa del gen *virD2* con los iniciadores A (59-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT) y C (59-TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA) y condiciones de PCR descritos por Haas *et al.* (1995). Las secuencias del gen *virD2* se compararon con secuencias homólogas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Las bacterias nativas aisladas con mayor frecuencia (n = 13) se identificaron por amplificación parcial del gen *16S rRNA* con los iniciadores 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') y condiciones de PCR descritos por Baker *et al.* (2003). La amplificación se realizó en un termociclador (C1000 Touch TM Thermal Cycler). Los fragmentos amplificados se secuenciaron en Macrogen Inc. (Korea) y se compararon en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) con el uso del algoritmo Blastn.

Antagonismo *in vitro* de bacterias de la agalla de la corona contra *A. tumefaciens*

El antagonismo *in vitro* contra *A. tumefaciens* de 13 cepas aisladas con mayor frecuencia se realizó por cultivo dual en medio AN. Las placas se inocularon con 250 µL de una suspensión de *A. tumefaciens* con 1×10^7 UFC mL⁻¹ ajustado con la escala de McFarland y confirmado por recuento en placa en medio AN. Después, las bacterias se inocularon por punción con un palillo estéril con masa bacteriana y se incubaron a 28 °C por 72 h. El antagonismo se evaluó con cuatro repeticiones. Con los datos del halo de inhibición (mm) se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa R versión 3.6.1. Así mismo, se calculó el Índice de Eficiencia Antagonista (IEA) por el método descrito por El-Yazeid *et al.* (2007) que consiste en dividir el área del halo producido por el antagonista entre el área del crecimiento de la colonia, como sigue:

$$\text{IEA} = \frac{\text{Área del halo}}{\text{Área de la colonia}}$$

Antagonismo *in vivo* de bacterias de la agalla de la corona contra *A. tumefaciens*

Tres cepas bacterianas que mostraron antagonismo *in vitro* contra *A. tumefaciens* se inocularon individualmente; asimismo, se seleccionaron ocho cepas identificadas como *Pseudomonas* sp. para su inoculación en consorcio a partir de un cultivo puro de 48 h incubados a 28 °C en AN. La inoculación individual y del consorcio se realizó por inmersión de raíz y cuello del tallo de plantas de tomate var. Ramsés 20 d después de la germinación en una suspensión con 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ durante 30 min. Las plantas inoculadas se trasplantaron en bolsas de plástico negro (2 kg) con sustrato tierra-Agro-lita® (75:25) estéril y se mantuvieron en invernadero por siete días con una humedad relativa > 70 % y temperatura entre 30 y 33 °C.

Inoculación de *A. tumefaciens*

Las plantas de tomate fueron inoculadas con *A. tumefaciens* directamente sobre el sustrato durante 7 días con 150 mL de una suspensión bacteriana de 1×10^7 UFC mL⁻¹. Como testigos se utilizaron: 1) plantas inoculadas con *A. tumefaciens* sin antagonistas, y 2) plantas con riego de 150 mL de agua estéril en el sustrato. Las plantas se mantuvieron en invernadero bajo las condiciones ambientales descritas anteriormente durante 40 d; la variable analizada fue la longitud del tallo (mm) con desarrollo de tumores, la cual se midió con un calibrador vernier (Mitutoyo serie 530 modelo estándar).

Análisis estadístico

El experimento *in vivo* se estableció en invernadero como diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Con los datos de la longitud del tallo (mm) con tumores, se realizó un análisis estadístico descriptivo; la normalidad y homogeneidad de los datos se realizaron con las pruebas Shapiro-Wilks y Levene respectivamente, el análisis de varianza y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) en R-UCA 4.1.1 (Proyecto R Universidad de Cádiz, <https://knuth.uca.es>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las agallas de frambuesa se aislaron seis cepas (A1-A6) con morfología similar a *A. tumefaciens*; de estas, la cepa A1 causó proliferación anormal de tejido en rodajas de zanahoria y tumores en plantas de tomate y girasol. Los síntomas observados confirman la presencia de cepas tumorigénicas de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* (Schaad *et al.*, 2001). La cepa A1 metabolizó sacarosa, melecitosa, pero no dulcitol, eritritol, L-tartárico ni citrato, y se incluyó en el biovar 1 de acuerdo con la descripción de biovars por Cubero y López (2001). Estos resultados son consistentes con la relación de cepas tumorigénicas de *A. tumefaciens* con el biovar 1, las cuales tienen gran capacidad de adaptación para colonizar nichos como suelo, agua y plantas (Gelvin, 2018). Por PCR, la cepa A1 amplificó un fragmento aproximado de 450 pb reportado por Haas *et al.* (1995) para el gen *virD2*.

La comparación de la secuencia en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) mostró 98 % de similitud con la secuencia del gen *virD2* de *Agrobacterium tumefaciens* (Número de acceso LC052332.1). El gen *virD2* es parte de la secuencia del plásmido Ti y se considera fundamental para el inicio del proceso de infección, colonización e inserción del plásmido en el genoma de la planta hospedante. Las especies de *Agrobacterium* que carecen del gen *virD2* pierden su capacidad tumorigénica (Gelvin, 2018); por lo anterior, los resultados confirman que la cepa A1 utilizada en esta investigación corresponde a *A. tumefaciens* tumorigénica. Los resultados de esta investigación demostraron que en el tejido de las agallas de frambuesa colonizan diferentes densidades (UFC g⁻¹ de tejido) de poblaciones bacterianas nativas fuera del género *Agrobacterium*. Sin embargo, los resultados del análisis estadístico no mostraron diferencia significativa en la densidad de poblaciones entre las agallas en ambos medios de cultivo (AN y R2A). Entre las poblaciones bacterianas aisladas de las seis agallas, la diversidad fue limitada; se identificaron 13 morfotipos bacterianos diferentes con la mayor frecuencia de aislamiento.

Las bacterias que colonizan un mismo nicho pueden establecer relaciones benéficas o de competencia (Platt *et al.*, 2012). Se conoce que *A. tumefaciens* puede convivir con un gran número de bacterias en el suelo y la rizosfera; sin embargo, la coexistencia en el tumor con otros microorganismos ha sido poco explorada. Durante el desarrollo de la agalla, *A. tumefaciens* puede inducir la producción de diversas clases de opinas como nopalina, agropipina y octopina las cuales utiliza como fuentes de carbono y energía para crear un nicho ecológico altamente específico para su ciclo de vida (Quispe-Huamánquispe *et al.*, 2017). Sin embargo, se consigna que las opinas específicas utilizadas por *A. tumefaciens* podrían favorecer el establecimiento de otras especies bacterianas (Nester, 2015), capaces de utilizar estos mismos compuestos como fuentes de carbono, colonizar el tejido de la agalla y establecer posiblemente una relación de competencia (Lacroix y Citovsky, 2019).

En otras especies de plantas se han caracterizado aproximadamente 40 tipos de opinas diferentes en los tumores causados por *A. tumefaciens* (Meyer *et al.*, 2019); por lo anterior, los resultados de esta investigación podrían sugerir que los tipos de opinas sintetizados en el tumor de frambuesa y otros compuestos orgánicos y minerales definidos por el hospedante, influyen la densidad y limitan la diversidad bacteriana que colonizan el mismo tejido del tumor. Entre las poblaciones bacterianas en los tumores de frambuesa se aislaron 83 bacterias, entre las cuales se identificaron 13 morfotipos (16 %) con mayor frecuencia de aislamiento.

La comparación de las secuencias del gen *16S rRNA* en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) identificaron con un porcentaje de similitud entre 95.9 y 100 % a 8 cepas (61.5 %) en el género *Pseudomonas*: *P. putida*, *P. citronellolis*, y *P. plecoglossicida*; 2 cepas (15.3 %) en el género *Bacillus*: *B. subtilis* y *B. halotolerans*; y 3 cepas (23 %) como *Delftia* sp. y *Alcaligenes faecalis*. *Pseudomonas* spp. fueron los colonizadores más abundantes en el tejido del tumor (Cuadro 1).

Cuadro 1. Identificación molecular por amplificación parcial del gen *16S rRNA* de 13 cepas aisladas con mayor frecuencia del tejido de agallas de frambuesa.

ID cepa	Muestra agalla	Identificación	Número de accesoión
AAC2	A2	<i>Delftia</i> sp.	OP740740
AAC12	A3	<i>Pseudomonas putida</i>	OP763643
AAC8	A5	<i>Pseudomonas</i> sp.	OP740746
AAC3	A6	<i>Pseudomonas</i> sp.	OP740741
AAC11	A1	<i>Pseudomonas putida</i>	OP776662
AAC9	A4	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	OP740745
AAC1	A4	<i>Alcaligenes faecalis</i>	OP776337
AAC4	A2	<i>Pseudomonas</i> sp.	OP740742
AAC13	A3	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	OP740747
AAC10	A1	<i>Bacillus subtilis</i>	OP776663
AAC6	A2	<i>Bacillus halotolerans</i>	OP740743
AAC5	A6	<i>Alcaligenes faecalis</i>	OP776661
AAC7	A5	<i>Pseudomonas</i> sp.	OP740744

Pseudomonas es el género de mayor abundancia y adaptación en numerosos nichos ecológicos; se identifican como microorganismos con alta capacidad competitiva por su habilidad de metabolizar una amplia gama de compuestos orgánicos como fuentes de energía (Hesse *et al.*, 2018). Los resultados de esta investigación son congruentes con otros estudios que demuestran que especies de *Pseudomonas* y *Agrobacterium* pueden establecer una comunicación estrecha en el tejido del tumor. Se han identificado algunas especies de *Pseudomonas* que coexisten eficientemente con *Agrobacterium* debido a la expresión de genes para la biotransformación de opinas producidas en el tumor por *A. tumefaciens* (An *et al.*, 2006).

En este estudio se identificó a *P. putida* (frecuencia de 15.3 %) (Cuadro 1), como la especie de *Pseudomonas* más frecuente dentro del tejido de la agalla de la corona. Algunas cepas de *P. putida* pueden metabolizar opinas específicas como manopina en tumores causados por *A. tumefaciens* (Meyer *et al.*, 2019). Así mismo, un estudio realizado por Bell *et al.* (1990) demostró que algunas especies de *Pseudomonas* fueron más eficientes para metabolizar octopina *in vitro* en co-cultivo con *A. tumefaciens*. *Pseudomonas* spp. naturalmente son colonizadoras de la raíz, principalmente habitan en la epidermis y sitios de exudación en plantas (An *et al.*, 2006). En los tumores causados por *A. tumefaciens* ocurre abundante exudación de agua y nutrientes, lo cual también puede explicar el éxito para colonizar con mayor frecuencia estos tejidos.

El antagonismo *in vitro* contra *A. tumefaciens* de las 13 cepas bacterianas aisladas con mayor frecuencia de los tumores de frambuesa, mostró que las cepas *Delftia* sp. (AAC2), *Alcaligenes faecalis* (AAC5) y *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) fueron antagonistas contra *A. tumefaciens*. Los resultados del análisis estadístico del IEA mostraron diferencias ($p \leq 0.05$) entre las cepas. El mayor grado de antagonismo se observó con *Alcaligenes faecalis* (AAC5), seguido de *Delftia* sp. (AAC2). Con *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) no hubo diferencia significativa (Figura 1).

En el ensayo de antagonismo *in vivo*, las plantas de tomate var. Ramsés fueron susceptibles a la infección por *A. tumefaciens*. Con la interacción de los antagonistas + *A. tumefaciens*, ningún tratamiento suprimió la infección y desarrollo de tumores; sin embargo, con los datos de la longitud (mm) del tallo infectado (desarrollo de tumores), los resultados del análisis estadístico mostraron diferencias ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos. Con la inoculación de *Alcaligenes faecalis* (AAC5), la longitud del tallo con tumores fue menor que el resto de los antagonistas, seguido de *Delftia* sp. (AAC2) y *Pseudomonas citronellolis* (AAC9). Con la inoculación de consorcio de *Pseudomonas* spp. (CPS) no hubo diferencia con el testigo (Cuadro 2).

A los 40 d después de la inoculación (ddi), en todos los tratamientos se desarrollaron tumores de diferente tamaño en el cuello y tallo de las plantas. Con la inoculación de *Alcaligenes faecalis* (AAC5) se observó menor severidad que el resto de los tratamientos (Figura 2).

Con *Delftia* sp. (AAC2) se desarrollaron tumores de diferente tamaño, dispersos, y se observó un ensanchamiento del tallo, lo cual puede ser una respuesta a la infección por *A. tumefaciens*. Con *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) los tumores fueron de mayor

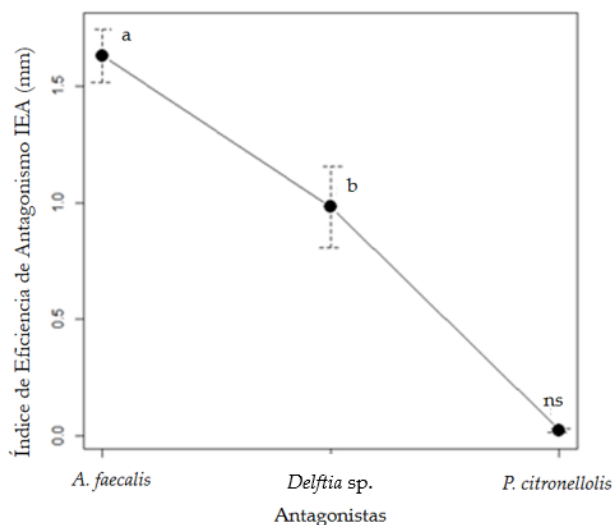


Figura 1. Índice de Eficiencia de Antagonismo (mm) de bacterias nativas en la agalla de frambuesa contra *A. tumefaciens*. De acuerdo con la prueba de Tukey, a y b son estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$); ns, no significativo.

Cuadro 2. Longitud del tallo infectado (mm) con tumores en plantas de tomate con la interacción de los antagonistas + *A. tumefaciens*. De acuerdo con la prueba de Tukey, literales diferentes indican variables significativas ($p \leq 0.05$); ns, no significativa.

Inoculación <i>A. tumefaciens</i>	Tratamiento	Promedio de longitud del tallo infectado (mm)
Sustrato tierra-Agrolita® (75:25) estéril	Testigo positivo	106
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	28.92a
	<i>Delftia sp.</i>	39.06b
	<i>P. citronellolis</i>	47.7c
	CPS (Consortio <i>Pseudomonas spp.</i>)	66.7ns

tamaño y longitud en el tallo. Con el consorcio de *Pseudomonas spp.* se observó mayor severidad; en algunas zonas del tallo los tumores más pequeños coalescieron y formaron áreas amplias con protuberancias del tejido (Figura 2). Las plantas testigo regadas con agua estéril en el sustrato no desarrollaron ningún síntoma.

En esta investigación, *Alcaligenes faecalis* (cepa AAC5) mostró el mayor grado de antagonismo *in vitro* y protección *in vivo* en plantas de tomate contra *A. tumefaciens*. Otras cepas de *A. faecalis* utilizadas como agentes de biocontrol mostraron que su genoma alberga genes para producir proteínas, péptidos antimicrobianos y sideróforos. *A. faecalis* se considera una especie de importancia ecológica y su potencial para utilizarse en la agricultura es amplia y funcional (Lahlali *et al.*, 2020; Saikia *et al.*, 2022). La cepa

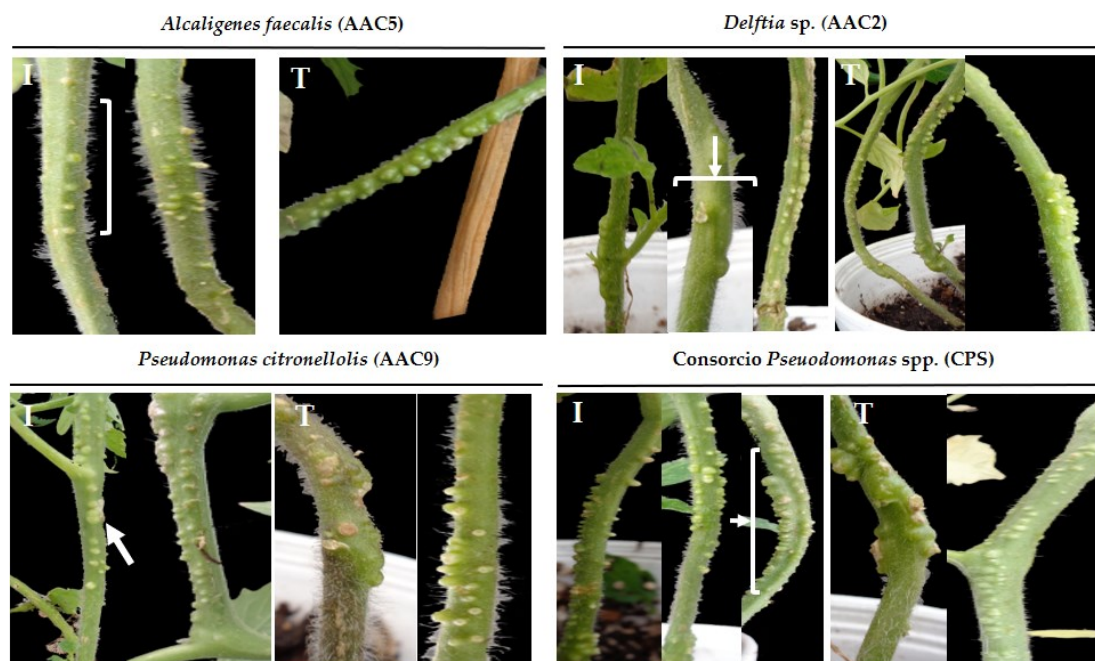


Figura 2. Severidad de tumores en el tallo de plantas de tomate var. ramsés a los 40 d de interacción de antagonistas con *A. tumefaciens*. I: inoculación en raíz con 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ del antagonista + 1×10^7 UFC mL⁻¹ de *A. tumefaciens* durante 7 d en el sustrato; T: inoculación de *A. tumefaciens* en el sustrato sin antagonista.

A. faecalis (AAC5) no suprimió la infección por *A. tumefaciens* en plantas de tomate; sin embargo, redujo significativamente (27 %) la severidad de tumores. Yokoyama *et al.* (2013) relacionaron el antagonismo de *A. faecalis* con su actividad bacteriostática, lo cual puede explicar que en este estudio solamente redujo la severidad de tumores sin mostrar actividad bactericida. La alta frecuencia de aislamiento de *A. faecalis* en los tumores de frambuesa se puede relacionar con la eficiencia para metabolizar el tipo de opinas que se producen en ese tejido; otras cepas de *A. faecalis* se han caracterizado por su metabolización de componentes fenólicos y aminoácidos (Ray *et al.*, 2020).

La interacción entre *A. faecalis* y *A. tumefaciens* en otras especies de plantas se reportó con el estudio de Limanska *et al.* (2019), quienes analizaron la comunidad bacteriana en flores y bayas de uva de plantas infectadas por *Agrobacterium* sp. Esos autores demostraron que *A. faecalis* y *Agrobacterium* coexisten en este nicho, y destacaron la capacidad de convivencia de *Agrobacterium* con bacterias antagónicas. Lo anterior sugiere que la presencia de *A. faecalis* en los tumores de frambuesa puede estar relacionada con la interacción con *A. tumefaciens*. Por lo anterior, estudios futuros se deben enfocar en dilucidar los factores que determinan dicha relación, para entender con mayor profundidad el potencial de *A. faecalis* como agente de control biológico en contra de *A. tumefaciens*.

Especies dentro del género *Delftia* se consideran colonizadores eficientes en diferentes tipos de tejido de plantas por su mayor eficiencia para metabolizar diversas fuentes de carbono y aminoácidos (Braña *et al.*, 2016) y biotransformar compuestos orgánicos e inorgánicos, por lo cual ha sido de interés su aplicación en la agricultura (Cagide *et al.*, 2018). Estas características metabólicas pueden explicar su mayor prevalencia en el tejido de tumores de frambuesa. En la actualidad no hay reportes de *Delftia* spp. antagonistas de *A. tumefaciens* en ensayos *in vitro* e *in vivo*; sin embargo, otras investigaciones reportaron su eficiencia de biocontrol contra bacterias fitopatógenas y como promotora de crecimiento de plantas mediado por la fijación de nitrógeno y la producción de fitohormonas, como giberelinas y auxinas que promueven el desarrollo de raíces. Así mismo, algunas especies se destacan por la producción de sideróforos que establecen competencia por espacio y nutrientes en diferentes nichos (Cagide *et al.*, 2018) lo cual se puede relacionar con la reducción en la severidad y la protección en el desarrollo de tumores en esta investigación. Como antagonistas y agentes de biocontrol se han identificado a *Delftia tsuruhatensis*, *D. lacustris* y *D. acidovorans* (Han *et al.*, 2005). En este estudio, la identificación por medio de la secuenciación parcial del gen *16S rRNA* evidenció la presencia de bacterias del género *Delftia* en el tejido de la agalla de frambuesa. El análisis filogenético mostró que esta cepa se relaciona con *D. acidovorans*, la cual se identifica como promotora de crecimiento de plantas (Khalifa y Almalki, 2019). *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) causó menor protección contra *A. tumefaciens*. Sin embargo, cepas de *P. citronellolis* se identifican como eficientes colonizadores de diversos nichos como raíz y filósfera en plantas, donde establece una interacción de competencia principalmente por la producción de sideróforos que desplazan a otras bacterias (Remus-Emsermann *et al.*, 2016). La eficiente colonización de raíces de esta especie puede explicar la protección contra *A. tumefaciens*. Como agente de biocontrol, cepas de *P. citronellolis* se identifican como antagonistas eficientes en la supresión de enfermedades bacterianas en suelos agrícolas. Al igual que con *Delftia* sp., no existen reportes sobre el antagonismo y protección contra *A. tumefaciens* de *P. citronellolis* de los cuales se sepa hasta el momento. Por lo tanto, este estudio aporta la primera información sobre el potencial de *P. citronellolis* como agente de biocontrol contra *A. tumefaciens*. La inoculación del consorcio (cepas AAC8, AAC3, AAC4, AAC12, AAC11, AAC9, AAC7, AAC13) de *Pseudomonas* spp. no mostró diferencias con el testigo. Al respecto, se conoce que la dinámica cooperativa entre especies bacterianas para la colonización de un nicho en particular demanda una alta competencia por nutrientes, por lo cual una densidad poblacional óptima entre las bacterias es fundamental para la funcionalidad de un consorcio bacteriano (Platt *et al.*, 2012). Por lo anterior, es posible que la densidad bacteriana del consorcio de *Pseudomonas* spp. inoculada en este estudio (1.5×10^8 UFC mL⁻¹) pudo haber estado por debajo del umbral de densidad celular adecuado para la óptima funcionalidad del consorcio en la protección contra *A. tumefaciens*. En esta investigación, las cepas *A. faecalis* (AA5), *Delftia* sp. (AAC2) y *P. citronellolis* (AAC9) redujeron la severidad de tumores causados por *A. tumefaciens*. Otros estudios destacaron que la eficiencia del antagonismo de *A. faecalis* contra bacterias depende

de la síntesis de compuestos antimicrobianos de origen proteico y enzimático, producidas principalmente en la etapa de crecimiento exponencial (Lahlali *et al.*, 2020). Así mismo, Remus y Emsermann *et al.* (2016) demostraron que la eficiente protección contra fitopatógenos por *P. citronellolis* depende de altas densidades de inóculo. En seguimiento a esto, en este estudio, las cepas antagonistas se inocularon con una densidad 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ a partir de un cultivo puro con 48 h de crecimiento. Lo cual debería profundizarse hacia el estudio de diferentes densidades de inóculo, principalmente en concentraciones por encima del umbral de 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ y etapas de crecimiento de los antagonistas aquí evaluados para promover un incremento factible en la protección contra *A. tumefaciens*.

CONCLUSIONES

En el tejido de la agalla de la corona de frambuesa se encontró *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 patógeno con presencia del gen *virD2* del plásmido inductor de tumores (Ti). Se halló que en estas agallas colonizan densidades diferentes de otras poblaciones bacterianas con limitada diversidad, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes* y *Delftia* fueron los géneros más frecuentes. Entre estos, *Pseudomonas* fueron los colonizadores más abundantes y frecuentes.

La agalla de la corona de frambuesa alberga bacterias antagonistas contra *A. tumefaciens*. *Alcaligenes faecalis*, *Delftia* sp. y *Pseudomonas citronellolis* demostraron ser antagonistas *in vitro* contra *A. tumefaciens*. La inoculación *in vivo* de estos antagonistas no inhibió la infección de *A. tumefaciens* pero sí redujo la severidad de tumores. *A. faecalis* aislada de la agalla de la corona de frambuesa fue el antagonista *in vitro* e *in vivo* más eficiente contra *A. tumefaciens*.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Driscoll's, Tlaxcala por la aportación del material vegetal de frambuesa con agalla de la corona. Al Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo en esta investigación.

REFERENCIAS

- Alippi AM, López AC, Balatti PA. 2011. Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Revista Argentina de Microbiología* 43 (4): 278–286.
- An D, Danhorn T, Fuqua C, Parsek MR. 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (10): 3828–3833. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511323103>
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal Microbiological Methods* 55 (3): 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Bell CR, Cummings NE, Canfield ML, Moore LW. 1990. Competition of octopine-catabolizing *Pseudomonas* spp. and octopine-type *Agrobacterium tumefaciens* for octopine in chemostats. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (9): 2840–2846. <https://doi.org/10.1128/aem.56.9.2840-2846.1990>

- Braña V, Cagide C, Morel MA. 2016. The sustainable use of *Delftia* in agriculture, bioremediation, and bioproducts synthesis. In: Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability. Microorganisms for Sustainability, vol.1. Castro-Sowinski S. (ed.); Springer: Singapore. pp: 227–247. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_11
- Cagide C, Riviezzi B, Minteguiaga M, Morel MA, Castro-Sowinski S. 2018. Identification of plant compounds involved in the microbe-plant communication during the coinoculation of soybean with *Bradyrhizobium elkanii* and *Delftia* sp. strain JD2. Molecular Plant-Microbe Interactions 31 (11): 1192–1199. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-18-0080-CR>
- Cubero J, Lopez MM. 2001. An efficient microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. European Journal of Plant Pathology 107: 757–760. <https://doi.org/10.1023/A:1011906912755>
- El-Yazeid AA, Abou-Aly HE, Mady MA, Moussa SAM. 2007. Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using Phosphate dissolving microorganisms (Bio phos-phor®) combined with Boron foliar spray. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 3 (4): 274–286.
- Gelvin SB. 2018. *Agrobacterium* Biology: From Basic Science to Biotechnology, Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 418. Springer International Publishing: Cham, Switzerland. 509 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-03257-9>
- Haas JH, Moore LW, Ream W, Manulis S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Applied and Environmental Microbiology 61 (8): 2879–2884. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2879-2884.1995>
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. Systematic and Applied Microbiology 28 (1): 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.003>
- Hesse C, Schulz F, Bull CT, Shaffer BT, Yan Q, Shapiro N, Hassan KA, Varghese N, Elbourne, LDH, Paulsen IT, Kyrpidis N, Woyke T, Loper JE. 2018. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. Environmental Microbiology 20 (6): 2142–2159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14130>
- Khalifa AYZ, Almalki M. 2019. Polyphasic characterization of *Delftia acidovorans* ESM-1, a facultative methylotrophic bacterium isolated from rhizosphere of *Eruca sativa*. Saudi Journal of Biological Sciences 26 (6): 1262–1267. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.015>
- Lacroix B, Citovsky V. 2019. Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. Annual Review of Phytopathology 57: 231–251. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-1001>
- Lahlali R, Aksissou W, Lyousfi N, Ezrari S, Blenzar A, Tahiri A, Ennahli S, Hrustić J, MacLean D, Amiri S. 2020. Biocontrol activity and putative mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* (SF14 and SP10), *Alcaligenes faecalis* ACBC1, and *Pantoea agglomerans* ACBP1 against brown rot disease of fruit. Microbial Pathogenesis 139: 103914. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103914>
- Limanska N, Galkin M, Marynova I, Ivanytsia V. 2019. Detection of phytopathogens *Agrobacterium* spp. and their antagonists *Bacillus thuringiensis*, *Alcaligenes faecalis* and *Lactobacillus plantarum* in flowers and berries of grape. Mikrobiolohichniy Zhurnal 81 (4): 42–53. <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.042>
- Meyer T, Thiour-Mauprivez C, Wisniewski-Dyé F, Kerzaon I, Comte G, Vial L, Lavire C. 2019. Ecological conditions and molecular determinants involved in *Agrobacterium* lifestyle in tumors. Frontiers in Plant Science 10: 978. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00978>
- Nester EW. 2015. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. Frontiers in Plant Science 5: 730. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
- Platt TG, Fuqua C, Bever JD. 2012. Resource and competitive dynamics shape the benefits of public goods cooperation in a plant pathogen. Evolution 66 (6): 1953–1965. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01571.x>
- Quispe-Huamanquispe DG, Gheysen G, Kreuze JF. 2017. Horizontal gene transfer contributes to plant evolution: the case of *Agrobacterium* T-DNAs. Frontiers in Plant Science 8: 02015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02015>
- Ray S, Swapnil P, Singh P, Singh S, Sarma BK, Singh HB. 2020. Endophytic *Alcaligenes faecalis* mediated redesigning of host defense itinerary against *Sclerotium rolfsii* through induction of

- phenolics and antioxidant enzymes. *Biological Control* 150: 104355. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104355>
- Remus-Emsermann MNP, Schmid M, Gekenidis M-T, Pelludat C, Frey JE, Ahrens CH, Drissner D. 2016. Complete genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* P3B5, a candidate for microbial phyllo-remediation of hydrocarbon-contaminated sites. *Standards in Genomic Sciences* 11: 75. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0190-6>
- Saikia B, Gogoi S, Savani AK, Bhattacharyya A. 2022. Chapter 5 – Metabolites and peptides of endophytic origin in plant growth promotion and defense reactions in *Solanaceous* crop tomato. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Singh HB, Vaishnav A. (eds.); Elsevier: Amsterdam, Netherlands. pp: 89–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85579-2.00005-8>
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. *Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3rd Edition). American Phytopathological Society Press: St. Paul, MN, USA. 373 p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>
- van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A. 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63: 39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Wang C, Ye F, Chang C, Liu X, Wang J, Wang J, Yan X-F, Fu Q, Zhou J, Chen S, Gao Y-G, Zhang L-H. 2019. *Agrobacteria* reprogram virulence gene expression by controlled release of host-conjugated signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (44): 22331–22340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903695116>
- Yokoyama S-I, Adachi Y, Asakura S, Kohyama E. 2013. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. *The Journal of General and Applied Microbiology* 59 (2): 89–95. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.089>

CHALLENGES AND MANAGERIAL STRATEGIES OF COFFEE COOPERATIVES FROM THE HUATUSCO REGION IN MEXICO: THE PERSPECTIVE OF LEADERS

Margarita Velandia^{1*}, Carlos Trejo-Pech¹, Benigno Rodríguez-Padrón²,
Roselia Servín-Juárez³, Christopher Stripling¹

¹ University of Tennessee, 2621 Morgan Circle, 301 Morgan Hall, Knoxville, TN, USA. 37996.

² Universidad Autónoma Chapingo. Centro Regional Universitario Oriente. Carreterra Huatusco-Xalapa km 6, Huatusco, Veracruz, Mexico. C. P. 94100.

³ Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz, Mexico C. P. 94953.

* Author for correspondence: mvelandi@utk.edu

ABSTRACT

Coffee cooperatives from the Huatusco region in Mexico have played an important role in helping coffee farmers in this region maintain economic viability in the midst of the economic crisis in Mexico and the international crisis of the coffee sector over time. While this type of organization has played an important role, not all of those organizations have survived over time. Using information from interviews with leaders of five longeval coffee producer cooperatives in the Huatusco coffee region, this study aims to identify the coffee cooperatives characteristics that can explain the longevity and long-term sustainability of these organizations. Additionally, using information from interviews, we evaluated challenges that could put at risk the long-term sustainability of these associations and strategies to overcome these challenges from the cooperative leadership perspective. Findings from this study suggest that motivations behind the creation of these producer associations go beyond accessing government resources. An institutional structure where there is a democratic process behind the election of leaders, leadership positions with predefined, not long, tenure terms, and association strategies to increase member engagement could explain the longevity of these organizations. Regarding challenges the cooperatives may be facing in the future, the aging population of growers is perceived by cooperative leaders as one of the major challenges they may be facing. Increasing youth involvement in the cooperatives through training and educational activities was perceived by cooperative leaders as a strategy to overcome this challenge.

Keywords: coffee cooperatives, Huatusco, leadership, longevity.

INTRODUCTION

Mexico is ranked tenth in the world in terms of coffee production and, therefore, could be considered an important player in the world coffee market (Inforural, 2021). Furthermore, coffee is one of the principal agricultural products exported by Mexico, and it is an important direct and indirect income source for about 3 million people in this country (Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018; SADER, 2021).

Citation: Velandia M, Trejo-Pech C, Rodríguez-Padrón B, Servín-Juárez R, Stripling C. 2022. Challenges and managerial strategies of coffee cooperatives from the Huatusco region in Mexico: the perspective of leaders. *Agrociencia*. 56(8): 1558-1591. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2741>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: April 07, 2022.
Approved: October 21, 2022.
Published in Agrociencia:
January 19, 2023.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



The state of Veracruz is the second largest producer region in Mexico (SADER, 2019). There are ten coffee producing regions in the state of Veracruz: Chicontepec, Papantla, Tezonapa, Los Tuxtlas, Zongolica, Córdoba, Misantla, Coatepec, Atzalán, and Huatusco (Morales-Ramos *et al.*, 2021). The coffee-producing communities around the Huatusco municipality (the Huatusco coffee region hereafter) produce about 23% of the total coffee produced in this state and 6% of the total coffee produced in Mexico. The Huatusco region covers the municipalities of Huatusco, Coscomatepec, Ixhuatlán del Café, Totutla, Tlaltetela, Zentla, Tenampa, Comapa, Tlacotepec de Mejía, Sochiapa and Tomatlán (Morales-Ramos *et al.*, 2021). About 80% of the coffee farmers in this region have less than two hectares in production, which suggests the majority of producers in this region are considered small-scale producers (Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018).

Just like in other coffee-producing countries, cooperatives and producer associations in Mexico have played a major role in helping small farmers increase marketing opportunities and economic stability by obtaining better prices when selling coffee through these associations (Bacon, 2005; Wollni and Zeller, 2007; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2012). However, there are some producer associations that have been created with the main goal of accessing government resources rather than providing marketing opportunities to coffee producers. This has been suggested to occur in Mexico and other coffee supply regions (Ruben and Heras, 2012; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018).

Cooperatives in the context of coffee production in Mexico can be defined as an association of coffee producers, where producer members can sustain ownership of the association and maintain their membership by selling coffee through the cooperative and fulfilling other secondary responsibilities (Arana-Coronado *et al.*, 2019). The principles of solidarity, a common interest shared among the membership, and the purpose of satisfying individual and collective needs through economic and social activities are key elements of cooperatives in Mexico (Cotler, 2020).

Between 1958 and 1993, the Mexican Institute of Coffee (Instituto Mexicano del Café, INMECAFE) played an active role in purchasing, processing, marketing coffee, and providing subsidies to coffee growers, therefore promoting the production of coffee among small and medium-sized farmers (Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018; Arana-Coronado *et al.*, 2019). At the beginning of the 1990s, INMECAFE was disintegrated due to various reasons, including Mexico's macro-economic crisis and the international crisis of the coffee sector, with the latter causing very low coffee prices, even below costs of production, paid to farmers (Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018; Arana-Coronado *et al.*, 2019; Ramos-Rivera *et al.*, 2021). The international crisis in the coffee sector was due to the liberalization of the coffee market (this is, the disintegration of the International Coffee Agreement), which contributed to increased coffee supply worldwide and market concentration in the coffee roasting and trading industries, ultimately hurting economically coffee farmers (Bacon, 2005; Ramos-Rivera *et al.*, 2021).

Like in other regions in Mexico, the coffee farmers in the Huatusco region were left facing economic uncertainty related to where to sell and how to guarantee a fair price for their coffee after the disintegration of INMECAFE in a market environment with low prices. In this region, the government gave some producers the opportunity to purchase INMECAFE processing facilities through producer organizations (Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018). This opportunity incentivized the creation of producer organizations with a legal structure to specifically access government-owned processing facilities and overall government resources. In this context, producer organizations in the Huatusco region were created in order to get access to the infrastructure for coffee processing formally owned by the government (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018).

In the early 2000s, there was a second crisis in the coffee sector; a drastic decline in coffee prices affected the profitability of coffee growers in Mexico, including coffee producers in the Huatusco region. This situation generated organized protests from growers in this region, demanding support from the government to obtain better coffee prices and marketing opportunities. As a result, the government promised financial aid to be distributed to coffee growers through producer organizations. This situation motivated the creation of additional producer organizations to access government financial aid. At the same time, coffee producer associations were created whose main goal was to add value to coffee, as a strategy to manage coffee prices instability in the international market. These cooperatives had the main goal of managing prices and marketing risk through added value strategies such as commercializing coffee with the Fairtrade® (fairtrade hereafter) and organic certification labels. For those organizations, access to government financial aid was a means and not a goal. About 75 % of the cooperatives created in the 2000s in this region had the main goal of accessing government financial aid (Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018).

Previous studies suggest producer organizations created with the main purpose of accessing government financial aid were not likely to be sustainable in the long run because they were created to obtain government benefits without a long-term plan for the organization (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018). Additionally, previous studies suggest that only a small percentage of the coffee cooperatives in the Huatusco region created to facilitate coffee producers access to government resources are still active (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016). This might suggest that the mission of these producer associations, as well as producer engagement with them, could impact the longevity and long-term sustainability of coffee cooperatives in Mexico.

Other studies have suggested that factors influencing the long-term sustainability of coffee cooperatives in Mexico are member engagement with these producer associations, associations offering benefits to members that go beyond better prices (for example, funding, supplies, technical assistance), clear and enforceable association rules related to member responsibilities and benefits, equitable member participation, strong relationships with buyers and other individuals in the coffee value chain, and

youth interest in continuing coffee production (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Ramos-Rivera *et al.*, 2021).

According to the Mexican Tax Administration Service (SAT), there were 85 registered coffee producer associations from the Huatusco region with a cooperative focus in 2017. Nonetheless, according to Rojas-Herrera and Olguín-Pérez (2018), only about 24 or about 28 % of those listed by the SAT were active. Rojas-Herrera and Olguín-Pérez (2018) suggested that 61 of the 85 coffee cooperatives listed have disintegrated for various reasons, including that the cooperatives were created to receive government resources, and therefore as soon as they received those resources, they were disintegrated. This study also suggests that in 2011 about half of the coffee producers in this region were members of a producer organization with a formal business structure. Overall, there are no official numbers of producer associations in the Huatusco region. The only numbers are unofficial numbers provided by previous research (Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018).

Given the unique history of the coffee producer associations in the Huatusco region, the various motivations related to the creation of these associations, and the relative importance of coffee production in Huatusco, in this publication, we investigate the characteristics of coffee cooperatives that could explain the longevity and long-term sustainability of these cooperatives. Additionally, this study evaluates the challenges that may put at risk the long-term sustainability of these associations and strategies to overcome those challenges from the cooperative's leadership perspective. We used information from semistructured interviews conducted with leaders of five coffee cooperatives in the Huatusco region in January 2019 to accomplish this study's objective.

In this study, we focus on the institutional structure of coffee cooperatives (e.g., cooperative's foundational mission, members' responsibilities, cooperative responsibilities with members, distribution of profits) and its relationship with the longevity and long-term sustainability of these producer associations. We hypothesized the institutional structure, and the relationship between cooperative members and the cooperative leadership could help explain the sustainability of these associations (Mestries-Benquet, 2017). Specifically, we hypothesized that systems of governance that operate transparently (e.g., institutional structures defined by members that promote equitable participation of members) positively influence the longevity and sustainability of coffee cooperatives. Additionally, we considered that the strengthening of the member-cooperative relationship through the association's ability to offer tangible (e.g., higher prices, technical assistance, low-cost inputs) and intangible benefits (e.g., a sense of belonging, pride) could explain the longevity and long-term sustainability of coffee cooperatives (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016).

MATERIALS AND METHODS

In January 2019, we conducted semistructured interviews with leaders of five coffee cooperatives operating in the Huatusco region. There were a few characteristics considered when selecting the coffee cooperatives to be invited to participate in the

study, including specialization in coffee production and marketing, and years in business. Specifically, cooperatives in business for more than 15 years were selected. Similar to previous studies involving coffee producers and cooperatives (Hernández-Sánchez and Travieso-Bello, 2021; Martínez-López *et al.*, 2021, Ramos-Rivera *et al.*, 2021), the final cooperatives included in the study were selected using a convenience sample approach (Otzen and Manterola, 2017) based on cooperative leaders' willingness to participate in the interviews and cooperative's characteristics (i.e., years in business) that align with the objectives of the study. Given the sampling approach taken in this study, it is important to acknowledge that findings cannot be generalized to the population of cooperatives in the Huatusco region. Nonetheless, findings in this study could unveil cooperative characteristics that should be evaluated when assessing the long-term sustainability of a representative sample of coffee cooperatives in this region and conducting a quantitative rather than qualitative analysis.

The interview instrument was divided into eight sections related to 1) Profile of the leader participating in the interview (e.g., position in the organization, years involved with the cooperative); 2) Cooperative general information (e.g., foundation year, number of members, institutional structure, services provided to members); 3) Producer member characteristics (e.g., average farm size, typical production practices, certifications, member responsibilities with the cooperative, member-cooperative relationship); 4) Financial information (e.g., cooperative investments, payment times, financial aid provided to members); 5) Cooperative employees (i.e., number of employees, level of involvement with the cooperative); 6) Cooperative infrastructure (i.e., infrastructure and equipment owned by the cooperative); 7) Marketing (e.g., buyers, trade terms); and 8) Cooperative challenges and opportunities. No questions related to the demographic characteristics of interview participants were asked to further protect the confidentiality of participants, given that we were only collecting information from a small number of cooperative leaders. Interview protocols were acknowledged by the University of Tennessee Institutional Review Board (IRB) (UTK IRB-18-04879). A copy of the interview instrument is available from the authors upon request.

We use a qualitative research approach to analyze information from semistructured interviews. Qualitative research is useful when learning about actual individuals' perceptions and experiences related to specific situations (Bruce *et al.*, 2019; Martínez-López *et al.*, 2021). Notes from the researcher who conducted the interviews were coded and analyzed. Similar to Bruce *et al.* (2019), the coding process was completed by the researcher who conducted the interviews; the coding process included three readings of the notes. The initial reading identified general themes, the second reading identified important themes common across all cooperatives, and the third reading reclassified themes into general themes and sub-themes common across all five cooperatives included in this study.

RESULTS AND DISCUSSION

Interviews findings

In this section, we provide information about the characteristics of the five coffee cooperatives included in this study, the history of these cooperatives, and their institutional characteristics. We specifically discuss the characteristics common to all cooperatives that could help explain their longevity and long-term sustainability. Additionally, we discuss association leaders' perceptions of challenges faced by their cooperatives, and strategies to overcome those challenges.

Cooperatives' General Characteristics

The cooperatives included in this study have been in business for anywhere between 16 and 32 years (Table 1). The size of the cooperatives in terms of producer members is between 17 and 900 (Table 1). The size of the cooperatives in terms of the number of employees ranges from 2 to 54 employees (Table 1). On average, producer members of these cooperatives were small, with an average farm size of producer members ranging from 3 to 5 hectares (Table 1). All the producer cooperatives focus on purchasing, processing, and marketing coffee from producers. Other services provided by these cooperatives to their members include technical assistance, access to low-cost inputs, and providing access to government resources (Table 1).

History

The history of the coffee cooperatives could help us understand the motivations related to the creation of the organizations. As suggested by previous studies (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018), these motivations could

Table 1. Summary of coffee producer association characteristics.

ID	No. of employees	No. of producers selling coffee	Average farm size of members (ha)	Foundation year	Services offered to coffee producers
A	2	17	5	2000	Coffee purchase, processing, and marketing. Technical assistance
B	4	350	2	2006	Coffee purchase, facilitate coffee producer access to government resources, producer access to certification, and technical assistance
C	54	1,324 (900 were actively selling coffee through the cooperative in 2019)	1.8	1991	Coffee purchase and marketing, access to certification, technical assistance, and health education
D	9	26	2.5	1990	Coffee purchase and marketing, access to certification, access to low cost inputs (compost, coffee plants)
E	9	276	3	2008	Coffee purchase, processing, and marketing, access to government resources.

have an impact on the longevity and long-term sustainability of producer associations. Cooperative leaders were asked about the history of their organization, including the year the cooperative was established, the number of producer members when the cooperative was established, motivations for creating it, and services provided to their members when the cooperative was created. We identified common themes related to the historical context (e.g., coffee market crises) in which these cooperatives were created and motivations related to the creation of these cooperatives. We complemented this analysis with a word frequency count procedure that helped us identify the words that cooperative leaders were using more often in each section of the interview instrument using a Microsoft® Word® macro. This information allowed us to identify themes that were repeated more often by the leader and were common across cooperatives.

Cooperative A was legally established in 2000 with 27 producer members. This cooperative was created in the context of the international coffee crisis with low prices that did not cover the producer's cost of production. The goal of this cooperative was to find marketing opportunities to add value to coffee production and obtain higher prices. They started the organic certification process in 2002 and obtained full organic certification in 2005. In 2002, they negotiated access to a privately owned coffee mill, aiming to add value by processing the coffee they were gathering from farmers. Specifically, they rented the coffee mill facilities in exchange for their labor on the land owned by the coffee mill owner. Between 2007 and 2008, they obtained government funding to purchase the coffee mill, improve the mill facilities, and purchase a tractor and a vehicle. They distributed the ownership of the association infrastructure equally among members. They established that members could only sell their shares if 90% of the members agreed with the sale and the buyer was a family member or descendent and not an individual outside of the members' circle.

Cooperative B was founded in August of 2006 to help 1300 coffee producers overcome challenges related to low prices through organic and fairtrade certifications allowing them to access price premiums in international markets. The cooperative used to aggregate coffee in various points across the Huatusco region. Currently, they aggregate coffee in a single location to facilitate the logistics of aggregation.

Cooperative C and Cooperative D were established in 1991 and 1990, respectively. When cooperatives C and D were legally established, they had 91 and 32 members, respectively. These cooperatives were created in the context of the disintegration of INMECAFE (the Mexican Institute for Coffee), while looking for opportunities to increase marketing opportunities for growers, obtain higher coffee prices for growers, provide technical assistance, and increase coffee grower profitability. The legal structure of these organizations was determined by government requirements to form this type of organization to access government resources, including the ability to acquire wet and dry coffee mills at a low cost. Both cooperatives pursued organic and fairtrade certifications in search of higher coffee prices, lower production costs, and satisfying a market interested in coffee produced responsibly and with fewer chemical inputs.

Cooperative E was founded in 2008 with six producers. This cooperative is different from the other cooperatives included in this study, since it was founded after the international coffee price crisis and that it focuses on processing and marketing coffee to the national markets and not international markets. This implies that Cooperative E was less focused on producing high-quality coffee since the quality of coffee demanded in Mexico is not as high as that for international markets. Furthermore, this cooperative also purchases other agricultural products from farmer members, including macadamia nuts.

Four of the five coffee cooperatives presented in this study were created in the middle of an economic crisis in the Mexican coffee sector. Furthermore, these four cooperatives aimed to help producers to get access to better prices with added value strategies through certification processes. It seems that access to government resources played a role in the creation of these cooperatives, but it was not its ultimate goal. This suggests that the longevity and long-term sustainability of these organizations could be partially explained by the motivation of these organizations related to providing members with better market conditions, such as better prices or trade terms. Nonetheless, as suggested by previous studies (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018), cooperatives offering better market conditions as the only benefit provided to its members may pose a risk to the long-term sustainability of coffee cooperatives. This is because, when the associations are unable to fulfill the promise of better market conditions, members are likely to sell coffee to other buyers and stop engaging with these producer cooperatives (Arana-Coronado *et al.*, 2019). It is important to note that all five cooperatives included in this study provide multiple services to their members, including technical assistance, access to government resources, access to low-cost inputs, and health education. In the next section, we explore the institutional characteristics of coffee cooperatives, and the relationship between these producer associations and their members as factors that could explain the longevity and long-term sustainability of the coffee cooperatives included in this study.

Institutional Characteristics and Challenges

In this section, we will describe some institutional characteristics related to members responsibilities, cooperative responsibilities with members, distribution of profits, decision-making processes, and leaders perceptions related to factors that could put at risk the relationship between the cooperative and its members. We identified common themes related to institutional characteristics and challenges. As explained in the previous section, we complemented this analysis with a word frequency count procedure that helped us identify the words related to these topics that cooperative leaders were using more often. This information was used to identify themes that were repeated often by the leader, and were common across cooperatives.

Cooperative A had a total of 17 members in 2019. Members have the responsibility to sell at least a percentage of their coffee produced to the cooperative. This percentage

is established during a members' meeting. For example, in 2015, cooperative members were expected to sell 90 % of their production through the cooperative (Mestries-Benquet, 2017). Members also have to contribute their labor to the cooperative. Specifically, they need to help load and unload coffee from the field into the cooperative facility, volunteer at a field in an educational center owned by the cooperative, and watch the coffee dry mill overnight (Mestries-Benquet, 2017).

The cooperative facilitates the organic certification process for its members, provides technical assistance to members, and markets their coffee. Cooperative profits are distributed between members, cover administration and marketing fees, and a percentage of profits is reinvested in the infrastructure owned by the cooperative (Mestries-Benquet, 2017). The cooperative board includes the president, secretary, and treasurer. These positions are elected every two to three years. Additionally, there is an association legal representative who is not able to make decisions without consulting association members. Decisions are made through a democratic process during association meetings where all members participate.

Cooperative A leadership believes that some of the factors negatively influencing the relationship between members and the cooperative are low coffee prices, and payment times. The cooperative does not have the ability to fully pay farmers at the time they deliver their cherry coffee to the cooperative. The cooperative leadership believes that it is difficult to maintain producer loyalty when they have to wait to obtain payments for their coffee, and when producers have the opportunity to obtain better selling terms if they sell coffee to other buyers outside of the cooperative, who usually offer full payment at the time of sale.

Cooperative B leadership indicated the cooperative had 600 members in 2019, but only 350 were actively selling coffee through the cooperative. Members have to sell at least between 25 and 30 percent of their total production to the cooperative and participate in annual meetings. The cooperative is responsible for facilitating member access to government programs, providing technical assistance, facilitating certification, providing low-interest loans through the cooperative, and guaranteeing the purchase of members' coffee. A percentage of the cooperative profits is distributed to the members. The rest of the profits are used to fund the certification process and pay the association debt.

When the cooperative first started, they focused on purchasing coffee to reach a certain volume without a purchasing contract. They acquired debt to purchase coffee from members and alleviate the late payment problem, but due to the lack of buying contracts, the cooperative cash flows have not been enough to fully service the debt. Cooperative B leadership positions, including the president, secretary, and legal representative, are elected through a democratic process by members with one member one vote rights. Leadership positions have two to three-year terms. The leadership of this cooperative believes the main factor putting at risk the relationship between the members and the cooperative is the lack of members' commitment. It is hard to gain farmers' commitment because sometimes the cooperative does not have the working

capital to purchase all the coffee members are willing to sell through the cooperative. Cooperative C had a total of 1324 members in 2019, although only 900 members were actively selling coffee through the cooperative. Members have to sell at least 75 % of their production to the cooperative, although this requirement is not always enforced. This cooperative provides technical assistance to its members, gives them access to fairtrade and organic certification, and gives them training related to access to government resources. Furthermore, they provide education on healthy living to members and their families. The cooperative profits are used to pay for the certification process, provide technical assistance to members, and invest in maintaining the infrastructure owned by the cooperative, which is the coffee mill. Cooperative C leadership positions (president, treasurer, legal representative) are rotated every four years. The leadership of this cooperative believes the main factors putting at risk the relationship between leadership and their members include payment times to members and members' understanding that the role of the cooperative goes beyond purchasing their coffee and includes improving the wellbeing of their households.

Cooperative D had a total of 26 members in 2019, with 16 members classified as founding members or type A members and 10 of them classified as type B members. The type A members own cooperative shares, have the option of becoming part of the board of the cooperative, have access to organic and fairtrade certifications, have access to a free limited amount of compost produced by the cooperative, and have access to coffee plants at a discounted price. The type B members have access to certification and marketing services. The type A member's responsibilities include attending monthly and extraordinary meetings and selling 100 percent of their coffee through the producer association. A percentage of the cooperative profits is distributed to the members, and a percentage of the profits is reinvested in the cooperative infrastructure. The portion of profits retained by the cooperative varies depending on the needs. For example, the cooperative purchased a coffee mill facility formerly owned by the government using the profit contributions of members.

The cooperative's responsibilities to its members include purchasing their coffee and informing members about the financial situation of the organization on a regular basis. The cooperative offers other services to nonmembers, such as plant sales and access to the sugar and coffee wet mill for a fee. The cooperative legal representative is elected every two years. The representative's two-year term might be extended depending on performance.

Cooperative D leadership believes lack of transparency about the cooperative activities, lack of members sense of belonging, and allowing organization leaders to stay for long terms in leadership positions are risk factors to the relationship between the cooperative and its members.

Finally, Cooperative E had a total of 10 founding members who invested capital in the cooperative. All these members are medium size and large coffee growers. There are additional 266 members that only sell coffee to the cooperative, and are able to get access to government resources through the cooperative. Members do not have to sell

a minimum percentage of the coffee production. There are no specific responsibilities of the cooperative members. The cooperative responsibilities to its members include purchasing their coffee, subject to demand, and helping them access government economic resources. Cooperative profits are used to pay employees and other operational expenses, including coffee bags and utilities. The legal representative of the cooperative has a 5-year term. Cooperative E leadership believes that growing the size of the cooperative in terms of membership might put at risk the transparency related to the way they facilitate producer access to government resources. They believe that maintaining leadership with ethical principles might be the strategy to follow in order to grow the cooperative size in terms of the number of members while maintaining transparency within the organization.

Some of the institutional characteristics common to these cooperatives that could explain the longevity and long-term sustainability of these producer associations are those related to the governance structure of these organizations. Specifically, leadership positions that have predefined, not long, tenure terms, established democratic processes that allow members to participate in decisions, and that members have clear responsibilities with the cooperative could explain the longevity of these associations. Additionally, services provided by the cooperatives to members that go beyond purchasing their coffee or offering better prices could also explain the longevity of these associations.

These findings are consistent with previous research findings suggesting a good system of governance, equitable participation of members, and coffee cooperatives offering tangible and intangible benefits could impact the longevity of these organizations (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera and Olguín-Pérez, 2018). A unique finding of this study is the potential correlation between the establishment of predefined, not long, tenure terms of leadership positions and the longevity of coffee cooperatives.

Regardless of efforts the coffee cooperatives presented in this study have made to engage members with the organization, just as suggested by previous studies, most of them perceive the lack of members' engagement as of the factors putting at risk the long-term sustainability of these associations (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016). Farmers' trust, commitment, loyalty, and sense of belonging to the cooperatives, and overall reciprocal cohesion between farmers and the leadership, are attributes that several studies have identified as relevant for the development of stronger agricultural cooperative organizations and the improvement of performance (Hansen *et al.*, 2002; Ruben and Heras, 2012; Mujawamariya *et al.*, 2013; una and Wilson, 2015).

One of the disadvantages of coffee cooperatives over local buyers is that coffee cooperatives are not able to fully pay the farmer harvest/coffee delivery time, while local buyers, who offer lower prices on average can (Bacon, 2005; Mujawamariya *et al.*, 2013; Milford, 2014; Luna and Wilson, 2015; Arana-Coronado *et al.*, 2019). The inability of cooperatives to fully pay farmers at harvest time is exacerbated by one cooperative that reported problems servicing its debt. The failure to provide full payment to

farmers at delivery time negatively impacts farmer loyalty and engagement with the cooperative, according to the perceptions of cooperative leaders.

In general, cash shortage at harvest time is problematic for farmers and cooperatives since farmers will be induced to side-sell more coffee to other local buyers than they otherwise would, and cooperatives will collect less volume and reduce their bargaining power. All this will ultimately affect small-scale coffee producers' profitability and engagement with the cooperative. It is worth noticing that out of the five cooperatives interviewed, each has different requirements regarding the portion of the total coffee production (varying from 0 to 100%) that members are expected to sell through the cooperatives they are affiliated with. This policy may or may not be related to the level of cash cooperatives have at harvesting time, which could ultimately affect their ability to pay farmers and maintain member engagement with the cooperative.

Perceptions of future challenges and strategies to overcome those challenges

Cooperative leaders were asked about their perceptions of future challenges their cooperatives may face and the plans they have in place to overcome those challenges. We identified common themes and complemented this analysis with a word frequency count procedure. We identified words that were often repeated by leaders and expanded on the context in which these words were used.

Cooperative A leadership believed the major challenges this cooperative was facing in 2019 and were likely to face in the future include the lack of transparency among the leadership of intermediaries or organizations aggregating coffee from various cooperatives to be exported, which could put at risk marketing opportunities. They believe an aging population of coffee growers and the lack of motivation of the next generation producers to stay in the region might put at risk the long-term sustainability of this cooperative. Also, leaders of this cooperative believe that educating the next generation in the technical aspects of coffee production, and in ethics and management, might help overcome the challenges mentioned above. Furthermore, as mentioned by Mestries-Benquet (2017), the leadership of Cooperative A believes reinvesting part of the cooperative profits to create their own lending or funding mechanisms will give them a sense of independence from issues related to lack of transparency and management of intermediary organizations.

Cooperative B leadership believes the major challenges faced in 2019 are those likely to continue in the future. This is, their capacity to pay the acquired debt, members' commitment to sell their coffee to the cooperative, and the aging population of coffee growers. They do not have a clear idea of strategies to overcome those challenges. They believe government support is explicitly needed to help them with refinancing the debt they acquired, which was the main challenge they were facing in 2019.

According to Cooperative C leadership, the most important challenges this cooperative may face in the future include an aging population of coffee producers and a younger generation of potential producers migrating to the cities. Additionally, they perceive climate change as a major threat that could put at risk coffee production in the region

but not the long-term sustainability of the cooperative. They believe that if climate change forced growers to produce a different crop to coffee, the cooperative would still exist to improve the wellbeing of its members and their families. They plan to increase youth involvement with the cooperative activities to motivate them to stay in the region producing coffee and other crops.

The major challenges perceived by Cooperative D leadership include low selling prices, low productivity due to coffee rust, the length of time from when they receive growers' coffee and they provide payments to growers, an aging population of coffee producers, and climate change that could impact soil fertility, coffee productivity, and quality. The leadership of this cooperative suggested a couple of strategies to overcome the aforementioned challenges, such as reducing the percentage of coffee sold in international markets and increasing the percentage of coffee sold in national markets, with a specific focus on the production of specialty coffees that are sold at premium prices.

The major challenge faced by Cooperative E, according to the leadership, is the lack of working capital to increase the association size and guarantee volume requirements for marketing, which is the cooperative's main mission, and expand marketing opportunities to growers through local specialty coffee shops. The cooperative currently owns one coffee shop and was expecting to increase the number of coffee shops in the Huatusco region and other regions in the state of Veracruz.

Although the leaders of each cooperative mentioned unique challenges, four of the five cooperatives included in this study perceived the aging population of growers as one of the major challenges they would be facing in the future. Two of these cooperatives mentioned increasing youth involvement in the cooperative to overcome this challenge, through training and educational activities.

Climate change was mentioned as a major challenge by two of the five cooperatives, but the leadership did not mention a clear strategy on how to overcome this challenge. One of the cooperative leaders believes that the cooperative role goes beyond the marketing of coffee. They believe the cooperatives play a major role in improving the living conditions of their members and their families, regardless of the types of crops they might be growing in the future due to climate change.

CONCLUSIONS

In this article, we describe five longeval coffee producer cooperatives in the Huatusco coffee region and try to identify factors that could explain the longevity and long-term sustainability of these organizations. Additionally, we evaluate challenges that could put at risk the long-term sustainability of these associations and strategies to overcome these challenges from the cooperative's leadership perspective.

Similar to previous research findings (Hansen *et al.*, 2002; Ruben and Heras, 2012; Mujawamariya *et al.*, 2013; Luna and Wilson, 2015), this study's findings suggest farmers' trust, commitment, loyalty, sense of belonging toward cooperatives, and in general reciprocal cohesion between farmers and cooperatives' leadership, are

attributes that could be correlated with the longevity and long-term sustainability of these producer associations.

When looking at the history of these cooperatives, it seems that the motivation behind the creation of these producer associations was to guarantee the survival of coffee growers in the region and increase their economic sustainability by providing marketing opportunities through coffee quality certification processes in the midst of the Mexican and international coffee sector economic crises. It is important to notice that although the creation of producer associations was a requirement to access government resources, and it could have been the motivation for some members to join the cooperatives, none of the cooperatives' leadership mentioned accessing government resources for growers as the ultimate goal or mission of the cooperative. As suggested by Rojas-Herrera and Olguín-Pérez (2018), the motivations behind the creation of a producer association could have an impact on the long-term sustainability of the organizations, and therefore the longevity of the cooperatives included in this study could be explained in part by the motivations behind the creation of these cooperatives. Nonetheless, as suggested by Rodríguez-Hernández *et al.* (2016) cooperatives' mission is not the only factor influencing the longevity of these associations. Tangible and intangible benefits offered by coffee cooperatives motivating member engagement and good systems of governance that operate transparently are factors influencing the longevity of these producer associations (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016).

Regarding the cooperatives' institutional structure, particularly related to governance, results suggest that predefined, not long, tenure terms for the leadership positions, member involvement in the decision-making processes, and coffee cooperatives strategies to engage members, including establishing the minimum percentage of coffee members need to sell through the cooperative, giving additional responsibilities to members (e.g., loading coffee, supervising coffee mills) or involving their families with the cooperative through education activities not necessarily related to coffee production (e.g., health) could be correlated with the longevity of these producer associations. These findings are in line with previous research findings related to the positive impact of the inner workings of cooperatives, member engagement, and good and transparent governance systems on the long-term sustainability of these producer associations (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016).

Regarding the perceptions of coffee cooperative leaders about challenges their organization will be facing in the future, a common challenge faced by most of the coffee cooperatives included in this study is the aging population of cooperative members and the lack of interest of the youth in staying involved with coffee production in the Hautusco region. Previous research has identified the aging population as one of the major challenges putting at risk the long-term sustainability of coffee cooperatives in the state of Veracruz (Escamilla-Prado, 2021; Ramos-Rivera *et al.*, 2021). Like previous studies, the leaders of these cooperatives mentioned increasing the number of activities aiming to engage youth in their organizations as a strategy to overcome this challenge (Escamilla-Prado, 2021), but previous research did not discuss specific

strategies or activities cooperatives could use to engage the next generation of coffee producers in this region. It might be important for the leaders of these associations to develop a strategic plan to involve the next generation of coffee producers with their associations.

Additionally, some cooperatives identified climate change as one of the major challenges they will be facing in the future. Nonetheless, the leaders of these coffee cooperatives did not identify a clear strategy to overcome this challenge. Previous research suggests coffee producers in this region have perceived changes in temperature and precipitation cycles that are negatively impacting production volumes and disease pressure (Hernández-Sánchez and Travieso-Bello, 2021). Hernández-Sánchez and Travieso-Bello (2021) suggest some of the actions taken by coffee cooperative members to overcome challenges associated with climate change are crop diversification, planting diseases resistant varieties, and implementing soil and water conservation practices. Nonetheless, the study suggests that these actions are autonomous and reactive, implying they might be effective in the short run but not necessarily in the long run. Coffee cooperatives should be proactive in exploring measures that could help their members be more resilient to the production challenges they will be facing in the future due to climate change. The resiliency of the coffee cooperative members will ultimately impact the longevity and long-term sustainability of these associations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a seed grant from the University of Tennessee (Smith Center for International Sustainable Agriculture). This research was also partially supported by the USDA National Institute of Food and Agriculture, Hatch Multi-State project 1020537. We acknowledge the support provided by two leading Mexican institutions involved in this study, Universidad Autónoma Chapingo (Centro Regional Universitario Oriente-CRUO), and Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

REFERENCES

- Arana-Coronado J, Trejo-Pech C, Velandia M, and Peralta-Jimenez J. 2019. Factors influencing organic and fair trade coffee growers level of engagement with cooperatives: The case of coffee farmers in Mexico. *Journal of International Food & Agribusiness Marketing* 31 (1): 22–51. <https://doi.org/10.1080/08974438.2018.1471637>
- Bacon C. 2005. Confronting the coffee crisis: Can fair trade, organic, and specialty coffees reduce small-scale farmer vulnerability in northern Nicaragua? *World Development* 33 (3): 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2004.10.002>
- Bruce AB, Maynard ET, Farmer JR. 2019. Farmers' perspectives on challenges and opportunities associated with using high tunnels for specialty crops. *HortTechnology* 29(3): 290–299. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04258-18>
- Cotler P. 2020. Does it pay to cooperate? The case of cooperatives in the Mexican manufacturing sector. *Annals of Public and Cooperative Economics* 91 (4): 497–517. <https://doi.org/10.1111/apce.12281>
- Hansen MH, Morrow JL Jr, Batista JC. 2002. The impact of trust on cooperative membership retention, performance, and satisfaction: An exploratory study. *International Food and Agribusiness Management Review* 5 (1): 41–59. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.34587>

- Hernández-Sánchez MI, Travieso-Bello AC. 2021. Medidas de adaptación al cambio climático en organizaciones cafetaleras de la zona centro de Veracruz, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 24 (1): 1–14.
- Inforural. 2021. Reporte anual de producción de café de México. <https://www.inforural.com.mx/reporte-anual-de-produccion-de-cafe-de-mexico/> (Retrieved: February 2022).
- Luna F, Wilson P. 2015. An economic exploration of smallholder value chains: coffee transactions in Chiapas, Mexico. *International Food and Agribusiness Management Association* 18 (3): 85–106.
- Martínez-López A, Alegría-Fernández GA, Medina-Yara G, Rodríguez Padrón B. 2021. La caficultura tradicional frente a la roya anaranjada: El caso de la región tierradentro, Cauca, Colombia. *Agrociencia* 55 (5): 451–469.
- Mestries-Benquet F. 2017. En busca de la autonomía: cooperativismo y comercio justo en la pequeña producción orgánica de café. *Estudios Agrarios* 23 (62): 61–92.
- Milford A. 2014. Co-operative or coyote? Producers' choice between intermediary purchasers and fairtrade and organic co-operatives in Chiapas. *Agriculture and Human Values* 31: 577–591. <https://doi.org/10.1007/S10460-014-9502-X>
- Morales-Ramos V, Escamilla-Prado E, Velásquez-Morales J, Spinoso-Castillo J. 2021. Perfiles de calidad del café de México. Biblioteca Básica de Agricultura. Texcoco, Mexico: Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.
- Mujawamariya G, D'Haese M, Speelman S. 2013. Exploring double side-selling in cooperatives, case study of four coffee cooperatives in Rwanda. *Food Policy* 39 (April): 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2012.12.008>
- Otzen T, Manterola C. 2017. Técnicas de muestreo sobre una población a estudio. *International Journal of Morphology*. 35 (1): 227–232. <https://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v35n1/art37.pdf> (Retrieved: February 2022).
- Ramos-Rivera L, Nava-Tablada ME, Escamilla-Prado E. 2021. Mercados diferenciados en organizaciones cafetaleras del centro de Veracruz, México. *Interconectando Saberes* 12 (6): 177–184. <https://doi.org/10.25009/is.v0i12.2716>
- Rodríguez-Hernández O, Santoyo-Cortés VH, Muñoz-Rodríguez M, Rodríguez-Pradrón B. 2016. La posición competitiva de las organizaciones cafetaleras en Huatusco, Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(15): 2965–2979.
- Rodríguez-Pradrón B, Ruben R, Burger CPJ. 2012. The driving forces and economic impact of co-operative membership: empirical evidence from the Mexican coffee sector. *Journal of Co-operative Studies* 45 (3): 17–31.
- Rojas-Herrera JJ, Olguín-Pérez AM. 2018. Origen, desarrollo y perspectivas de las cooperativas cafetaleras de Huatusco, Veracruz. *LiminaR Estudios Sociales y Humanísticos* 16 (1): 119–133. <https://doi.org/10.29043/liminar.v16i1.568>
- Ruben R, Heras J. 2012. Social capital, governance and performance of Ethiopian coffee cooperatives. *Annals of Public and Cooperative Economics* 83 (4): 463–484. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8292.2012.00473.x>
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). 2019. Sistema de información agroalimentaria de consulta. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. 2019. <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430> (Retrieved: March 2022).
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). 2021. Comercio exterior agropecuario y oportunidades de exportación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/640419/Balanza_por_pa_ses_feb_2021_.pdf (Retrieved: March 2022).
- Wollni M, Zeller M. 2007. Do farmers benefit from participating in specialty markets and cooperatives? The case of coffee marketing in Costa Rica. *Agricultural Economics* 37 (2–3): 243–248. <https://doi.org/10.1111/j.1574-0862.2007.00270.x>

RETOS Y ESTRATEGIAS DE GESTIÓN DE LAS COOPERATIVAS DE CAFÉ DE LA REGIÓN DE HUATUSCO EN MÉXICO: LA PERSPECTIVA DE LOS LÍDERES

Margarita **Velandia**^{1*}, Carlos **Trejo-Pech**¹, Benigno **Rodríguez-Padrón**²,
Roselia **Servín-Juárez**³, Christopher **Stripling**¹

¹ University of Tennessee, 2621 Morgan Circle, 301 Morgan Hall, Knoxville, TN, USA. 37996.

² Universidad Autónoma Chapingo. Centro Regional Universitario Oriente. Carreterra Huatusco-Xalapa km 6, Huatusco, Veracruz, Mexico. C. P. 94100.

³ Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz, Mexico C. P. 94953.

* Autor para correspondencia: mvelandi@utk.edu

RESUMEN

Las cooperativas de café de la región de Huatusco, en México, han desempeñado un papel importante para ayudar a los productores de café de esta región a mantener la viabilidad económica, en medio de la crisis económica de México y la crisis internacional del café a lo largo del tiempo. Aunque este tipo de organizaciones ha desempeñado un papel importante, no todas ellas han sobrevivido a lo largo del tiempo. A partir de la información obtenida de las entrevistas con los dirigentes de cinco cooperativas de productores de café con amplia trayectoria en la región cafetera de Huatusco, este estudio propone identificar las características de las cooperativas de café que pueden explicar la longevidad y la sostenibilidad a largo plazo de estas organizaciones. Además, con el uso de información de entrevistas, se evaluaron los retos que podrían poner en riesgo la sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones y las estrategias para superar estos retos desde la perspectiva de los dirigentes de las cooperativas. Los resultados de este estudio sugieren que motivaciones detrás de la creación de estas asociaciones de productores que van más allá del acceso a los recursos gubernamentales, una estructura institucional en la que exista un proceso democrático para la elección de los líderes, cargos de liderazgo con mandatos predefinidos, no prolongados y estrategias de asociación para aumentar el compromiso de los miembros podrían explicar la longevidad de estas organizaciones. Los líderes de las cooperativas consideran que el envejecimiento de los productores es uno de los principales retos a los que pueden enfrentarse en el futuro. Consideraron que aumentar la participación de los jóvenes en las cooperativas mediante actividades de formación y educación podría ser una estrategia para superar este reto.

Palabras clave: cooperativas de café, Huatusco, liderazgo, longevidad.

Citation: Velandia M, Trejo-Pech C, Rodríguez-Padrón B, Servín-Juárez R, Stripling C. 2022. Retos y estrategias de gestión de las cooperativas de café de la región de huatusco en México: perspectiva de los dirigentes.

Agrociencia. 56(8): 1558-1591. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i8.2741>

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: April 07, 2022.
Approved: October 21, 2022.
Published in Agrociencia:
January 19, 2023.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



INTRODUCCIÓN

México ocupa el décimo lugar en el mundo en cuanto a producción de café y, por lo tanto, podría considerarse un actor importante en el mercado mundial del café (Infocruz, 2021). Además, el café es uno de los principales productos agrícolas exportados por México y es una fuente importante de ingresos directos e indirectos para cerca de tres millones de personas en este país (Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018; SADER, 2021).

El estado de Veracruz es la segunda región productora de café en México (SADER, 2019). En el estado de Veracruz existen diez regiones productoras de café: Chicotepec, Papantla, Tezonapa, Los Tuxtlas, Zongolica, Córdoba, Misantla, Coatepec, Atzacán y Huatusco (Morales-Ramos *et al.*, 2021). Las comunidades productoras de café alrededor del municipio de Huatusco (la región cafetalera de Huatusco en adelante) generan alrededor del 23% del total del café producido en este estado y el 6% del total del café producido en México. La región de Huatusco abarca los municipios de Huatusco, Coscomatepec, Ixhuatlán del Café, Totutla, Tlaltetela, Zentla, Tenampa, Comapa, Tlacotepec de Mejía, Sochiapa y Tomatlán (Morales-Ramos *et al.*, 2021). Alrededor del 80% de los productores de café de esta región tienen menos de dos hectáreas en producción, lo cual sugiere que la mayoría de ellos son considerados pequeños productores (Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018).

Al igual que en otros países productores de café, las cooperativas y las asociaciones de productores en México han desempeñado un papel importante en ayudar a los pequeños agricultores a aumentar sus oportunidades de comercialización y estabilidad económica, al obtener mejores precios de venta del café a través de estas asociaciones (Bacon, 2005; Wollni y Zeller, 2007; Padrón-Rodríguez *et al.*, 2012). Sin embargo, hay algunas asociaciones de productores que se han creado con el objetivo principal de acceder a los recursos del gobierno en lugar de proporcionar oportunidades de comercialización a los productores de café. Se ha detectado que esto ocurre en México y otras regiones productoras de café (Rubén y Heras, 2012; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018).

Las cooperativas, en el contexto de la producción de café en México, pueden definirse como una asociación de productores de café, donde los productores pueden mantenerse como miembros de la asociación y conservar su membresía vendiendo café a través de la cooperativa y cumpliendo con otras responsabilidades secundarias (Arana-Coronado *et al.*, 2019). Los principios de solidaridad, un interés común compartido entre los miembros, y el propósito de satisfacer las necesidades individuales y colectivas a través de actividades económicas y sociales son elementos clave de las cooperativas en México (Cotler, 2020).

Entre 1958 y 1993, el Instituto Mexicano del Café (INMECAFE) desempeñó un papel activo en la compra, procesamiento, comercialización de café, dando subsidios a los cafecultores y promoviendo la producción de café entre los pequeños y medianos agricultores (Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018; Arana-Coronado *et al.*, 2019). A principios de la década de 1990, INMECAFE se desintegró debido a varias razones,

incluida la crisis macroeconómica de México y la crisis internacional del sector cafetalero, que bajó los precios del café pagados a los agricultores de forma sustancial, incluso por debajo de los costos de producción (Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018; Arana-Coronado *et al.*, 2019; Ramos-Rivera y otros, 2021). La crisis internacional en el sector del café se debió a la liberalización del mercado del café (es decir, la desintegración del Convenio Internacional del Café), la cual contribuyó a aumentar la oferta de café en todo el mundo y la concentración del mercado en las industrias de tostado y comercio de café, perjudicando en última instancia, la economía de los productores de café (Bacon, 2005; Ramos-Rivera y otros, 2021).

Al igual que en otras regiones de México, los cafeticultores de la región de Huatusco se enfrentaron a la incertidumbre económica relacionada con dónde vender y cómo garantizar un precio justo por su café, tras la desintegración de INMECAFE en un entorno de mercado con precios bajos. En esta región, el gobierno dio la oportunidad a algunos productores de comprar instalaciones de procesamiento del INMECAFE a través de organizaciones de productores (Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018). Esta oportunidad incentivó la creación de organizaciones de productores con una estructura legal para acceder específicamente a las instalaciones de procesamiento propiedad del gobierno y a los recursos gubernamentales en general. En este contexto, las organizaciones de productores en la región de Huatusco se crearon con el propósito principal de obtener acceso a la infraestructura para el procesamiento del café, formalmente propiedad del gobierno (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018).

A principios de la década de 2000, se produjo una segunda crisis en el sector del café; un drástico descenso de los precios del café afectó la rentabilidad de los cafetaleros de México, incluidos los de la región de Huatusco. Esta situación generó protestas de los cultivadores de esta región, quienes exigieron el apoyo del gobierno para obtener mejores precios del café y mejores oportunidades de comercialización. Como resultado, el gobierno prometió ayuda financiera que se distribuiría a los cafetaleros a través de las organizaciones de productores. Esta circunstancia motivó la creación de más organizaciones de productores para acceder a la ayuda financiera del gobierno. En paralelo, se crearon asociaciones de productores de café cuyo objetivo principal era agregar valor al café, como estrategia para gestionar la inestabilidad de los precios del producto en el mercado internacional. Estas cooperativas tenían como objetivo principal gestionar los precios y el riesgo de comercialización a través de estrategias de valor agregado, como la comercialización de café con las etiquetas de certificación Fairtrade® (comercio justo) y ecológica. Para esas organizaciones, el acceso a la ayuda financiera gubernamental era un medio y no un objetivo. En contraste, alrededor del 75 % de las cooperativas creadas en la década de 2000 en esta región tenían como objetivo principal acceder a las ayudas financieras del gobierno (Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018).

Estudios anteriores sugieren que las organizaciones de productores creadas con el propósito principal de acceder a la ayuda financiera del gobierno no tenían posibilidades

de ser sostenibles en el largo plazo porque fueron creadas para obtener beneficios gubernamentales, sin un plan a largo plazo para la organización (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018). Además, estudios previos señalaron que sólo un pequeño porcentaje de las cooperativas de café de la región de Huatusco, creadas para facilitar el acceso de los productores de café a los recursos del gobierno, siguen activas (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016). Esto podría sugerir que la misión de estas asociaciones de productores, así como el compromiso de los productores con ellas, podría influir en la longevidad y sostenibilidad a largo plazo de las cooperativas de café en México.

Otros estudios han planteado que los factores que influyen en la sostenibilidad a largo plazo de las cooperativas de café en México son el compromiso de los miembros con estas asociaciones de productores. Así como los beneficios que ofrecen dichas asociaciones a sus miembros, que van más allá de ofrecer mejores precios (por ejemplo, financiación, suministros de insumos y asistencia técnica), reglas claras y aplicables de la asociación relacionadas con las responsabilidades y los beneficios de los miembros, participación equitativa, relaciones sólidas con los compradores y otros individuos en la cadena de valor del café, y el interés de los jóvenes en continuar con la producción de café (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Ramos-Rivera *et al.*, 2021).

De acuerdo con el Servicio de Administración Tributaria (SAT) de México, en 2017 se registraron 85 asociaciones de productores de café en la región de Huatusco, con enfoque cooperativo. No obstante, de acuerdo con Rojas-Herrera y Olguín-Pérez (2018), sólo unas 24, alrededor del 28 % de las enlistadas por el SAT, estaban activas. Rojas-Herrera y Olguín-Pérez (2018) sugirieron que 61 de las 85 cooperativas cafetaleras mencionadas se han desintegrado por diversas razones, entre ellas, porque las cooperativas fueron creadas para recibir recursos del gobierno, por lo que en cuanto los recibieron, se desintegraron. Este estudio también sugiere que en 2011 alrededor de la mitad de los productores de café de esta región eran miembros de una organización de productores con una estructura empresarial formal. En general, no hay números oficiales de asociaciones de productores en la región de Huatusco. Las únicas cifras disponibles son números no oficiales proporcionados por investigaciones previas (Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018).

Con base en la singular historia de las asociaciones de productores de café en la región de Huatusco, las diversas motivaciones relacionadas con la creación de estas asociaciones y la importancia relativa de la producción de café en Huatusco, este estudio documenta la investigación sobre las características de las cooperativas de café que podrían explicar la longevidad y sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones. Además, en este estudio se evaluaron los retos que podrían poner en riesgo la sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones y las estrategias para superar esos retos desde la perspectiva de los líderes de la cooperativa. Para cumplir con los objetivos de este estudio, se utilizó información obtenida de las entrevistas semiestructuradas realizadas a los líderes de cinco cooperativas de café de la región de Huatusco en enero de 2019.

En este estudio, nos enfocamos en la estructura institucional de las cooperativas de café (por ejemplo, la misión fundacional de la cooperativa, las responsabilidades de los miembros, las responsabilidades de la cooperativa con los miembros, y la distribución de las ganancias) y su relación con la longevidad y la sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones de productores. La hipótesis es que la estructura institucional y la relación entre los cooperativistas y la dirección de la cooperativa podrían ayudar a explicar la sostenibilidad de estas asociaciones empresariales (Mestries-Benquet, 2017). En concreto, planteamos como hipótesis que los sistemas de gobernanza que funcionan de forma transparente (por ejemplo, estructuras institucionales definidas por los socios que promueven la participación equitativa de los mismos) influyen positivamente en la longevidad y sostenibilidad de las cooperativas de café. Además, el fortalecimiento de la relación socio-cooperativa a través de la capacidad de las asociaciones para ofrecer beneficios tangibles (tales como, mejores precios, asistencia técnica e insumos a bajo costo) e intangibles (un sentido de pertenencia y orgullo) podían explicar la longevidad y sostenibilidad a largo plazo de las cooperativas de café (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

En enero de 2019, se realizaron entrevistas semiestructuradas con líderes de cinco cooperativas de café que operan en la región de Huatusco. Se consideraron algunas características al seleccionar las cooperativas de café a las cuales se invitó a participar en el estudio, incluidos la especialización en la producción y comercialización de café, y los años en el negocio. En particular, se escogieron cooperativas con más de 15 años de antigüedad. Al igual que en estudios anteriores sobre productores de café y cooperativas (Hernández-Sánchez y Travieso-Bello, 2021; Martínez-López *et al.*, 2021, Ramos-Rivera *et al.*, 2021), las cooperativas finalmente incluidas en este estudio se seleccionaron bajo un enfoque de muestra de conveniencia (Otzen y Manterola, 2017) basado en la disposición de los líderes de las cooperativas de participar en las entrevistas y en las características específicas de las cooperativas (los años de actividad), en línea con los objetivos del estudio. Debido el enfoque de muestreo en este estudio, es importante señalar que los resultados no pueden generalizarse a toda la población de cooperativas de la región de Huatusco. No obstante, los resultados de este estudio pueden develar características de las cooperativas que deberían evaluarse cuando se valore la sostenibilidad a largo plazo de una muestra representativa de cooperativas de café en esta región y se realice un análisis cuantitativo en lugar de cualitativo.

La entrevista, como instrumento para obtener información, se dividió en ocho secciones relacionadas con: 1) Perfil del líder que participó en la entrevista (posición en la organización y años de participación en la cooperativa); 2) Información general de la cooperativa (año de fundación, número de miembros, estructura institucional y servicios prestados a los miembros); 3) Características de los socios productores (tamaño medio de la superficie explotada, prácticas típicas de producción, certificaciones, responsabilidades de los socios con la cooperativa y relación socio-cooperativa); 4) Infor-

mación financiera (inversiones de la cooperativa, plazos de pago y ayuda financiera proporcionada a los miembros); 5) Empleados de la cooperativa (número de empleados, nivel de involucramiento con la cooperativa); 6) Infraestructura de la cooperativa (infraestructura interna y equipos propiedad de la cooperativa); 7) Comercialización (compradores y condiciones comerciales); y 8) Retos y oportunidades de la cooperativa. No se formularon preguntas relacionadas con las características demográficas de los participantes en las entrevistas para proteger aún más la confidencialidad de los participantes, ya que sólo se acopió información de un pequeño número de dirigentes de cooperativas. Los protocolos de las entrevistas tuvieron el reconocimiento de la Junta de Revisión Institucional (IRB) de la Universidad de Tennessee (UTK IRB-18-04879). Los autores pueden enviar una copia de la entrevista, la cual está disponible a solicitud.

Se utilizó un enfoque de investigación cualitativa para analizar la información de las entrevistas semiestructuradas. La investigación cualitativa es útil para conocer la percepción y experiencia individual real en relación con situaciones específicas (Bruce *et al.*, 2019; Martínez-López *et al.*, 2021). Las notas del investigador que realizó las entrevistas se codificaron y analizaron. Al igual que Bruce *et al.* (2019), el proceso de codificación fue completado por el investigador que realizó las entrevistas e incluyó tres lecturas de las notas. La lectura inicial identificó los temas generales, la segunda lectura identificó los temas importantes comunes a todas las cooperativas, y la tercera lectura reclasificó los contenidos en temas generales y subtemas comunes a las cinco cooperativas incluidas en este estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de las entrevistas

En esta sección, se provee información sobre las características de las cinco cooperativas de café incluidas en este estudio, la historia de estas cooperativas y sus características institucionales. En concreto, se analizan las características comunes a todas las cooperativas que pueden ayudar a explicar su longevidad y sostenibilidad a largo plazo. Además, analizamos las percepciones de los líderes de las asociaciones sobre los retos a los que se enfrentan sus cooperativas y las estrategias para superarlos.

Características generales de las cooperativas

Las cooperativas incluidas en este estudio tienen entre 16 y 32 años de actividad (Cuadro 1). El tamaño de las cooperativas en términos de socios productores oscila entre 17 y 900 (Cuadro 1). El número de empleados de las cooperativas oscila entre 2 y 54. En promedio, las operaciones de los miembros de estas cooperativas son pequeñas, con un tamaño medio de las explotaciones que oscila entre 3 y 5 hectáreas. Todas las cooperativas de productores se enfocan en la compra, procesamiento y comercialización del café de los productores. Otros servicios que prestan estas cooperativas a sus integrantes son asistencia técnica, acceso a insumos de bajo costo y a recursos gubernamentales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resumen de las características de las asociaciones de productores de café.

ID	No. de empleados	No. de productores que venden café	Tamaño promedio del predio de los integrantes (ha)	Año de fundación	Servicios para productores de café
A	2	17	5	2000	Compra de café, procesamiento, y comercialización. Asistencia técnica
B	4	350	2	2006	Compra de café, facilitar al productor de café el acceso a recursos gubernamentales, acceso del productor a certificación, y asistencia técnica
C	54	1,324 (900 vendían café a través de cooperativas en 2019)	1.8	1991	Compra de café y comercialización, acceso a certificación, asistencia técnica, y educación en salud.
D	9	26	2.5	1990	Compra de café y comercialización, acceso a certificación, acceso a insumos de bajo costo (composta, plantas de café).
E	9	276	3	2008	Compra de café, procesamiento, y comercialización, acceso a recursos gubernamentales.

Historia de las cooperativas

La historia de las cooperativas de café podría ayudar a entender las motivaciones relacionadas con la creación de las organizaciones. Como sugieren estudios anteriores (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera y Olgún-Pérez, 2018), estas motivaciones podrían tener un impacto en la longevidad y sostenibilidad a largo plazo de las asociaciones de productores. Se preguntó a los líderes de las cooperativas sobre la historia de su organización, incluido el año de creación de la cooperativa, el número de socios productores cuando se estableció la cooperativa, las motivaciones para crearla y los servicios prestados a los socios cuando se creó. Se identificaron temas comunes relacionados con el contexto histórico (las crisis del mercado del café) en el cual se crearon estas cooperativas y las motivaciones relacionadas con la creación de las mismas. Este análisis se complementó con un procedimiento de recuento de frecuencias de palabras que ayudó a identificar las palabras que los líderes de las cooperativas utilizaban con más frecuencia en cada sección de la entrevista, con el uso de una macro de Microsoft® Word®. La información permitió identificar los temas que cada líder repetía con más frecuencia y que eran comunes a todas las cooperativas.

La Cooperativa A se constituyó legalmente en el año 2000 con 27 socios productores. Esta cooperativa se creó en el contexto de la crisis internacional del café, con precios bajos que no cubrían el costo de producción del productor. El objetivo de esta cooperativa era encontrar oportunidades de comercialización para agregar valor a la producción de café y obtener mejores precios. Iniciaron el proceso de certificación ecológica en 2002 y obtuvieron la certificación ecológica completa en 2005. En 2002, negociaron

el acceso a un beneficio de café de propiedad privada, con el objetivo de agregar valor al procesar el café que recibían de los agricultores. Alquilaban las instalaciones del beneficio de café a cambio de su trabajo en los terrenos propiedad del dueño del beneficio. Entre 2007 y 2008, obtuvieron financiamiento gubernamental para comprar el beneficio de café, mejorar las instalaciones del beneficio y comprar un tractor y un vehículo. Distribuyeron la propiedad de la infraestructura de la asociación en partes iguales entre los socios. Establecieron que los socios sólo podían vender sus acciones si el 90% de ellos estaban de acuerdo con la venta y el comprador era un familiar o descendiente y no un individuo ajeno al círculo de socios.

La Cooperativa B se fundó en agosto de 2006 para ayudar a 1300 productores de café a superar los retos relacionados con los precios bajos por medio de certificaciones orgánicas y de comercio justo que les permitieran acceder a precios premium en los mercados internacionales. La cooperativa solía acopiar café en varios puntos de la región de Huatusco. Actualmente, acopian el café en un solo lugar para facilitar la logística del almacenaje.

Las Cooperativas C y D se crearon en 1991 y 1990, respectivamente. Cuando se constituyeron legalmente, tenían 91 y 32 socios, respectivamente. Estas cooperativas se crearon en el contexto de la desintegración del INMECAFE, mientras se buscaban oportunidades para aumentar las posibilidades de comercialización de los cafecultores, obtener mejores precios para el café, proporcionar asistencia técnica y aumentar las ganancias de los productores de café. La estructura legal de estas organizaciones estuvo determinada por los requisitos gubernamentales para formar este tipo de organización y tener acceso a los recursos del gobierno, incluida la capacidad de adquirir beneficios para café húmedo y seco a un bajo costo. Ambas cooperativas buscaron certificaciones orgánica y de comercio justo para obtener mejores precios del café, costos de producción más bajos y la satisfacción de un mercado interesado en adquirir un café producido de forma responsable y con menos insumos químicos.

La Cooperativa E se fundó en 2008 con seis productores. Esta cooperativa se diferencia de las demás incluidas en este estudio, ya que fue creada después de la crisis internacional de los precios del café y en que sus actividades centrales son el procesamiento y la comercialización del café en los mercados nacionales, y no en los internacionales. Lo cual implica que la cooperativa E estuvo menos enfocada en producir café de alta calidad y esto se debe a que la calidad del café para demanda interna en México no es tan alta como la del café que se comercializa en los mercados internacionales. Además, esta cooperativa también compra otros productos agrícolas a los socios productores, como nueces de macadamia.

Cuatro de las cinco cooperativas de café presentadas en este estudio se crearon en medio de una crisis económica en el sector cafetalero mexicano. Además, estas cuatro cooperativas pretendían ayudar a los productores a acceder a mejores precios con estrategias para valor agregado a través de procesos de certificación. Al parecer, el acceso a los recursos gubernamentales desempeñó un papel importante en la creación de estas cooperativas, pero no fue la única razón. La longevidad y sostenibilidad a

largo plazo de estas organizaciones podrían explicarse en parte por la motivación que tuvieron de proporcionar a sus socios condiciones de mercado más satisfactorias, tales como mejores precios o condiciones comerciales. No obstante, como sugieren estudios anteriores (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018), las cooperativas que ofrecen mejores condiciones de mercado como su único beneficio para los socios pueden poner en riesgo la sostenibilidad a largo plazo de las cooperativas de café. Esto se debe a que si las asociaciones no pueden cumplir la promesa de mejores condiciones de mercado, es más probable que los socios vendan el café a otros compradores y dejen su compromiso con estas cooperativas de productores (Arana-Coronado *et al.*, 2019). Es importante señalar que las cinco cooperativas incluidas en este estudio prestan servicios múltiples a sus socios, incluidos asistencia técnica, acceso a recursos gubernamentales, acceso a insumos de bajo costo, y educación sanitaria. En la sección siguiente, se exploran las características institucionales de las cooperativas de café, y la relación entre estas asociaciones de productores y sus integrantes como factores que podrían explicar la longevidad y la sostenibilidad a largo plazo de las cooperativas de café incluidas en este estudio.

Características y retos institucionales

En esta sección, se describen algunas características institucionales relacionadas con las responsabilidades de los socios, las responsabilidades de la cooperativa con los socios, la distribución de las ganancias, los procesos de toma de decisiones y las percepciones de los líderes relacionadas con los factores que podrían poner en riesgo la relación entre la cooperativa y sus socios. Se identificaron temas comunes relacionados con las características y los retos institucionales. Como se explicó en la sección anterior, este análisis se complementó con un procedimiento de recuento de frecuencia de palabras que ayudó a identificar las palabras relacionadas con estos temas que los dirigentes de las cooperativas utilizaban con mayor frecuencia. Esta información se utilizó para identificar los temas que el líder de una cooperativa repetía con más frecuencia y que eran comunes a todas las cooperativas.

La Cooperativa A tenía un total de 17 socios en 2019. Los socios tienen la responsabilidad de vender al menos un porcentaje del café producido a la cooperativa. Este porcentaje se establece durante una reunión de los socios. Por ejemplo, en 2015, se esperaba que los socios de la cooperativa vendieran el 90 % de su producción a través de la cooperativa (Mestries-Benquet, 2017). Los socios también tienen que contribuir con su trabajo en la cooperativa. En concreto, tienen que ayudar a cargar y descargar el café del campo hasta las instalaciones de la cooperativa, ser voluntarios de campo en un centro educativo propiedad de la cooperativa y vigilar el procesamiento de café en el secador durante la noche (Mestries-Benquet, 2017).

La cooperativa facilita el proceso de certificación orgánica a sus socios, les proporciona asistencia técnica y comercializa su café. Las ganancias de la cooperativa se distribuyen entre sus socios, cubren las tarifas de administración y comercialización, y un porcentaje de las ganancias se reinvierte en la infraestructura que tiene la cooperativa

(Mestries-Benquet, 2017). El consejo de administración de la cooperativa incluye al presidente, secretario y tesorero. Estos cargos se eligen cada dos o tres años. Además, hay un representante legal de la asociación que no puede tomar decisiones sin consultar a los socios de la asociación. Las decisiones se toman a través de un proceso democrático durante las reuniones de la asociación en las cuales participan todos los integrantes.

Los líderes de la Cooperativa A creen que algunos de los factores que influyen negativamente en la relación entre los socios y la cooperativa son los bajos precios del café y los plazos de pago. La cooperativa no tiene la capacidad de pagar íntegramente a los agricultores en el momento en que entregan su café cereza a la cooperativa. Los líderes de la cooperativa creen que es difícil mantener la lealtad de los productores cuando tienen que esperar para obtener los pagos por su café, y cuando tienen la oportunidad de obtener mejores condiciones de venta si venden el café a compradores, ajenos a la cooperativa, que suelen ofrecer el pago íntegro en el momento de la venta.

La directiva de la Cooperativa B indicó que la cooperativa tenía 600 socios en 2019, pero solo 350 vendían café a través de la organización de cooperativistas. Los socios productores tienen que vender al menos entre el 25 y el 30 por ciento de su producción total a la cooperativa y participar en las reuniones anuales. La cooperativa se encarga de facilitar el acceso de los socios a los programas gubernamentales, proporcionar asistencia técnica, facilitar la certificación, conceder préstamos con intereses bajos a través de la cooperativa y garantizar la compra del café de los socios. Un porcentaje de las ganancias de la cooperativa se distribuye entre los socios. El resto se utiliza para financiar el proceso de certificación y pagar la deuda de la asociación.

Cuando la cooperativa comenzó a funcionar, se centró en la compra de café para alcanzar un determinado volumen sin tener un contrato de compra. Adquirieron una deuda para comprar café a los socios y aliviar el problema de la morosidad, pero debido a la falta de contratos de compra, los flujos de caja de la cooperativa no han sido suficientes para pagar totalmente la deuda. Los cargos directivos de la Cooperativa B, incluidos el de presidente, secretario y representante legal, se eligen a través de un proceso democrático por los socios, con derecho a un voto por socio. Los cargos directivos tienen un período de mandato de dos a tres años. Los directivos de esta cooperativa creen que el principal factor que pone en riesgo la relación entre los socios y la cooperativa es la falta de compromiso de los socios productores. Es difícil obtener el compromiso de los agricultores ya que a veces la cooperativa no tiene el capital de operación para comprar todo el café que los socios están dispuestos a vender a través de esta organización.

La Cooperativa C tenía un total de 1324 socios en 2019, aunque solo 900 vendían café a través de la cooperativa. Los socios tendrían que vender al menos el 75 % de su producción a la cooperativa, aunque este requisito no se hace cumplir en todos los casos. Esta cooperativa proporciona asistencia técnica a sus miembros, les da acceso a la certificación de comercio justo y orgánico, y capacitación relacionada con el acceso a los recursos gubernamentales. Además, proporciona educación para una vida salu-

dable a los socios y sus familias. Las ganancias de la cooperativa se utilizan para pagar el proceso de certificación, proporcionar asistencia técnica a los socios e invertir en el mantenimiento de la infraestructura que posee la cooperativa; es decir, el beneficio de café. Los cargos directivos de la Cooperativa C (presidente, tesorero, representante legal) se rotan cada cuatro años. La directiva de esta cooperativa cree que los principales factores de riesgo para la relación entre la directiva y sus socios son los plazos de pago largos a los socios y que ellos entiendan que el papel de la cooperativa va más allá de la compra de su café hacia mejorar el bienestar de sus hogares.

La Cooperativa D contaba con un total de 26 socios en 2019, 16 de ellos clasificados como socios fundadores o de tipo A y 10 socios clasificados como tipo B. Los miembros de tipo A poseen acciones de la cooperativa, tienen la opción de formar parte del consejo de administración de la cooperativa, así como a certificaciones orgánicas y de comercio justo, a una cantidad limitada gratuita de abono producido por la cooperativa y a plantas de café a precio con descuento. Los socios de tipo B tienen acceso a los servicios de certificación y comercialización. Las responsabilidades de los socios tipo A incluyen la asistencia a reuniones mensuales y extraordinarias y la venta del 100% de su café a través de la asociación de productores. Un porcentaje de las ganancias de la cooperativa se distribuye entre los socios y otro se reinvierte en la infraestructura de la cooperativa. La parte de las ganancias que retiene la cooperativa varía en función de las necesidades. Por ejemplo, la cooperativa compró un beneficio de café que antes era propiedad del gobierno con aportaciones de las ganancias obtenidas por los socios de la cooperativa.

Las responsabilidades de la cooperativa para con sus miembros incluyen la compra de su café e informar de manera periódica sobre la situación financiera de la organización. La cooperativa ofrece otros servicios a los no socios, como la venta de plantas y acceso al trapiche y al beneficio húmedo de café por una cuota. El representante legal de la cooperativa se elige cada dos años. El mandato de dos años del representante puede prorrogarse en función de su desempeño. La directiva de la Cooperativa D considera que la falta de transparencia sobre las actividades de la cooperativa, la ausencia de un sentido de pertenencia de los socios y el hecho de permitir que los líderes de la organización permanezcan durante mucho tiempo en los puestos de dirección son factores de riesgo para la relación entre la cooperativa y sus socios.

Por último, la Cooperativa E contaba con un total de 10 socios fundadores que invirtieron capital en la cooperativa. Todos estos socios son medianos y grandes productores de café. Hay otros 266 socios que sólo venden café a la cooperativa y pueden acceder a los recursos del gobierno a través de esta organización. Los integrantes no tienen que vender un porcentaje mínimo de su producción de café a la cooperativa. No existen responsabilidades específicas para los integrantes de la cooperativa. En cambio, las responsabilidades de la cooperativa para con sus integrantes incluyen la compra de su café, en función de la demanda, y darles ayuda para acceder a los recursos económicos del gobierno. Las ganancias de la cooperativa se utilizan para pagar los gastos de los empleados y otros gastos operativos, incluidos los sacos de café y las utilidades. El

representante legal de la cooperativa tiene un mandato de cinco años. La directiva de la Cooperativa E cree que si se aumenta el número de integrantes en la cooperativa podría ser un riesgo para la transparencia en la forma en que la cooperativa facilita a los productores el acceso a los recursos gubernamentales. Creen que mantener un liderazgo con principios éticos podría ser la estrategia a seguir para hacer crecer el número de socios en la cooperativa, mientras se mantiene la transparencia al interior de la organización.

Algunas de las características institucionales comunes a estas cooperativas que podrían explicar la longevidad y sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones de productores son las relacionadas con la gobernanza de estas organizaciones. En concreto, los cargos de liderazgo que tienen mandatos predefinidos y no prolongados, los procesos democráticos establecidos que permiten a los socios participar en las decisiones de las asociaciones, y el que tengan responsabilidades claras con la cooperativa podrían explicar la longevidad de estas organizaciones. Además, los servicios que las cooperativas proporcionan a los socios, más allá de la compra de su café o de ofrecerles mejores precios, también podrían explicar la longevidad de estas asociaciones.

Los resultados son consistentes con los hallazgos de investigaciones anteriores que sugieren que un buen sistema de gobernanza, la participación equitativa de los miembros y cooperativas de café que ofrezcan beneficios tangibles e intangibles podrían tener un impacto en la longevidad de estas organizaciones (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016; Rojas-Herrera y Olguín-Pérez, 2018). Un hallazgo propio de este estudio es la posible correlación entre el establecimiento de mandatos predefinidos, no prolongados, para la permanencia en los puestos de liderazgo y la longevidad de las cooperativas de café.

Independientemente de los esfuerzos que las cooperativas de café presentadas en este estudio han realizado para comprometer a los socios con la organización, tal como lo sugieren estudios anteriores, la mayoría de ellas percibe la falta de compromiso de los socios como uno de los factores que pone en riesgo la sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016). La confianza, el compromiso, la lealtad y el sentido de pertenencia de los agricultores hacia las cooperativas y, en general, la cohesión recíproca entre ellos y la dirección de las cooperativas, son atributos identificados por varios estudios como relevantes para el desarrollo de organizaciones cooperativas agrícolas más fuertes y de mejor rendimiento (Hansen *et al.*, 2002; Rubén y Heras, 2012; Mujawamariya *et al.*, 2013; Luna y Wilson, 2015).

Una de las desventajas de las cooperativas de café frente a los compradores locales es que estas organizaciones no pueden pagar todo al agricultor en el momento de la cosecha y entrega del café, mientras que otros compradores locales que ofrecen precios menores en promedio sí pueden hacerlo (Bacon, 2005; Mujawamariya *et al.*, 2013; Milford, 2014; Luna y Wilson, 2015; Arana-Coronado *et al.*, 2019). La incapacidad de las cooperativas para pagar íntegramente a los agricultores en el momento de la cosecha se ve agravada por el hecho de que una cooperativa informó de que tenía problemas para pagar su deuda. La imposibilidad de proporcionar el pago completo

a los agricultores en el momento de la entrega repercute negativamente en la fidelidad y el compromiso de ellos con la cooperativa, según la percepción de sus dirigentes. En general, la escasez de efectivo en el momento de la cosecha es problemática para los agricultores y las cooperativas, ya que los primeros se verán inducidos a vender más café a otros compradores locales de lo que harían en caso contrario, y las cooperativas acopiarán volúmenes menores y se reducirá su poder de negociación. Todo esto afectará en última instancia la rentabilidad de los pequeños productores de café y su compromiso con la cooperativa. Cabe destacar que de las cinco cooperativas entrevistadas, cada una tiene requisitos diferentes en cuanto a la proporción (variable entre el 0% y el 100%) de la producción total de café que se espera que los socios vendan a través de las cooperativas a las cuales están afiliados. Esta política puede estar relacionada o no con el nivel de efectivo que tienen las cooperativas en el momento de la cosecha, lo que en última instancia podría afectar su capacidad para pagar a los agricultores y mantener el compromiso de los socios con la cooperativa.

Percepción de los retos futuros y estrategias para superarlos

Se preguntó a los dirigentes de las cooperativas sobre su percepción de los retos futuros que pueden enfrentar sus cooperativas y los planes que tienen para superarlos. Se identificaron temas comunes y se complementó este análisis con un procedimiento de recuento de frecuencia de palabras. Se detectaron las palabras que los líderes repetían con frecuencia y se amplió el contexto en que se utilizaban.

Los dirigentes de la Cooperativa A creían que los principales retos a los que se enfrentaba esta cooperativa en 2019 y a los que probablemente se enfrentarían en el futuro incluía la falta de transparencia de los dirigentes de los grupos de intermediarios u organizaciones que acopian café de varias cooperativas para exportarlo, lo cual podría poner en riesgo las oportunidades de comercialización. Creen que el envejecimiento de los productores de café y la falta de motivación de la siguiente generación de productores para permanecer en la región podrían poner en riesgo la sostenibilidad a largo plazo de esta cooperativa. Así mismo, la directiva de esta cooperativa cree que educar a la próxima generación de productores en los aspectos técnicos de la producción de café, y en ética y gestión podría ayudar a superar los retos mencionados. Además, como menciona Mestries-Benquet (2017), los dirigentes en la Cooperativa A creen que reinvertir parte de las ganancias de la cooperativa para crear su propio mecanismo de préstamo o financiamiento les daría una sensación de independencia frente a los problemas relacionados con la falta de transparencia y gestión de las organizaciones intermediarias.

La directiva de la Cooperativa B cree que los principales retos a los que se enfrentaron en 2019 son los que probablemente continuarán en el futuro. Es decir, su capacidad para pagar la deuda adquirida, el compromiso de los miembros de vender su café a la cooperativa y el envejecimiento de los productores de café. No tienen una idea clara de las estrategias a seguir para superar esos retos. Creen que el apoyo del gobierno es necesario para ayudarles con el refinanciamiento de la deuda adquirida, la cual fue el reto principal que enfrentaron en 2019.

Según la directiva de la Cooperativa C, los retos más importantes a los que puede enfrentarse esta cooperativa en el futuro incluyen el envejecimiento de los productores de café y una generación más joven de productores potenciales migrando a las ciudades. También perciben el cambio climático como una gran amenaza que podría poner en riesgo la producción de café en la región, pero no la sostenibilidad de la cooperativa a largo plazo. Creen que si el cambio climático obligara a los agricultores a producir un cultivo diferente al café, la cooperativa seguiría existiendo para mejorar el bienestar de los socios y sus familias. Tienen planeado aumentar la participación de los jóvenes en las actividades de la cooperativa para motivarlos a permanecer en la región produciendo café y otros cultivos.

Los principales retos percibidos por los dirigentes de la Cooperativa D son los bajos precios de venta, la baja productividad debido a la roya del café, el tiempo que transcurre desde que los líderes reciben el café de los productores hasta el momento en que la cooperativa puede pagarles, el envejecimiento de la población de productores de café y el cambio climático que podría afectar la fertilidad del suelo, la productividad y la calidad del café. Los dirigentes de esta cooperativa sugirieron un par de estrategias para superar los retos mencionados, como reducir el porcentaje de café vendido en los mercados internacionales y aumentar la venta de café en los mercados nacionales; además de centrarse en producir cafés de especialidad que se venden a precios más elevados.

El principal reto al que se enfrenta la Cooperativa E, según sus dirigentes, es la falta de capital circulante para aumentar el tamaño de la asociación y garantizar los requisitos de volumen para la comercialización, lo cual es la misión de la cooperativa y ampliar las oportunidades de comercialización a los productores a través de tiendas locales de cafés de especialidad. La cooperativa posee actualmente una cafetería y esperaba aumentar el número de tiendas de café en la región de Huatusco y otras regiones del estado de Veracruz.

Aunque los dirigentes de cada cooperativa mencionaron desafíos únicos que podrían enfrentar en el futuro, cuatro de las cinco cooperativas incluidas en este estudio percibieron el envejecimiento de los productores como uno de los retos más importantes que enfrentarán. Dos de estas cooperativas mencionaron la necesidad de aumentar la participación de los jóvenes en la cooperativa para superar este desafío, por medio de entrenamiento y actividades educativas.

Dos de las cinco cooperativas mencionaron el cambio climático como un reto importante, pero los dirigentes no mencionaron una estrategia clara sobre cómo superarlo. Uno de los líderes cooperativistas cree que el papel de la cooperativa va más allá de la comercialización del café; y señala que las cooperativas desempeñan un papel importante en la mejora de las condiciones de vida de los socios y sus familias, con independencia de los tipos de cultivos que puedan producir en el futuro debido al cambio climático.

CONCLUSIONES

En este artículo, se describen cinco cooperativas de productores de café que tienen una larga historia en la región cafetera de Huatusco y se trató de identificar los factores que podrían explicar la permanencia y sostenibilidad a largo plazo de estas organizaciones. Además, se evaluaron los desafíos que podrían poner en riesgo la sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones y las estrategias para superar estos desafíos desde la perspectiva de los líderes de la cooperativa.

Al igual que los resultados de investigaciones anteriores (Hansen *et al.*, 2002; Ruben y Heras, 2012; Mujawamariya *et al.*, 2013; Luna y Wilson, 2015), los resultados de este estudio sugieren que la confianza, el compromiso, la lealtad y el sentido de pertenencia de los agricultores hacia las cooperativas y, en general, la cohesión recíproca entre los agricultores y los dirigentes de las cooperativas, son atributos que podrían estar correlacionados con la longevidad y la sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones de productores.

Al observar la historia de estas cooperativas, parece que la motivación detrás de la creación de estas asociaciones de productores fue garantizar la supervivencia de los cafetaleros de la región y aumentar su sostenibilidad económica, proporcionando oportunidades de comercialización a través de procesos de certificación de la calidad del café, en medio de la crisis económica del sector cafetero mexicano e internacional. Es importante señalar que, aunque la creación de asociaciones de productores era un requisito para acceder a los recursos del gobierno, y podría haber sido la motivación para que algunos miembros se unieran a las cooperativas, ninguno de los líderes de las cooperativas mencionó el acceso a los recursos del gobierno para los productores como el objetivo final o la misión de la cooperativa.

Como sugieren Rojas-Herrera y Olguín-Pérez (2018), las motivaciones detrás de la creación de una asociación de productores podrían tener un impacto en la sostenibilidad a largo plazo de las organizaciones y, por lo tanto, la longevidad de las cooperativas incluidas en este estudio podría explicarse en parte por las motivaciones detrás de la creación de estas cooperativas. No obstante, como sugieren Rodríguez-Hernández *et al.* (2016), la misión de las cooperativas, previamente establecida, no es el único factor que influye en la longevidad de estas asociaciones. Los beneficios tangibles e intangibles que ofrecen las cooperativas de café y que motivan la participación de los socios, así como los buenos sistemas de gobernanza que funcionan de forma transparente, son factores que influyen en la longevidad de estas asociaciones de productores de café (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2016).

En cuanto a la estructura institucional de las cooperativas, sobre todo en lo que respecta a la gobernanza, los resultados sugieren que, entre los factores que podrían estar correlacionados con la longevidad de estas asociaciones de productores cabe mencionar los mandatos predefinidos, no prolongados, para los puestos de liderazgo, la participación de los miembros en los procesos de toma de decisiones y las estrategias de las cooperativas de café para involucrar a los miembros, incluido el establecimiento del porcentaje mínimo de café que los miembros deben vender a través de la coope-

rativa, la asignación de responsabilidades adicionales a los miembros (por ejemplo, la descarga de café y la supervisión del beneficiado de café) o la participación de sus familias con la cooperativa a través de actividades de educación no necesariamente relacionadas con la producción de café (por ejemplo, la salud). Estos resultados están en consonancia con las conclusiones de investigaciones anteriores relacionadas con el impacto positivo del funcionamiento interno de las cooperativas, el compromiso de los miembros y los sistemas de gobernanza adecuados y transparentes en la sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones de productores (Rodríguez - Hernández *et al.*, 2016).

En cuanto a las percepciones de los líderes de las cooperativas de café sobre lo que enfrentarán sus organizaciones en el futuro, todos mencionaron el envejecimiento de los cooperativistas como un desafío común a la mayoría de las cooperativas de café incluidas en este estudio, sumado a la falta de interés de los jóvenes en seguir involucrados con la producción de café en la región del Huatusco. Investigaciones anteriores han identificado el envejecimiento de los productores como uno de los principales retos que ponen en riesgo la sostenibilidad a largo plazo de las cooperativas de café en el estado de Veracruz (Escamilla-Prado, 2021; Ramos-Rivera *et al.*, 2021). Al igual que en estudios anteriores, los líderes de estas cooperativas mencionaron la necesidad de aumentar el número de actividades destinadas a involucrar a los jóvenes en sus organizaciones como una estrategia para superar este desafío (Escamilla-Prado, 2021). Sin embargo, en otras investigaciones anteriores no se plantearon estrategias o actividades específicas que las cooperativas podrían utilizar para involucrar a la próxima generación de productores de café en esta región. Podría ser importante para los líderes de estas asociaciones desarrollar un plan estratégico para involucrar a la próxima generación de productores de café con sus asociaciones.

Adicionalmente, algunas cooperativas identificaron el cambio climático como uno de los principales retos a los que se enfrentarán en el futuro. Sin embargo, los líderes de estas cooperativas de café no identificaron una estrategia clara para superar este desafío.

Investigaciones anteriores sugieren que los productores de café de esta región han percibido cambios en los ciclos de temperatura y precipitación que están afectando negativamente a los volúmenes de producción y generando presión por la aparición de enfermedades (Hernández-Sánchez y Travieso-Bello, 2021).

Hernández-Sánchez y Travieso-Bello (2021) sugieren que algunas de las medidas adoptadas por los miembros de las cooperativas de café para superar los retos asociados al cambio climático son la diversificación de los cultivos, la plantación de variedades resistentes a las enfermedades y la aplicación de prácticas de conservación del suelo y el agua. No obstante, el estudio sugiere que estas acciones son autónomas y reactivas, lo que implica que podrían ser eficaces a corto plazo, pero no necesariamente en un plazo prolongado. Las cooperativas de café deberían ser proactivas a la hora de explorar medidas que puedan ayudar a sus miembros a ser más resilientes ante los retos de producción a los que se enfrentarán en el futuro debido al cambio climático.

La resiliencia de los miembros de las cooperativas de café repercutirá en última instancia en la longevidad y sostenibilidad a largo plazo de estas asociaciones.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Universidad de Tennessee (Smith Center for International Sustainable Agriculture). La investigación también tuvo apoyo parcial del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (National Institute of Food and Agriculture), a través del proyecto Hatch Multi-State 1020537. Nuestro agradecimiento a dos instituciones mexicanas líderes por su apoyo y participación en este estudio, la Universidad Autónoma Chapingo (Centro Regional Universitario Oriente-CRUO) y el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

REFERENCIAS

- Arana-Coronado J, Trejo-Pech C, Velandia M, and Peralta-Jimenez J. 2019. Factors influencing organic and fair trade coffee growers level of engagement with cooperatives: The case of coffee farmers in Mexico. *Journal of International Food & Agribusiness Marketing* 31 (1): 22–51. <https://doi.org/10.1080/08974438.2018.1471637>
- Bacon C. 2005. Confronting the coffee crisis: Can fair trade, organic, and specialty coffees reduce small-scale farmer vulnerability in northern Nicaragua? *World Development* 33 (3): 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2004.10.002>
- Bruce AB, Maynard ET, Farmer JR. 2019. Farmers' perspectives on challenges and opportunities associated with using high tunnels for specialty crops. *HortTechnology* 29(3): 290–299. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04258-18>
- Cotler P. 2020. Does it pay to cooperate? The case of cooperatives in the Mexican manufacturing sector. *Annals of Public and Cooperative Economics* 91 (4): 497–517. <https://doi.org/10.1111/apce.12281>
- Hansen MH, Morrow JL Jr, Batista JC. 2002. The impact of trust on cooperative membership retention, performance, and satisfaction: An exploratory study. *International Food and Agribusiness Management Review* 5 (1): 41–59. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.34587>
- Hernández-Sánchez MI, Travieso-Bello AC. 2021. Medidas de adaptación al cambio climático en organizaciones cafetaleras de la zona centro de Veracruz, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 24 (1): 1–14.
- Inforural. 2021. Reporte anual de producción de café de México. <https://www.inforural.com.mx/reporte-anual-de-produccion-de-cafe-de-mexico/> (Recuperado: febrero 2022).
- Luna F, Wilson P. 2015. An economic exploration of smallholder value chains: coffee transactions in Chiapas, Mexico. *International Food and Agribusiness Management Association* 18 (3): 85–106.
- Martínez-López A, Alegría-Fernández GA, Medina-Yara G, Rodríguez Padrón B. 2021. La caficultura tradicional frente a la roya anaranjada: El caso de la región tierradentro, Cauca, Colombia. *Agrociencia* 55 (5): 451–469.
- Mestries-Benquet F. 2017. En busca de la autonomía: cooperativismo y comercio justo en la pequeña producción orgánica de café. *Estudios Agrarios* 23 (62): 61–92.
- Milford A. 2014. Co-operative or coyote? Producers' choice between intermediary purchasers and fairtrade and organic co-operatives in Chiapas. *Agriculture and Human Values* 31: 577–591. <https://doi.org/10.1007/S10460-014-9502-X>
- Morales-Ramos V, Escamilla-Prado E, Velásquez-Morales J, Spinoso-Castillo J. 2021. Perfiles de calidad del café de México. Biblioteca Básica de Agricultura. Texcoco, Mexico: Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.
- Mujawamariya G, D'Haese M, Speelman S. 2013. Exploring double side-selling in cooperatives, case study of four coffee cooperatives in Rwanda. *Food Policy* 39 (April): 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2012.12.008>

- Otzen T, Manterola C. 2017. Técnicas de muestreo sobre una población a estudio. *International Journal of Morphology*. 35 (1): 227–232. <https://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v35n1/art37.pdf> (Recuperado: febrero 2022).
- Ramos-Rivera L, Nava-Tablada ME, Escamilla-Prado E. 2021. Mercados diferenciados en organizaciones cafetaleras del centro de Veracruz, México. *Interconectando Saberes* 12 (6): 177–184. <https://doi.org/10.25009/is.v0i12.2716>
- Rodríguez-Hernández O, Santoyo-Cortés VH, Muñoz-Rodríguez M, Rodríguez-Padrón B. 2016. La posición competitiva de las organizaciones cafetaleras en Huatusco, Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(15): 2965–2979.
- Rodríguez-Padrón B, Ruben R, Burger CPJ. 2012. The driving forces and economic impact of co-operative membership: empirical evidence from the Mexican coffee sector. *Journal of Co-operative Studies* 45 (3): 17–31.
- Rojas-Herrera JJ, Olgún-Pérez AM. 2018. Origen, desarrollo y perspectivas de las cooperativas cafetaleras de Huatusco, Veracruz. *LiminaR Estudios Sociales y Humanísticos* 16 (1): 119–133. <https://doi.org/10.29043/liminar.v16i1.568>
- Ruben R, Heras J. 2012. Social capital, governance and performance of Ethiopian coffee cooperatives. *Annals of Public and Cooperative Economics* 83 (4): 463–484. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8292.2012.00473.x>
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). 2019. Sistema de información agroalimentaria de consulta. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. 2019. <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430> (Recuperado: marzo 2022).
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). 2021. Comercio exterior agropecuario y oportunidades de exportación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/640419/Balanza_por_pa_ses_feb_2021_.pdf (Recuperado: marzo 2022).
- Wollni M, Zeller M. 2007. Do farmers benefit from participating in specialty markets and cooperatives? The case of coffee marketing in Costa Rica. *Agricultural Economics* 37 (2–3): 243–248. <https://doi.org/10.1111/j.1574-0862.2007.00270.x>

Agrociencia

Volumen 56, Número 8

16 de noviembre - 31 de diciembre, 2022