

Agrociencia

eISSN: 2521-9766

VOLUMEN 57, NÚMERO 5 | 1 DE JULIO - 15 DE AGOSTO, 2023 | MÉXICO



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

DIRECTORIO

EDITOR EN JEFE DE 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

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 57, Número 5, 1 de julio - 15 de agosto, 2023, Agrociencia es una publicación sesquimensual editada por el Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP 56264. Tel. 5959284427. www.colpos.mx. Editor responsable: **Dr. Fernando Carlos Gómez Merino**. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo 04-2021-031913431800-203. eISSN: 2521-9766, otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Fecha de última modificación, **15 de agosto 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:

**AGROCIENCIA**  
Guerrero #9, Esquina Avenida Hidalgo,  
56220. San Luis Huexotla. Texcoco,  
Estado de México

Teléfono: 595 92 84427

<https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia>

~~~~~  
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: *Oncidium sphacelatum* tonalidad amarilla
Fotografía y créditos: Dra. Obdulia Baltazar Bernal



AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

ANIMAL SCIENCE * CIENCIA PECUARIA

EFFECTS OF SEASON, MAXIMUM TEMPERATURE AND
RELATIVE HUMIDITY ON THE GESTATION SUCCESS
OF TROPICAL MILKING CRIOLLO COWS

860

EFFECTOS DE LA ESTACIÓN, LA TEMPERATURA MÁXIMA Y
HUMEDAD RELATIVA EN EL ÉXITO DE LA GESTACIÓN
DE VACAS CRIOLLAS LECHERO TROPICAL

Froylan Rosales-Martínez, Carlos Miguel Becerril-Pérez,
Adalberto Rosendo-Ponce, César Cortez-Romero,
Glafiro Torres-Hernández, Jaime Gallegos-Sánchez

BIOTECHNOLOGY * BIOTECNOLOGÍA

SOIL SALINITY SHIFTS CULTIVABLE MICROBIAL COMMUNITIES
OF WHEAT (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) RHIZOSPHERE
IN THE YAQUI VALLEY, MEXICO

882

LA SALINIDAD DEL SUELO DESPLAZA A LAS COMUNIDADES
MICROBIANAS CULTIVABLES DE LA RIZOSFERA DEL TRIGO
(*Triticum turgidum* subsp. *durum*) EN EL VALLE DEL YAQUI, MEXICO

Arlett Leticia Ibarra-Villarreal, Jonathan Rojas-Padilla,
Luis Abraham Chaparro-Encinas, Alondra María Díaz-Rodríguez,
Valeria Valenzuela-Ruiz, Angélica Herrera-Sepúlveda,
Fannie Isela Parra-Cota, Sergio de los Santos-Villalobos

CROP SCIENCE * FITOCIENCIA

SOIL CONDITIONS AND EFFECT OF FERTILIZATION ON THE EMISSION
OF GREENHOUSE GASES IN AN ANDEAN COFFEE GRADIENT

920

CONDICIONES DEL SUELO Y EFECTO DE LA FERTILIZACION
SOBRE LA EMISION DE GASES DE EFECTO INVERNADERO
EN UN GRADIENTE CAFETALERO ANDINO

Juan Burneo-Valdivieso, Daniel Capa-Mora, Pablo Ochoa-Cueva



MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NATIVE MAIZE
POPULATIONS OF THE RATÓN RACE FROM COAHUILA, MEXICO

953

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE POBLACIONES NATIVAS DE
MAÍZ DE LA RAZA RATÓN DE COAHUILA, MÉXICO

Delia Margarita **Olvera-Aguilar**, Froylán **Rincón-Sánchez**,
Norma Angélica **Ruiz-Torres**, Juan Manuel **Martínez-Reyna**,
César Daniel **Petroli-Leguiza**

*

AN EXPLORATORY STUDY OF ORCHIDACEAE SPECIES FRUITS IN THE
CENTRAL ZONE OF VERACRUZ STATE, MEXICO

981

ESTUDIO EXPLORATORIO DE FRUTOS DE ESPECIES DE LA FAMILIA
ORCHIDACEAE EN LA ZONA CENTRO DEL ESTADO
DE VERACRUZ, MÉXICO

Obdulia **Baltazar-Bernal**, Víctor Manuel **De-la-Cruz-Martínez**,
Arturo **Hernández-García**, Jesús **Zavala-Ruiz**

*

HUMIC EXTRACT AS A BIOSTIMULANT IN CROPS
SUBJECTED TO ABIOTIC STRESS

1008

EXTRACTO HÚMICO COMO BIOESTIMULANTE EN CULTIVOS
SOMETIDOS A ESTRÉS ABIÓTICO

Reinier **Hernández-Campos**, Celerino **Robles**, Sahylin **Muñiz-Becerá**,
Sandra **Pérez-Álvarez**, Octavio **Loera-Corral**

PLANT PROTECTION * PROTECCIÓN VEGETAL

TOXICITY OF *Argemone mexicana* (L.) EXTRACTS AND IMIDACLOPRID ON
Chrysoperla carnea (Stephens)

1046

TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Argemone mexicana* (L.) E IMIDACLOPRID
SOBRE *Chrysoperla carnea* (Stephens)

Carlos **Serratos-Tejeda**, Arturo **Huerta-de La Peña**,
Juan Antonio **Villanueva-Jiménez**, Agustín **Aragón-García**

SEDIMENT TRANSPORT ESTIMATION FROM HYDROLOGICAL
AND AUTOREGRESSIVE MODELS

1071

ESTIMACIÓN DEL TRANSPORTE DE SEDIMENTOS A PARTIR DE
MODELOS HIDROLÓGICOS Y AUTORREGRESIVOS

Samuel **Rodríguez-Flores**, José Antonio **Quevedo-Tiznado**,
Carlos **Muñoz-Robles**, Patricia **Julio-Miranda**

EFFECTS OF SEASON, MAXIMUM TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY ON THE GESTATION SUCCESS OF TROPICAL MILKING CRIOLLO COWS

Froylan Rosales-Martínez¹, Carlos Miguel Becerril-Pérez^{2,4*}, Adalberto Rosendo-Ponce², César Cortez-Romero³, Glaforo Torres-Hernández⁴, Jaime Gallegos-Sánchez⁴

¹ Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad Maya de Estudios Agropecuarios. Catazajá, Chiapas, Mexico. C. P. 29980.

² Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, Mexico. C. P. 94251.

³ Colegio de Postgraduados Campus San Luis. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, Mexico. C. P. 78622.

⁴ Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, State of Mexico, Mexico. C. P. 56264.

* Author for correspondence: color@colpos.mx

ABSTRACT

The season of the year (ES), maximum temperature (Tmax) and relative humidity (RH) affect gestation success of Tropical Milking criollo (TM) heifers, but their effects on the gestation of TM cows are not completely known. The study aimed to determine the effects of environmental factors along with artificial insemination (AI) service and calving on the gestation success of TM cows. Data were collected during 14 years, 959 records of AI of 155 cows in three seasons: hot-dry (HD), hot-humid (HH) and fresh-dry (FD). The response variables were gestation success of cows at first service after first calving (GF), first calving first to fifth service (GS) and global gestation success (GG). Model effects were ES, Tmax and RH seven days before the AI (PRAI), the day of the service (DAI) and seven days after (POAI); and days open (DO), cumulative milk production (MP), number of service (NS) and calving number (CN). GF was analyzed with logistic regression, and GS and GG with generalized linear models. Over 50 % of estrus occurred in the HH season. Tmax affected GF $\hat{\beta}_1 = -0.13 \pm 0.07$ ($p \leq 0.05$) and GG $\hat{\beta}_1 = -0.08 \pm 0.04$ ($p \leq 0.05$) in PRAI. There were no effects of ES, RH, NS or MP on GF, GS and GG for PRAI, DAI and POAI ($p > 0.05$). DO affected GG in PRAI, DAI and POAI $\hat{\beta}_2 = -0.005 \pm 0.002$ ($p \leq 0.01$). GG were as close to 52.0 % for the three seasons. Although with no statistical differences in multiparous cows ($p > 0.05$), for NS maximum gestation were 60 % at first and third, and minimum 40 % at fourth services; for CN they were 60 % at fourth, and 40 % at sixth and seventh calving, respectively. TM cows are adapted to a hot tropical Climate and their seasonal changes, showing similar pregnancy frequencies among seasons.

Keywords: Adapted cattle, artificial insemination, climatic change, dairy, intertropical region.

Citation: Rosales-Martínez F, Becerril-Pérez CM, Rosendo-Ponce A, Cortez-Romero C, Glaforo Torres-Hernández G, Gallegos-Sánchez J. 2023. Effects of season, maximum temperature and relative humidity on the gestation success of tropical milking criollo cows. *Agrociencia* 57(5): 860-881. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2802

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: May 19, 2022.
Approved: February 20, 2023.
Published in Agrociencia:
June 22, 2023.

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



INTRODUCTION

The hottest climates are found in the planet's intertropical zone, where maximum temperature (Tmax) and relative humidity (RH) are high and the rainfall can be abundant. In addition, climate change has caused the temperature to rise and the rainy period to shorten, with higher duration and intensity of the dry season (Fuentes-Franco *et al.*, 2014; Byrne *et al.*, 2018;).

The main characteristics of hot tropical climates are the mean annual temperature greater than 22 °C, mean temperature of the coldest month greater than 18 °C and altitude less than 1200 m. In these climates, pastoral livestock systems predominate, where animals are exposed throughout the year to adverse climate factors and, parasites and diseases typical of these environments (Hernández-Castellanos *et al.*, 2019).

Heat stress is one of the main reasons for infertility in cattle (Hansen, 2019). In females, high temperatures and RH before fertilization cause high concentrations of cortisol, which reduce the pulses of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the release of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). This produces low concentrations of estradiol and alteration in the communication of the granulosa cells and the oocyte with irreparable damage to the DNA, which in turn is manifested in low percentages of estrus and ovulation (Schüler *et al.*, 2017).

As high environmental temperatures correlate with rectal and body temperatures during the fertilization period, increases in rectal temperature and in the cervical canal are generated (López-Gatius *et al.*, 2021). These changes reduce the viability and motility of sperm and its fertilizing capacity (Monterroso *et al.*, 1995). After fertilization, embryos are sensitive to heat stress during the first stages of their development, with more embryonic reabsorptions and poor-quality blastocysts (Hansen, 2019). Furthermore, climate change is expected to affect cattle exposed to inter-annual climatic variability of grazing systems (Rust, 2019).

In Tropical Milking criollo (TM) heifers, it was verified that Tmax before and RH after artificial insemination (AI) affected their gestation success (%) at first service ($p \leq 0.05$; Rosales-Martínez *et al.*, 2021). Importantly, TM cows have proved to be productive, more resistant to adverse climatic effects and to endo and ectoparasites, due -like adult animals- to their pigmented and thick skin, short and shiny hair and medium size, among other characteristics favorable to hot environments (De Alba, 2011). The breed has more adaptation genes at different frequencies than exotic European breeds (O'Neill *et al.*, 2010). However, the changing weather conditions in the TM habitat, with Tmax and RH above 30 °C and 84 %, make it necessary to quantify their effect on cows to plan their reproduction programs; where the calving-conception interval and the level of milk production could also affect cows' fertility. Therefore, the objective of this study was to quantify the effect of season of the year, maximum temperature and relative humidity, artificial insemination service, and calving number related factors on the gestation success of Tropical Milking criollo cows.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of the seasons of the year

The study was carried out in Veracruz, Mexico at 19° 11' N and 96° 20' W, at an altitude of 23 m. Three climatic seasons of the year were considered, as developed by cluster analysis by Rosales *et al.* (2021), with Tmax and RH as: hot-dry (HD, March-May, 31.6 ± 1.0 °C and 77.2 ± 1.1 %), hot-humid (HH, June-October, 31.4 ± 0.4 °C and 84.7 ± 1.0 %) and fresh-dry (FD, November-February, 26.8 ± 0.5 °C and 84.6 ± 0.3 %). Annual mean temperature and precipitation were 24.8 °C and 1,525.8 mm (INIFAP, 2018; SMN, 2018); the climate of the region is $AW_0(w)(i)gw''$ hot subhumid with rains in summer (García, 1988).

Cow management and data source

Cows were fed with para grass (*Brachiaria mutica* Forssk) and native grasses (*Paspalum* spp.). Milking was manual, once a day in the morning, with the calf presence. The cows in estrus were detected daily throughout the year, with the support of a watch bull. Artificial insemination (AI) was performed 12 h after estrus detection, with straws from TM bull stallion containing 25 million sperm (0.5 mL) and progressive individual motility greater than 60 %. The pregnancy diagnosis was done by transrectal palpation 45-55 d after the AI (Rosendo-Ponce and Becerril-Pérez 2015).

The TM cows' datasets more complex and bigger than the TM heifers come from 14 years of cows of 82.12 ± 1.15 months mean age. A total of 959 AI records from 155 cows were used.

Response variables

Frequencies of estrus were recorded according to watch bulls' detection and estimated by season in relation to year total (%). Regarding the number of AI services as cows' gestation success by season was studied, for the first service after first calving (GF, %; n = 121) and from the first to the fifth service (GS, %; n = 167) and the global gestation success of multiparous cows from the second to the seventh calving and all services (GG, %; n = 792).

Statistical analysis

The effects of season of the year (SE), Tmax and RH on GF, GS and GG were analyzed for the following seven days before the AI service (PRAI), a period in which the preovulatory follicle dominance occurs (Wilson *et al.*, 1998); the service day (DAI), when there is an increase in the uterine temperature and possible reduction in the sperm fertilizing capacity (Monterroso *et al.*, 1995); and seven days after AI service (POAI), a period in which embryos are sensitive to heat stress (Hansen, 2019).

In addition, the effects of days open (DO) and cumulative milk production on the day of service (MP), number of service (NS) and calving number (CN) were also studied. To analyze GF, the following logistic regression model was used:

$$y_{ij} = \mu + ES_i + \beta_1 (x_{1ij} - \bar{x}_{1..}) + \beta_2 (x_{2ij} - \bar{x}_{2..}) + \beta_3 (x_{3ij} - \bar{x}_{3..}) + \beta_4 (x_{4ij} - \bar{x}_{4..}) + \epsilon_{ij}$$

where y_{ij} = is the response variable measured the i -th season of the year, of the j -th cow, which can take values of 1 pregnant or 0 non-pregnant; μ = Constant that characterizes the population; ES_i = fixed effect of the i -th season of the year. $i = 1$ hot-dry, 2 hot-humid and 3 fresh-dry; β_1 = regression coefficient that relates the mean maximum temperatures with the response variable; x_{1ij} = mean of the maximum temperature observed in the i -th season of the year that occurred during the insemination of the j -th cow; $\bar{x}_{1..}$ = mean of mean maximum temperatures; β_2 = regression coefficient that relates the mean relative humidity with the response variable; x_{2ij} = mean of the relative humidity observed in the i -th season of the year that occurred during the insemination of the j -th cow; $\bar{x}_{2..}$ = mean of mean relative humidity; β_3 = regression coefficient that relates days open with the response variable; x_{3ij} = days open in the i -th season of the year during insemination of the j -th cow; $\bar{x}_{3..}$ = mean open days; β_4 = regression coefficient that relates cumulative milk production with the response variable; x_{4ij} = cumulative milk production the i -th season of the year during insemination of the j -th cow; $\bar{x}_{4..}$ = mean cumulative milk production; ϵ_{ij} = random error. $\epsilon_{ij} \sim B(n, p)$.

The data were processed with PROC LOGISTIC; opportunity ratios and 95 % confidence intervals were obtained for Tmax, RH, DO and MP. GS and GG were analyzed with generalized linear models using PROC GLIMMIX, with a binomial distribution and a logit link function; including NS and CN as independent factors (SAS Institute Inc., 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

Gestation success in the first service of first calving cows (GF)

The frequency of the first estrus with AI per season was HD 19.8, HH 56.2, FD 24.0 %, favoring HH, where 88 % of the annual precipitation occurs and there is greater availability of fresh forage, although Tmax and RH were high.

In a previous study, TM heifers had a more homogeneous frequency per season of 22.7, 39.2 and 38.1 %, respectively (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). For cows served in HD, HH and FD, the GF was 58.3, 48.5, 44.8 % and 49.6 % overall mean. In heifers it was 35.0, 57.9, 58.2 % and 53.0 % overall mean (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). Therefore, the cows of this study had a better performance in HD than the heifers of the similar research, but decreasing in HH and FD.

For cows, the highest and lowest frequency of annual gestations success were in HH at 55.0 and FD 21.7 % compare to 43.0 and 41.9 % of heifers in a previous research. The heifers responded favorably to the HH and FD seasons and the cows stood heat stress better in HD with 23.3 %, which is 8 % higher than the heifers (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). The TM bulls showed better mass motility and a higher number of normal

sperm in HD (Villatoro *et al.*, 2016). It is preferable to conceive the cows at the first AI service, since labor and semen straws costs are reduced and obtain a new lactation, and a calf every year (Kim and Jeong 2019).

Tmax affected GF only in PRAI ($p \leq 0.05$; Table 1). For TM heifers in the previous study, ES affected GF ($p \leq 0.05$) and a similar effect of Tmax in GF was estimated ($p \leq 0.02$; Rosales-Martínez *et al.*, 2021). No effects of ES, RH, DO and MP were observed in GF for PRAI, DAI and POAI ($p > 0.05$). Heat dissipation by convection, conduction and evaporation are lower in heifers because they have a smaller body surface than cows; by increasing their size, heifers increase their ability to dissipate latent heat (Dahl *et al.*, 2020).

Table 1. Effect of season, maximum temperature (Tmax), relative humidity (RH), days open (DO) and cumulative milk production (MP), seven days before the artificial insemination on gestation success at the first service after first calving in Tropical Milking criollo cows.

| Variable | OR | CI | <i>p</i> |
|------------------|------|-------------|----------|
| Hot-dry season | 1.0 | | 0.7031 |
| Hot-humid season | 0.69 | 0.26 – 1.81 | |
| Fresh-dry season | 0.64 | 0.20 – 1.96 | |
| Tmax | 0.87 | 0.76 – 0.99 | 0.0472 |
| RH | 1.03 | 0.96 – 1.11 | 0.4427 |
| DO | 0.99 | 0.99 – 1.01 | 0.7975 |
| MP | 1.00 | 0.98 – 1.00 | 0.8790 |

OR= Opportunity ratio; CI = Confidence interval (95%); *p*-value = for season effect and covariables.

MP was 535.1 ± 20.7 kg with DO of 118.7 ± 6.3 d, which did not influence GF ($p > 0.05$). As Tmax increased by 1 °C in PRAI, the probability of GF decreased, $\hat{\beta}_1 = -0.13 \pm 0.07$ ($p \leq 0.05$) in the three seasons (Figure 1).

This coefficient value in TM heifers of previous research shows that the adverse effect of Tmax was higher $\hat{\beta}_1 = -0.20 \pm 0.09$ ($p \leq 0.02$) (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). In Holstein and Jersey cows, for each increase of 1 point in the Temperature and Humidity Index (ITH), the follicular size decreased 0.1 mm (Schüler *et al.*, 2017).

Holstein cows exposed to ITH under 31-35 had 1.08 more chances of becoming pregnant compared to those with ITH over 70 (García-Ispuerto *et al.*, 2007).

The decrease in GF in bovine females is related to increase cortisol under heat stress (Idris *et al.*, 2021). High Tmax and RH reduce the GnRH pulses that disrupt the synthesis of steroid hormones in the follicle (Schüler *et al.*, 2017). Exposure to long periods of high temperature and relative humidity can generate chronic stress that reduces estradiol concentrations in the follicles (Abdelnour *et al.*, 2020) and frequently inhibits ovulation; in addition, poor communication between the granulosa cells and the oocyte and irreparable damage to the DNA (Paula-Lopes *et al.*, 2012).

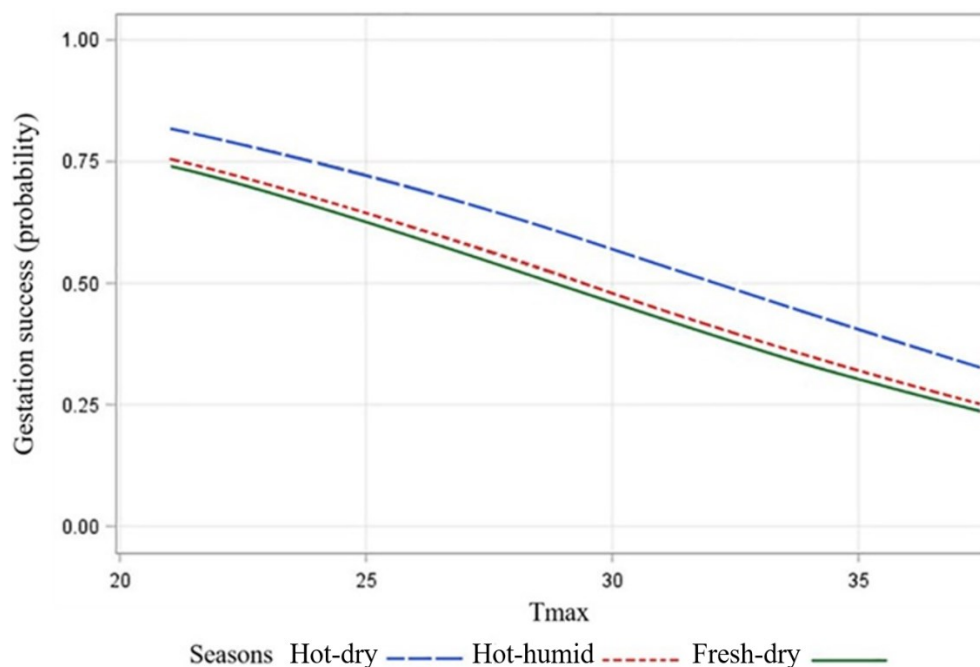


Figure 1. Relationship between the maximum temperatures (T_{max} , °C) of seven days before artificial insemination with the probability of gestation success at the first service after first calving in Tropical Milking criollo cows.

Gestation success in all services of first calving cows (GS)

The frequency of estrus per season was HD 19.8, HH 47.9 and FD 32.3 % similar to the first estrus in heifers (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). In HD, the temperature exceeded 30 °C, which affects the development of the dominant follicle, with low estradiol secretions that can generate prolonged follicular dominance, affect the manifestation of estrus and decrease ovulation (Schüler *et al.*, 2017).

No effects of ES, T_{max} , RH, DO, MP and NS were observed in GS for PRAI, DAI and POAI ($p > 0.05$). The mean probabilities estimated by season were HD 0.48 ± 0.11 , HH 0.67 ± 0.07 and FD 0.60 ± 0.08 ($p > 0.05$). In TM heifers, estimated probabilities lower than 0.50 in HD and higher than 0.70 in HH were different ($p \leq 0.05$; Rosales-Martínez *et al.*, 2021). Dairy cows from temperate climates show fertility problems when introduced to hot tropical regions; however, *Bos taurus* naturalized for centuries are adapted to these regions (Lima *et al.*, 2020).

In this study, TM cows showed similar gestation success probabilities at first pregnancy in the three seasons and in the three AI periods in the five AI services. Criollo breeds have adapted to the changing seasons of the different climates of the tropical regions (De Alba, 2011).

Global gestation success in multiparous cows (GG)

The estrus frequency of multiparous cows per season was HD 25.4, HH 50.6 and FD 24.0 %, similar to the first calving cows. There were no effects of ES, RH, MP, NS or CN on GG for PRAI, DAI and POAI; however, Tmax affected GG in PRAI ($\hat{\beta}_1 = -0.08 \pm 0.04$; $p \leq 0.05$).

In cows under heat stress, theca and viability of granulosa cells of the follicles are affected (Khan *et al.*, 2020), hormonal synthesis is interrupted and estradiol concentration is reduced, reducing follicular development with damage to the oocyte (Abdelnour *et al.*, 2020), so it takes at least three estrous cycles to reestablish their competence.

Although no effect of Tmax was observed three days before AI in dairy cows, when the ITH increased from 70 to 80 points the gestation rate decreased from 30.6 to 23 % (García-Ispuerto *et al.*, 2007). Holstein cows exposed to ITH greater than 72 points in the 42 to 1 days before AI were 31 % less likely to become pregnant (Schüler *et al.*, 2014).

MP was 634.2 ± 22.8 kg, almost 100 kg more than at first service after first calving cows, which did not affect GS in any of the three AI models ($p > 0.05$). Moderate amounts of high-solids milk production and the medium size of the multiparous cows generate little metabolic heat that can be dissipated in high temperatures and RH.

Animals under stress for several years generate metabolic and genetic adaptations to contribute to the performance of the physiological process in turn (Collier *et al.*, 2019). High milk-producing cows by genetic selection in temperate regions require more AI services per conception (Walsh *et al.*, 2011).

DO in multiparous cows was 120.7 ± 4.8 , similar to the first service after first calving cows. DO affected GG in PRAI, DAI and POAI ($\hat{\beta}_3 = -0.005 \pm 0.002$; $p \leq 0.01$). When the gestation rate increased 1 %, a decrease of four was observed in days open (VanRaden *et al.*, 2004), for which it is convenient that the cows are gestated at the first AI service. Mean GG probabilities by season for PRAI, DAI and POAI were all close to 0.52 (Table 2).

Schüler *et al.* (2014) estimated GG of 31.0 % in Holstein cows under Tmax of 29.8 °C and maximum RH of 96.1 %, and when the ITH increased from 72 to more than 78

Table 2. Global gestation success probability of Tropical Milking criollo multiparous cows in three seasons ($p > 0.05$).

| Period of Tmax and RH effect | Season | | |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Hot-dry | Hot-humid | Fresh-dry |
| AI previous seven days | 0.50 ± 0.06 | 0.54 ± 0.05 | 0.52 ± 0.06 |
| AI day | 0.50 ± 0.06 | 0.52 ± 0.05 | 0.55 ± 0.06 |
| AI posterior seven days | 0.49 ± 0.06 | 0.54 ± 0.05 | 0.53 ± 0.06 |

Tmax = Maximum temperature; RH = Relative humidity; AI = Artificial insemination.

points, the gestation decreased from 39.4 to 31.6 % (Lozano *et al.*, 2005). Although no statistical differences were observed ($p > 0.05$) of GG by period of service for NS and CN (Figure 2), probabilities greater than 0.50 were observed in the first three services and in the first four calvings.

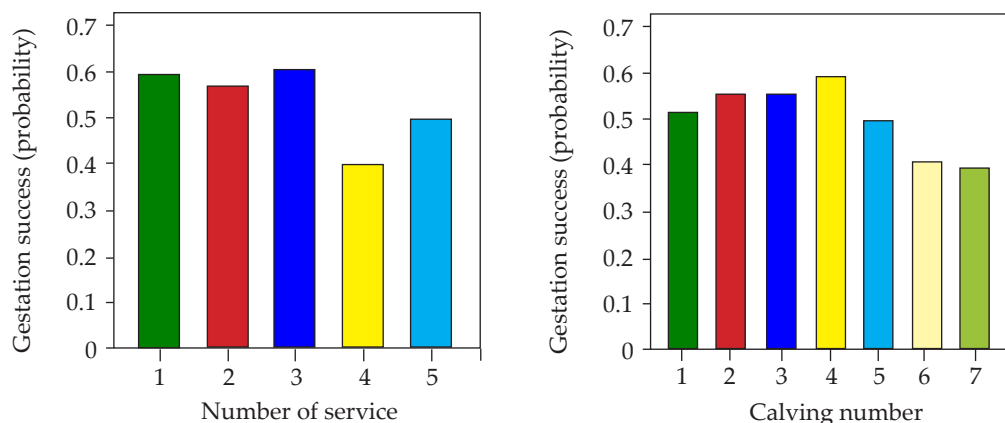


Figure 2. Global gestation success probability in multiparous Tropical Milking criollo cows by number of service and by calving number ($p > 0.05$).

Lozano *et al.* (2005) observed 38.2 % of gestation in Holstein cows of first calving and in cows of three calvings or more the gestation decreased to 32.7 %. *Bos taurus* introduced and maintained in unfavorable environments through centuries have adaptive characteristics such as short hair (Baena *et al.*, 2019), low concentrations of triiodothyronine and thyroxine to decrease the production of thyrotropin-releasing hormone, as a metabolic heat reduction mechanism, and increases in heat dissipation through sweat glands and respiratory rate (Sejian *et al.*, 2018). Romosinuano criollo embryos were more tolerant to heat stress than other non-adapted breeds (Hernández-Cerón *et al.*, 2004). TM cows are long-lived; some can even reach up to 20 years (De Alba, 2011), which shows their ability to adapt to a hot tropical climate, making it a useful genotype to face the challenges of animal production in adverse and changing scenarios.

CONCLUSIONS

Tropical Milking cows showed the highest frequency of estrus in the hot humid season, and no season effect on gestation success, evidence of their adaptation and ability to reproduce even under changing and adverse climatic conditions. Nevertheless, the maximum temperature of the seven days before artificial insemination affected the gestation success at the first service after first calving cows and the global gestation success of multiparous cows. Before artificial insemination, the detrimental effects of

maximum temperature were lower in multiparous cows than in the first service after first calving cows.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico, for the first author's grant.

REFERENCES

- Abdelnour AS, Swelum AA, Abd El-Hack EM, Khafaga FA, Taha EA, Abdo M. 2020. Cellular and functional adaptation to thermal stress in ovarian granulosa cells in mammals. *Journal of Thermal Biology* 92: 12688. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102688>
- Baena MM, Costa AC, Viera GC, Rocha RFB, Ribeiro ARB, Ibelli AMG, Meirelles SLC. 2019. Heat tolerance responses in a *Bos taurus* cattle raised in a Brazilian climate. *Journal of Thermal Biology* 81: 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.02.017>
- Byrne MP, Pendergrass AG, Rapp AD, Wodzicki KR. 2018. Response of the intertropical convergence zone to climate change: location, width, and strength. *Current Climate Change Reports* 4: 355–370. <https://doi.org/10.1007/s40641-018-0110-5>
- Collier RJ, Baumgard LH, Zimbelman RB, Xiao Y. 2019. Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. *Animal Frontiers* 9 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1093/af/vfy031>
- Dahl GE, Tao S, Laporta J. 2020. Heat stress impact immune status in cows across the life cycle. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 116. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00116>
- De Alba J. 2011. El libro de los bovinos criollos de América. Colegio de Postgraduados. México.
- Fuentes-Franco R, Coppola E, Giorgi F, Pavia GE, Tefera DG, Graef F. 2014. Inter-annual variability of precipitation over Southern Mexico and Central America and its relationship to sea surface temperature from a set of future projections from CMIP5 GCMs and RegCM4 CORDEX simulations. *Climate Dynamics* 45: 425–440. <https://doi.org/10.1007/s00382-014-2258-6>
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-Ispierto I, López-Gatius F, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, De Rensis F, López-Béjar M. 2007. Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. *Theriogenology* 67: 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.009>
- Hansen PJ. 2019. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. *Animal Reproduction* 16: 497–507. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0053>
- Hernández-Castellanos LE, Nally JE, Lindahl J, Wanapat M, Alhidary IA, Figueiro D, Grace D, Ratto M, Bambou JC, Almeida AM. 2019. Dairy science and health in the tropics: challenges and opportunities for the next decades. *Tropical Animal Health and Production* 51: 1009–1017. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01866-6>
- Hernández-Cerón J, Chase Jr CC, Hansen PJ. 2004. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *Journal of Dairy Science* 87: 53–58. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73141-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73141-0)
- Idris M, Uddin J, Sullivan M, McNeill DM, Phillips JC. 2021. Non-invasive physiological indicators of heat stress in cattle. *Animals* 11 (1): 71. <https://doi.org/10.3390/ani11010071>
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2018. Laboratorio Nacional de Modelaje y Sensores Remotos. Datos históricos climatológicos, 2000–2013, del estado de Veracruz, México. <http://clima.inifap.gob.mx/lnmysr>
- Khan A, Dou J, Wang Y, Jiang X, Khan MZ, Luo H, Usman T, Zhu H. 2020. Evaluation of heat stress effects on cellular and transcriptional adaptation of bovine granulosa cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 11: 25. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0408-8>

- Kim IH, Jeong JK. 2019. Risk factors limiting first service conception rate in dairy cows and their economic impact. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 32: 519–526. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0296>
- Lima SBGPNP, Stafuzza NB, Pires BV, Bonilha SFM, Cyrillo JNSG, Negro JA, Paz CCP. 2020. Effect of high temperature on physiological parameters of Nelore (*Bos taurus indicus*) and Caracu (*Bos taurus taurus*) cattle breeds. *Tropical Animal Health and Production* 52 (5): 2233–2241. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02249-y>
- López-Gatius F, García-Ispuerto I, Hunter RHF. 2021. Cervix-rectum temperature differential at the time of insemination is correlated with the potential for pregnancy in dairy cows. *Journal of Reproduction and Development* 67 (4): 251–255. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-022>
- Lozano DRR, Vásquez PCG, González PE. 2005. Efecto del estrés calórico y su interacción con otras variables de manejo y productivas sobre la tasa de gestación de vacas lecheras en Aguascalientes, México. *Veterinaria México* 36 (3): 245–260. <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2005/vm053a.pdf>
- Monterroso VH, Drury KC, Ealy AD, Edwards JL, Hansen PJ. 1995. Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. *Theriogenology* 44: 947–961. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00282-D](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00282-D)
- O'Neill JC, Swain LD, Kadarmideen NH. 2010. Evolutionary process of *Bos taurus* cattle in favorable versus unfavorable environments and its implications for genetic selection. *Evolutionary Applications* 3: 422–433. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00151.x>
- Paula-Lopes FF, Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOA, Visintin JA. 2012. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Animal Reproduction* 9 (3): 395–403.
- Rosales-Martínez F, Rosendo-Ponce A, Cortez-Romero C, Gallegos-Sánchez J, Cuca-García JM, Becerril-Pérez CM. 2021. Relation of the maximum temperature and relative humidity close to the insemination with the Tropical Milking criollo heifer's gestation in three seasons. *Tropical Animal Health and Production* 53 (1): 27. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02430-3>
- Rosendo-Ponce A, Becerril-Pérez CM. 2015. Avance en el conocimiento del bovino criollo Lechero Tropical de México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2: 233–243.
- Rust JM. 2019. The impact of climate change on extensive and intensive livestock production systems. *Animal Frontiers* 9 (1): 20–25. <https://doi.org/10.1093/af/vfy028>
- SAS Institute Inc. 2010. *User's Guide: Statistic, Version 9.4 for Windows*. Cary, NC, USA.
- Schüler LK, Burfeind O, Heuwieser W. 2014. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature-humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology* 81: 1050–1057. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.029>
- Schüler LK, Michaelis I, Heuwieser W. 2017. Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows. *Theriogenology* 102: 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.004>
- Sejian V, Bhatta R, Gaughan JB, Dunshea FR, Lacetera N. 2018. Review: Adaptation of animals to heat stress. *Animal* 12 (S2): s431–s444. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001945>
- SMN (Servicio Meteorológico Nacional). 2018. Consulta de base de datos 2000-2013. Sistema de información climatológica y geográfica del estado de Veracruz, México. <https://smn.conagua.gob.mx/es/>
- VanRaden PM, Sanders AH, Tooker ME, Miller RH, Norman HD, Kuhn MT, Wiggans GR. 2004. Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science* 87 (7): 2285–2292. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70049-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70049-1)
- Villatoro SRJ, Rosendo PA, Canseco SR, Cortez RC, Torres HG, Rosales MF, Becerril PCM. 2016. Seminal characteristics of Tropical Milking bulls in two seasons in Veracruz, Mexico. *Zootecnia Tropical* 34: 301–308.
- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science* 123: 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.001>

Wilson SJ, Kirby CJ, Koenigsfeld AT, Keisler DH, Lucy C. 1998. Effect of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *Journal of Dairy Science* 81: 2132–2138. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(98\)75789-3](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(98)75789-3)

EFFECTOS DE LA ESTACIÓN, LA TEMPERATURA MÁXIMA Y HUMEDAD RELATIVA EN EL ÉXITO DE LA GESTACIÓN DE VACAS CRIOLLAS LECHERO TROPICAL

Froylan Rosales-Martínez¹, Carlos Miguel Becerril-Pérez^{2,4*}, Adalberto Rosendo-Ponce², César Cortez-Romero³, Glaforo Torres-Hernández⁴, Jaime Gallegos-Sánchez⁴

¹ Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad Maya de Estudios Agropecuarios. Catazajá, Chiapas, México. C. P. 29980.

² Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México. C. P. 94251.

³ Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México. C. P. 78622.

⁴ Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56264.

* Autor para correspondencia: color@colpos.mx

RESUMEN

La estación del año (ES), la temperatura máxima (T_{máx}) y la humedad relativa (RH) afectan el éxito de gestación de las vaquillas criollas Lechero Tropical (TM), pero sus efectos sobre la gestación de las vacas TM no son del todo conocidos. El estudio tuvo como objetivo determinar los efectos de los factores ambientales, junto con el servicio de inseminación artificial (AI) y el número de parto, sobre el éxito de gestación de las vacas TM. Se recolectaron datos durante 14 años, 959 registros de AI de 155 vacas en tres estaciones: cálida-seca (HD), cálida-húmeda (HH) y fresca-seca (FD). Las variables de respuesta fueron el éxito de gestación en el primer servicio de vacas de primer parto (GF), de primer parto, primero al quinto servicio (GS) y el éxito de gestación global (GG). Los efectos del modelo fueron ES, T_{máx} y RH siete días antes de la AI (PRAI), el día del servicio (DAI) y siete después (POAI); y días abiertos (DO), producción de leche acumulada (MP), número de servicios (NS) y número de partos (CN). GF se analizó con regresión logística, y GS y GG con modelos lineales generalizados. Más de 50 % de los estros se produjeron en la estación HH. T_{máx} afectó a GF $\hat{\beta}_1 = -0.13 \pm 0.07$ ($p \leq 0.05$) y GG $\hat{\beta}_1 = -0.08 \pm 0.04$ ($p \leq 0.05$) en PRAI. No hubo efectos de ES, RH, NS o MP sobre GF, GS y GG en PRAI, DAI y POAI ($p > 0.05$). DO afectó a GG en PRAI, DAI y POAI $\hat{\beta}_2 = -0.005 \pm 0.002$ ($p \leq 0.01$). Los GG se aproximaron a 52.0 % en las tres estaciones. Aunque sin diferencias estadísticas en las vacas multíparas ($p > 0.05$), para los NS las gestaciones máximas fueron de 60 % en el primer y tercer parto, y las mínimas del 40 % en el cuarto; para los CN fueron de 60 % en el cuarto parto, y de 40 % en el sexto y séptimo, respectivamente. Las vacas TM están adaptadas al clima cálido tropical y a sus cambios estacionales, mostrando frecuencias de gestación similares entre estaciones.

Palabras clave: Ganado adaptado, inseminación artificial, cambio climático, lechería, región intertropical.

Citation: Rosales-Martínez F, Becerril-Pérez CM, Rosendo-Ponce A, Cortez-Romero C, Glaforo Torres-Hernández G, Gallegos-Sánchez J. 2023. Efectos de la estación, la temperatura máxima y humedad relativa en el éxito de la gestación de vacas criollas lechero tropical. *Agrociencia* 57(5): 860-881. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2802

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: May 19, 2022.
Approved: February 20, 2023.
Published in Agrociencia:
June 22, 2023.

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



INTRODUCCIÓN

Los climas más cálidos se encuentran en la zona intertropical del planeta, donde la temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$) y la humedad relativa (RH) son elevadas y las precipitaciones pueden ser abundantes. Además, el cambio climático ha provocado un aumento de la temperatura y un acortamiento del periodo de lluvias, con una mayor duración e intensidad de la estación seca (Fuentes-Franco *et al.*, 2014; Byrne *et al.*, 2018;).

Las principales características de los climas cálidos tropicales son la temperatura media anual mayor a 22 °C, temperatura media del mes más frío mayor a 18 °C y altura sobre el nivel del mar menor a 1200 m. En estos climas predominan los sistemas ganaderos pastoriles, donde los animales están expuestos durante todo el año a factores climáticos adversos y a parásitos y enfermedades propias de estos ambientes (Hernández-Castellanos *et al.*, 2019).

El estrés calórico es una de las principales causas de infertilidad en el ganado vacuno (Hansen, 2019). En las hembras, las altas temperaturas y la RH antes de la fecundación provocan altas concentraciones de cortisol, que reducen los pulsos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Esto produce bajas concentraciones de estradiol y alteración en la comunicación de las células de la granulosa y el ovocito, con daños irreparables en el ADN, lo que a su vez se manifiesta en bajos porcentajes de estro y ovulación (Schüler *et al.*, 2017).

Como las altas temperaturas ambientales se correlacionan con las temperaturas rectales y corporales durante el periodo de fecundación, se generan aumentos de la temperatura rectal y del canal cervical (López-Gatius *et al.*, 2021). Estos cambios reducen la viabilidad y motilidad de los espermatozoides y su capacidad fecundante (Monteirroso *et al.*, 1995). Tras la fecundación, los embriones son sensibles al estrés calórico durante las primeras etapas de su desarrollo, con más reabsorciones embrionarias y blastocistos de baja calidad (Hansen, 2019). Además, se prevé que el cambio climático afecte al ganado expuesto a la variabilidad climática interanual de los sistemas de pastoreo (Rust, 2019).

En vaquillas criollas Lechero Tropical (TM), se comprobó que la $T_{\text{máx}}$ antes y la RH después de la inseminación artificial (AI) afectaron el éxito de su gestación (%) al primer servicio ($p \leq 0.05$; Rosales-Martínez *et al.*, 2021). Por otro lado, las vacas TM han mostrado ser productivas, más resistentes a efectos climáticos adversos y a endo y ectoparásitos, -como animales adultos- a su piel pigmentada y gruesa, pelo corto y brillante y tamaño mediano, entre otras características favorables a ambientes cálidos (De Alba, 2011). La raza tiene más genes de adaptación en diferentes frecuencias que las razas exóticas europeas (O'Neill *et al.*, 2010). Sin embargo, las condiciones climáticas cambiantes en el hábitat TM, con $T_{\text{máx}}$ y RH superiores a 30 °C y 84 %, hacen necesario cuantificar su efecto sobre las vacas para planificar sus programas de reproducción; donde el intervalo parto-concepción y el nivel de producción de leche también podrían afectar la fertilidad de las vacas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue cuantificar el efecto de la estación del año, la temperatura máxima y la humedad

relativa, el servicio de inseminación artificial y los factores relacionados con el número de parto sobre el éxito de la gestación de las vacas criollas Lechero Tropical.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de las estaciones del año

El estudio se realizó en Veracruz, México a 19° 11' N y 96° 20' O, a 23 m de altitud. Se consideraron tres estaciones climáticas del año, desarrolladas mediante análisis de conglomerados descrito por Rosales *et al.* (2021), con T_{máx} y RH como: cálida-seca (HD, marzo-mayo, 31.6 ± 1.0 °C y 77.2 ± 1.1 %), cálida-húmeda (HH, junio-octubre, 31.4 ± 0.4 °C y 84.7 ± 1.0 %) y fresca-seca (FD, noviembre-febrero, 26.8 ± 0.5 °C y 84.6 ± 0.3 %). La temperatura media anual y la precipitación fueron de 24.8 °C y 1 525.8 mm (INIFAP, 2018; SMN, 2018); el clima de la región es AW₀(w)(i')gw'' cálido subhúmedo con lluvias en verano (García, 1988).

Manejo de las vacas y fuente de datos

Las vacas se alimentaron con zacate pará (*Brachiaria mutica* Forssk) y pasto autóctono (*Paspalum* spp.). El ordeño fue manual, una vez al día por la mañana, con presencia del becerro. Las vacas en estro fueron detectadas diariamente durante todo el año, con el apoyo de un toro marcador. La inseminación artificial (AI) se realizó 12 h después de la detección del estro, con pajillas de sementales TM con 25 millones de espermatozoides (0.5 mL) y motilidad individual progresiva superior de 60 %. El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación transrectal 45-55 d después de la AI (Rosendo-Ponce y Becerril-Pérez, 2015).

Las bases de datos de las vacas TM, más complejas y amplias que las de las vaquillas TM, proceden del registro de datos por 14 años, de vacas de 82.12 ± 1.15 meses de edad. Se utilizó un total de 959 registros de AI de 155 vacas.

Variables de respuesta

Se registraron las frecuencias de estro con base en la detección de toros marcadores y se estimaron por estación en relación con el total del año (%). En cuanto al número de servicios de AI, se estudió el éxito de gestación de las vacas por estación, para el primer servicio al primer parto (GF, %; n = 121) y del primero al quinto servicio (GS, %; n = 167) y el éxito de gestación global de las vacas múltiparas del segundo al séptimo parto y todos los servicios (GG, %; n = 792).

Análisis estadístico

Se analizaron los efectos de la estación del año (SE), la T_{máx} y la RH sobre GF, GS y GG siete días antes del servicio de AI (PRAI), periodo en el que se produce la dominancia folicular preovulatoria (Wilson *et al.*, 1998); el día del servicio (DAI), cuando se produce un aumento de la temperatura uterina y una posible reducción de la capacidad fecundante del espermatozoide (Monterroso *et al.*, 1995); y siete días después del

servicio de AI (POAI), periodo en el que los embriones son sensibles al estrés calórico (Hansen, 2019).

Además, se estudiaron también los efectos de los días abiertos (DO) y la producción de leche acumulada para el día de servicio (MP), el número de servicios (NS) y el número de partos (CN). Para analizar el GF, se utilizó el siguiente modelo de regresión logística:

$$y_{ij} = \mu + ES_i + \beta_1 (x_{1ij} - \bar{x}_{1..}) + \beta_2 (x_{2ij} - \bar{x}_{2..}) + \beta_3 (x_{3ij} - \bar{x}_{3..}) + \beta_4 (x_{4ij} - \bar{x}_{4..}) + \epsilon_{ij}$$

donde y_{ij} es la variable de respuesta medida la i -ésima estación del año, de la j -ésima vaca, que puede tomar valores de 1 gestante o 0 no gestante; μ = Constante que caracteriza la población; ES_i = efecto fijo de la i -ésima estación del año. $i = 1$ cálida-seca, 2 cálida-húmeda y 3 fresca-seca; β_1 = coeficiente de regresión que relaciona las temperaturas máximas medias con la variable de respuesta; x_{1ij} = media de la temperatura máxima observada en la i -ésima estación del año que ocurrió durante la inseminación de la j -ésima vaca; $\bar{x}_{1..}$ = media de las temperaturas máximas medias; β_2 = coeficiente de regresión que relaciona la humedad relativa media con la variable de respuesta; x_{2ij} = media de la humedad relativa observada en la i -ésima estación del año ocurrida durante la inseminación de la j -ésima vaca; $\bar{x}_{2..}$ = media de la humedad relativa media; β_3 = coeficiente de regresión que relaciona los días abiertos con la variable de respuesta; x_{3ij} = días abiertos durante la i -ésima estación del año de la j -ésima vaca; $\bar{x}_{3..}$ = media de días abiertos; β_4 = coeficiente de regresión que relaciona la producción de leche acumulada con la variable de respuesta; x_{4ij} = producción de leche acumulada durante la i -ésima estación del año de la j -ésima vaca; $\bar{x}_{4..}$ = media de la producción de leche acumulada; ϵ_{ij} = error aleatorio. $\epsilon_{ij} \sim B(n, p)$.

Los datos se procesaron con PROC LOGISTIC; se obtuvieron razones de oportunidad e intervalos de confianza de 95 % para T_{\max} , RH, DO y MP. GS y GG se analizaron con modelos lineales generalizados utilizando PROC GLIMMIX, con una distribución binomial y una función de enlace logit; incluyendo NS y CN como factores independientes (SAS Institute Inc., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Éxito de gestación en el primer servicio de vacas de primer parto (GF)

La frecuencia del primer estro con AI por estación fue HD 19.8, HH 56.2, FD 24.0 %, favoreciendo a HH, donde ocurre el 88 % de la precipitación anual y con mayor disponibilidad de forraje fresco, aunque la T_{\max} y RH fueron altas.

En un estudio previo, las vaquillas TM tuvieron una frecuencia más homogénea por estación de 22.7, 39.2 y 38.1 %, respectivamente (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). En vacas servidas en HD, HH y FD, el GF fue de 58.3, 48.5, 44.8 % y 49.6 % de media general. En vaquillas fue de 35.0, 57.9, 58.2 %, y 53.0 % de media general (Rosales-Martínez *et*

al., 2021). Por lo tanto, las vacas de este estudio tuvieron un mejor desempeño en HD que las vaquillas de la investigación similar, pero disminuyendo en HH y FD.

Para las vacas, la mayor y menor frecuencia de éxito de gestación anual se dieron en HH con un 55.0 % y FD 21.7 % comparado con el 43.0 y 41.9 % de las vaquillas en una investigación previa. Las vaquillas respondieron favorablemente a las estaciones HH y FD y las vacas soportaron mejor el estrés térmico en HD con 23.3 %, un 8 % más que las vaquillas (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). Los toros TM mostraron una mejor motilidad de la masa y un mayor número de espermatozoides normales en HD (Villatoro *et al.*, 2016). Es preferible que las vacas queden gestantes en el primer servicio de AI, ya que se reducen los costos de mano de obra y pajillas de semen y se obtiene una nueva lactación y un ternero cada año (Kim y Jeong 2019).

T_{máx} afectó a la GF sólo en PRAI ($p \leq 0.05$; Cuadro 1). Para las vaquillas TM del estudio anterior, ES afectó a GF ($p \leq 0.05$) y se estimó un efecto similar de T_{máx} en GF ($p \leq 0.02$; Rosales-Martínez *et al.*, 2021). No se observaron efectos de ES, RH, DO y MP en GF para PRAI, DAI y POAI ($p > 0.05$).

Cuadro 1. Efecto de la estación del año, la temperatura máxima (T_{máx}), la humedad relativa (RH), los días abiertos (DO) y la producción de leche acumulada (MP), siete días antes de la inseminación artificial en el éxito de gestación en el primer servicio de vacas criollas Lechero Tropical de primer parto.

| Variable | OR | CI | <i>p</i> |
|------------------------|------|-------------|----------|
| Estación cálida-seca | 1.0 | | 0.7031 |
| Estación cálida-húmeda | 0.69 | 0.26 – 1.81 | |
| Estación fresca-seca | 0.64 | 0.20 – 1.96 | |
| T _{máx} | 0.87 | 0.76 – 0.99 | 0.0472 |
| RH | 1.03 | 0.96 – 1.11 | 0.4427 |
| DO | 0.99 | 0.99 – 1.01 | 0.7975 |
| MP | 1.00 | 0.98 – 1.00 | 0.8790 |

OR= Razón de oportunidad; CI = Intervalo de confianza (95%); valor de *p* = para el efecto de la estación y las covariables.

MP fue de 535.1 ± 20.7 kg con DO de 118.7 ± 6.3 d, lo que no influyó en la GF ($p > 0.05$). A medida que la T_{máx} aumentó en 1 °C en PRAI, la probabilidad de GF disminuyó, $\hat{\beta}_1 = -0.13 \pm 0.07$ ($p \leq 0.05$) en las tres estaciones (Figura 1).

La disipación de calor por convección, conducción y evaporación es menor en las vaquillas porque tienen una superficie corporal más pequeña que las vacas; al aumentar su tamaño, las vaquillas incrementan su capacidad de disipar el calor latente (Dahl *et al.*, 2020).

Este valor del coeficiente en vaquillas TM de investigaciones anteriores muestra que el efecto adverso de la T_{máx} fue mayor $\hat{\beta}_1 = -0.20 \pm 0.09$ ($p \leq 0.02$) (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). En vacas Holstein y Jersey, por cada aumento de 1 punto en el Índice de

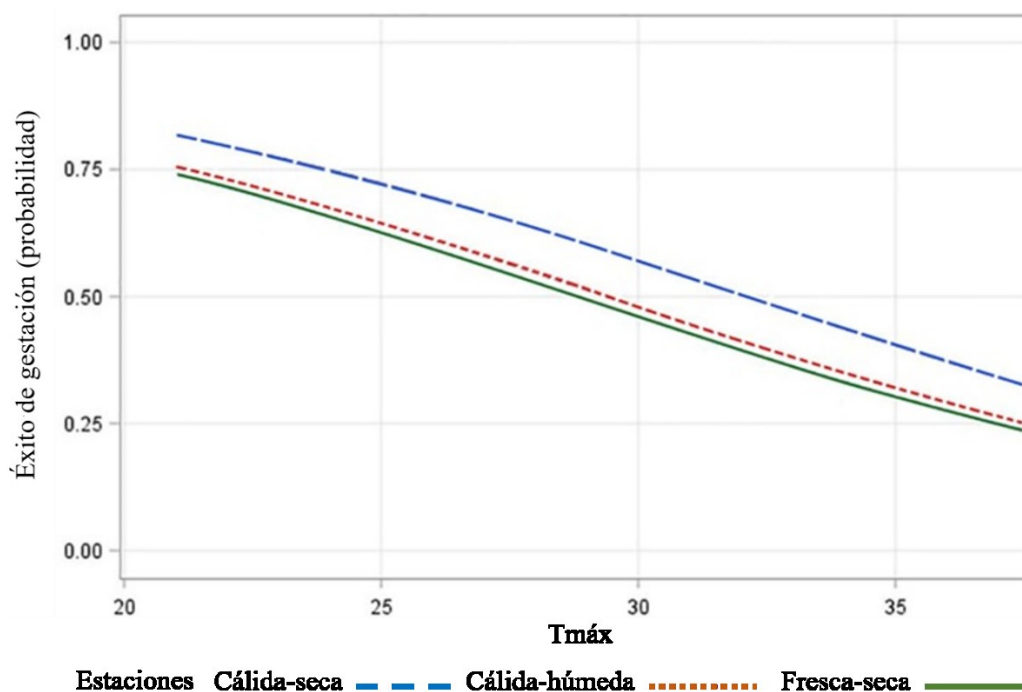


Figura 1. Relación entre las temperaturas máximas ($T_{máx}$, °C) de siete días antes de la inseminación artificial con la probabilidad de éxito de la gestación en el primer servicio en vacas criollas Lechero Tropical de primer parto.

Temperatura - Humedad (ITH), el tamaño folicular disminuyó 0.1 mm (Schüler *et al.*, 2017).

Las vacas Holstein expuestas a un ITH inferior a 31-35 tuvieron 1.08 más posibilidades de quedar gestantes, en comparación con las que tuvieron un ITH superior de 70 (García-Isperto *et al.*, 2007).

La disminución del GF en hembras bovinas está relacionada con el aumento de cortisol bajo estrés calórico (Idris *et al.*, 2021). Una $T_{máx}$ y una RH elevadas reducen los pulsos de GnRH que interrumpen la síntesis de hormonas esteroideas en el folículo (Schüler *et al.*, 2017). La exposición a largos periodos de alta temperatura y humedad relativa puede generar un estrés crónico que reduce las concentraciones de estradiol en los folículos (Abdelnour *et al.*, 2020) y con frecuencia inhibe la ovulación; además, se produce una mala comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito, y daños irreparables en el ADN (Paula-Lopes *et al.*, 2012).

Éxito de gestación en todos los servicios de vacas de primer parto (GS)

La frecuencia de estro por estación fue HD 19.8, HH 47.9 y FD 32.3 % similar al primer estro en vaquillas (Rosales-Martínez *et al.*, 2021). En HD, la temperatura superó los 30 °C, lo que afecta el desarrollo del folículo dominante, con bajas secreciones de estradiol que pueden generar dominancia folicular prolongada, afectar la manifestación del estro y disminuir la ovulación (Schüler *et al.*, 2017).

No se observaron efectos de ES, T_{máx}, RH, DO, MP ni NS en GS para PRAI, DAI ni POAI ($p > 0,05$). Las probabilidades medias estimadas por estación fueron HD 0.48 ± 0.11 , HH 0.67 ± 0.07 y FD 0.60 ± 0.08 ($p > 0.05$). En las vaquillas TM, las probabilidades estimadas inferiores de 0.50 en HD y superiores de 0.70 en HH fueron diferentes ($p \leq 0.05$; Rosales-Martínez *et al.*, 2021). Las vacas lecheras de climas templados muestran problemas de fertilidad cuando se introducen en regiones tropicales cálidas; sin embargo, los *Bos taurus* naturalizados durante siglos están adaptados a estas regiones (Lima *et al.*, 2020).

En este estudio, las vacas TM mostraron probabilidades similares de éxito de gestación en la primera preñez en las tres estaciones y en los tres periodos de AI en los cinco servicios de AI. Las razas criollas se han adaptado a los cambios estacionales de los diferentes climas de las regiones tropicales (De Alba, 2011).

Éxito global de gestación en vacas múltiparas (GG)

La frecuencia de estro de las vacas múltiparas por estación fue HD 25.4, HH 50.6 y FD 24.0 %, similar a la de las vacas de primer parto. No hubo efectos de ES, RH, MP, NS ni CN en GG para PRAI, DAI ni POAI; sin embargo, T_{máx} afectó a GG en PRAI ($\hat{\beta}_1 = -0.08 \pm 0.04$; $p \leq 0.05$).

En las vacas sometidas a estrés calórico, la teca y la viabilidad de las células de la granulosa de los folículos son afectadas (Khan *et al.*, 2020), se interrumpe la síntesis hormonal y se reduce la concentración de estradiol, lo que disminuye el desarrollo folicular con daños en el ovocito (Abdelnour *et al.*, 2020), por lo que se necesitan al menos tres ciclos estrales para restablecer su competencia.

Aunque no se observó efecto de la T_{máx} tres días antes de la AI en vacas lecheras, cuando el ITH aumentó de 70 a 80 puntos, la tasa de gestación disminuyó de 30.6 a 23 % (García-Ispuerto *et al.*, 2007). Las vacas Holstein expuestas a ITH superiores a 72 puntos en los días 42 a 1 antes de la AI tuvieron 31 % menos de probabilidades de quedar gestantes (Schüler *et al.*, 2014).

La MP fue de 634.2 ± 22.8 kg, casi 100 kg más que en las vacas de primer parto, lo que no afectó a la GS en ninguno de los tres modelos de AI ($p > 0.05$). Las cantidades moderadas de producción de leche con alto contenido en sólidos y el tamaño medio de las vacas múltiparas generan poco calor metabólico que pueda disiparse con temperaturas y RH elevadas.

Los animales sometidos a estrés durante varios años generan adaptaciones metabólicas y genéticas que contribuyen al rendimiento del proceso fisiológico en turno (Collier *et al.*, 2019). Las vacas de alta producción lechera por selección genética en regiones templadas requieren más servicios de AI por concepción (Walsh *et al.*, 2011).

Los DO en vacas múltiparas fueron de 120.7 ± 4.8 , similar a las del primer servicio en vacas de primer parto. Los DO afectaron a GG en PRAI, DAI y POAI ($\hat{\beta}_3 = -0.005 \pm 0.002$; $p \leq 0.01$). Cuando la tasa de gestación aumentó 1 %, se observó una disminución de cuatro en los días abiertos (VanRaden *et al.*, 2004), por lo que es conveniente que las vacas queden gestantes en el primer servicio de AI. Las probabilidades medias de GG por estación para PRAI, DAI y POAI fueron todas cercanas a 0.52 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Probabilidad global de éxito de gestación de las vacas múltiparas criollas Lechero Tropical en tres estaciones ($p > 0.05$).

| Período de efecto de T _{máx} y RH | Estación | | |
|--|-------------|---------------|-------------|
| | Cálida-seca | Cálida-húmeda | Fresca-seca |
| Siete días previos a AI | 0.50 ± 0.06 | 0.54 ± 0.05 | 0.52 ± 0.06 |
| Día de la AI | 0.50 ± 0.06 | 0.52 ± 0.05 | 0.55 ± 0.06 |
| Siete días posteriores a AI | 0.49 ± 0.06 | 0.54 ± 0.05 | 0.53 ± 0.06 |

T_{máx} = Temperatura máxima; RH = Humedad relativa; AI = Inseminación artificial.

Schüler *et al.* (2014) estimaron GG de 31.0 % en vacas Holstein en condiciones de T_{máx} de 29.8 °C y RH máxima de 96.1 %, y cuando el ITH aumentó de 72 a más de 78 puntos, la gestación disminuyó de 39.4 a 31.6 % (Lozano *et al.*, 2005). Aunque no se observaron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) de GG por periodo de servicio para NS y CN (Figura 2), se observaron probabilidades superiores a 0.50 en los tres primeros servicios y en los cuatro primeros partos.

Lozano *et al.* (2005), observaron 38.2 % de gestación en vacas Holstein de primer parto, y en vacas de tres partos o más la gestación disminuyó a 32.7 %. Los *Bos taurus* introducidos y mantenidos en ambientes desfavorables a través de los siglos presentan características adaptativas como pelo corto (Baena *et al.*, 2019), bajas concentraciones de triyodotironina y tiroxina que disminuyen la producción de la hormona liberadora de tirotropina, como mecanismo metabólico de reducción del calor, y aumentos en la disipación del calor a través de las glándulas sudoríparas y la frecuencia respiratoria

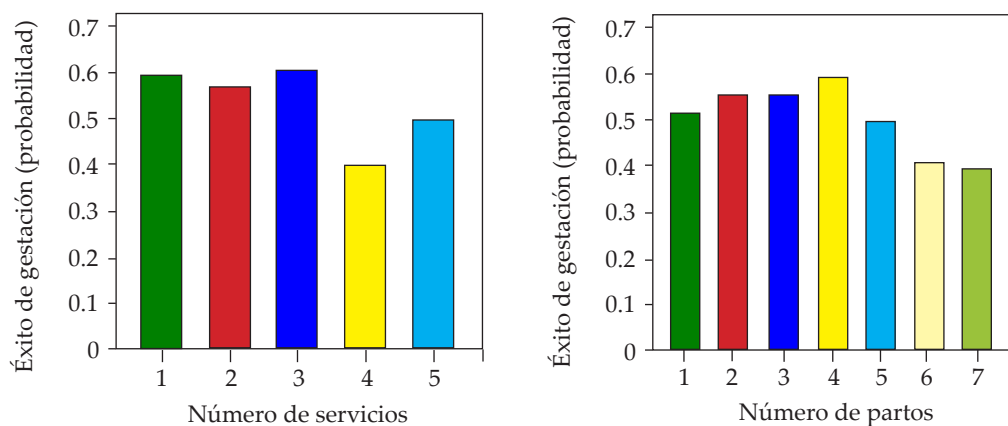


Figura 2. Probabilidad global de éxito de gestación en vacas criollas múltiparas Lechero Tropical por número de servicios y número de partos ($p > 0.05$).

(Sejian *et al.*, 2018). Los embriones de hembras criollas Romosinuano fueron más tolerantes al estrés calórico que los de otras razas no adaptadas (Hernández-Cerón *et al.*, 2004). Las vacas TM son longevas; algunas incluso pueden alcanzar hasta 20 años (De Alba, 2011), lo que muestra su capacidad de adaptación a un clima cálido tropical, convirtiéndolo en un genotipo útil para afrontar los retos de la producción animal en escenarios adversos y cambiantes.

CONCLUSIONES

Las vacas Lechero Tropical de este estudio, mostraron la mayor frecuencia de estros en la estación cálida-húmeda y ningún efecto de estación en el éxito de la gestación, lo que evidencia su adaptación y capacidad para reproducirse incluso en condiciones climáticas cambiantes y adversas. Sin embargo, la temperatura máxima de los siete días anteriores a la inseminación artificial afectó el éxito de la gestación en el primer servicio de vacas de primer parto y el éxito global de la gestación de las vacas multíparas. Antes de la inseminación artificial, los efectos perjudiciales de la temperatura máxima fueron menores en las vacas multíparas que en las vacas de primer servicio al primer parto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, por la beca otorgada al primer autor.

REFERENCIAS

- Abdelnour AS, Swelum AA, Abd El-Hack EM, Khafaga FA, Taha EA, Abdo M. 2020. Cellular and functional adaptation to thermal stress in ovarian granulosa cells in mammals. *Journal of Thermal Biology* 92: 12688. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102688>
- Baena MM, Costa AC, Viera GC, Rocha RFB, Ribeiro ARB, Ibelli AMG, Meirelles SLC. 2019. Heat tolerance responses in a *Bos taurus* cattle raised in a Brazilian climate. *Journal of Thermal Biology* 81: 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.02.017>
- Byrne MP, Pendergrass AG, Rapp AD, Wodzicki KR. 2018. Response of the intertropical convergence zone to climate change: location, width, and strength. *Current Climate Change Reports* 4: 355–370. <https://doi.org/10.1007/s40641-018-0110-5>
- Collier RJ, Baumgard LH, Zimbelman RB, Xiao Y. 2019. Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. *Animal Frontiers* 9 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1093/af/vfy031>
- Dahl GE, Tao S, Laporta J. 2020. Heat stress impact immune status in cows across the life cycle. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 116. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00116>
- De Alba J. 2011. El libro de los bovinos criollos de América. Colegio de Postgraduados. México.
- Fuentes-Franco R, Coppola E, Giorgi F, Pavia GE, Tefera DG, Graef F. 2014. Inter-annual variability of precipitation over Southern Mexico and Central America and its relationship to sea surface temperature from a set of future projections from CMIP5 GCMs and RegCM4 CORDEX simulations. *Climate Dynamics* 45: 425–440. <https://doi.org/10.1007/s00382-014-2258-6>
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-Ispierto I, López-Gatius F, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, De Rensis F, López-Béjar M. 2007. Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. *Theriogenology* 67: 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.009>

- Hansen PJ. 2019. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. *Animal Reproduction* 16: 497–507. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0053>
- Hernández-Castellanos LE, Nally JE, Lindahl J, Wanapat M, Alhidary IA, Fangueiro D, Grace D, Ratto M, Bambou JC, Almeida AM. 2019. Dairy science and health in the tropics: challenges and opportunities for the next decades. *Tropical Animal Health and Production* 51: 1009–1017. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01866-6>
- Hernández-Cerón J, Chase Jr CC, Hansen PJ. 2004. Differences in heat tolerance between pre-implantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *Journal of Dairy Science* 87: 53–58. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73141-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73141-0)
- Idris M, Uddin J, Sullivan M, McNeill DM, Phillips JC. 2021. Non-invasive physiological indicators of heat stress in cattle. *Animals* 11 (1): 71. <https://doi.org/10.3390/ani11010071>
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2018. Laboratorio Nacional de Modelaje y Sensores Remotos. Datos históricos climatológicos, 2000–2013, del estado de Veracruz, México. <http://clima.inifap.gob.mx/lnmysr>
- Khan A, Dou J, Wang Y, Jiang X, Khan MZ, Luo H, Usman T, Zhu H. 2020. Evaluation of heat stress effects on cellular and transcriptional adaptation of bovine granulosa cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 11: 25. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0408-8>
- Kim IH, Jeong JK. 2019. Risk factors limiting first service conception rate in dairy cows and their economic impact. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 32: 519–526. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0296>
- Lima SBGPNP, Stafuzza NB, Pires BV, Bonilha SFM, Cyrillo JNSG, Negrao JA, Paz CCP. 2020. Effect of high temperature on physiological parameters of Nelore (*Bos taurus indicus*) and Caracu (*Bos taurus taurus*) cattle breeds. *Tropical Animal Health and Production* 52 (5): 2233–2241. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02249-y>
- López-Gatius F, García-Ispierto I, Hunter RHF. 2021. Cervix-rectum temperature differential at the time of insemination is correlated with the potential for pregnancy in dairy cows. *Journal of Reproduction and Development* 67 (4): 251–255. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-022>
- Lozano DRR, Vásquez PCG, González PE. 2005. Efecto del estrés calórico y su interacción con otras variables de manejo y productivas sobre la tasa de gestación de vacas lecheras en Aguascalientes, México. *Veterinaria México* 36 (3): 245–260. <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2005/vm053a.pdf>
- Monterroso VH, Drury KC, Ealy AD, Edwards JL, Hansen PJ. 1995. Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. *Theriogenology* 44: 947–961. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00282-D](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00282-D)
- O'Neill JC, Swain LD, Kadarmideen NH. 2010. Evolutionary process of *Bos taurus* cattle in favorable versus unfavorable environments and its implications for genetic selection. *Evolutionary Applications* 3: 422–433. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00151.x>
- Paula-Lopes FF, Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOA, Visintin JA. 2012. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Animal Reproduction* 9 (3): 395–403.
- Rosales-Martínez F, Rosendo-Ponce A, Cortez-Romero C, Gallegos-Sánchez J, Cuca-García JM, Becerril-Pérez CM. 2021. Relation of the maximum temperature and relative humidity close to the insemination with the Tropical Milking criollo heifer's gestation in three seasons. *Tropical Animal Health and Production* 53 (1): 27. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02430-3>
- Rosendo-Ponce A, Becerril-Pérez CM. 2015. Avance en el conocimiento del bovino criollo Lechero Tropical de México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2: 233–243.
- Rust JM. 2019. The impact of climate change on extensive and intensive livestock production systems. *Animal Frontiers* 9 (1): 20–25. <https://doi.org/10.1093/af/vfy028>
- SAS Institute Inc. 2010. User's Guide: Statistic, Version 9.4 for Windows. Cary, NC, USA.
- Schüler LK, Burfeind O, Heuwieser W. 2014. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature-humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology* 81: 1050–1057. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.029>

- Schüler LK, Michaelis I, Heuwieser W. 2017. Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows. *Theriogenology* 102: 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.004>
- Sejian V, Bhatta R, Gaughan JB, Dunshea FR, Lacetera N. 2018. Review: Adaptation of animals to heat stress. *Animal* 12 (S2): s431–s444. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001945>
- SMN (Servicio Meteorológico Nacional). 2018. Consulta de base de datos 2000-2013. Sistema de información climatológica y geográfica del estado de Veracruz, México. <https://smn.conagua.gob.mx/es/>
- VanRaden PM, Sanders AH, Tooker ME, Miller RH, Norman HD, Kuhn MT, Wiggans GR. 2004. Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science* 87 (7): 2285–2292. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70049-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70049-1)
- Villatoro SRJ, Rosendo PA, Canseco SR, Cortez RC, Torres HG, Rosales MF, Becerril PCM. 2016. Seminal characteristics of Tropical Milking bulls in two seasons in Veracruz, Mexico. *Zootecnia Tropical* 34: 301–308.
- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science* 123: 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.001>
- Wilson SJ, Kirby CJ, Koenigsfeld AT, Keisler DH, Lucy C. 1998. Effect of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *Journal of Dairy Science* 81: 2132–2138. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(98\)75789-3](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(98)75789-3)

Agrociencia



SOIL SALINITY SHIFTS CULTIVABLE MICROBIAL COMMUNITIES OF WHEAT (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) RHIZOSPHERE IN THE YAQUI VALLEY, MEXICO

Arlett Leticia Ibarra-Villarreal¹, Jonathan Rojas-Padilla¹, Luis Abraham Chaparro-Encinas², Alondra María Díaz-Rodríguez¹, Valeria Valenzuela-Ruiz¹, Angélica Herrera-Sepúlveda³, Fannie Isela Parra-Cota⁴, Sergio de los Santos-Villalobos^{1*}

¹ Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro, Ciudad Obregón, Sonora, Mexico. C. P. 85000.

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez, Valle Verde, Torreón, Coahuila, Mexico. C. P. 27054.

³ Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui. Av. Tecnológico, Block 611, Bacum, Sonora, Mexico. C. P. 85276.

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Norman E. Borlaug. Calle Norman E. Borlaug km 12, Ciudad Obregón, Sonora, Mexico. C. P. 85000.

* Author for correspondence: sergio.delossantos@itson.edu.mx

ABSTRACT

Saline soils are a common issue in commercial fields using intensive and irrigated agricultural practices under arid or semi-arid climates, such as the Yaqui Valley in Mexico, one of the most important wheat-producing regions worldwide. This study aimed to assess the cultivable microbial diversity (having plant growth-promoting attributes) associated with wheat rhizosphere in commercial fields, under a saline soil gradient in the Yaqui Valley. Thus, seven wheat commercial zones were studied according to their electrical conductivity (0.9 to 6.4 dS cm⁻¹). The isolation of microorganisms was carried out by dependent culture techniques, sequencing of the 16S (bacteria) and 5.8S (fungi) rRNA genes, and plant growth-promoting attributes were evaluated: phosphate solubilization (Pikovskaya medium), siderophore production (Chrome Azurol S medium), indole production (Salkowsky reagent), and hemolytic activity (Petri dishes 5 % Sheep Blood). Wheat commercial zones with 1.6 dS m⁻¹ showed the highest fungal (2.59 × 10⁶ CFU g⁻¹ dry soil) and bacterial (2.88 × 10⁷ CFU g⁻¹ dry soil) populations, being *Rhizopus* and *Bacillus* the most abundant and well-distributed microbial genera, respectively. The impact of saline soils on the microbial metabolic background was not species- or genus-specific; it was at a strain-specific level. In addition, 52 % of fungal and 83 % of bacterial strains showed the ability to produce γ-hemolysis, suggesting it is not harmful to humans and animals. This work provides a microbial culture collection where their members have shown several beneficial traits that potentially increase the yield and quality of wheat growing under saline soil conditions.

Keywords plant growth-promoting microorganisms, *Bacillus*, *Rhizopus*, electrical conductivity, taxonomic affiliation.

Citation: Ibarra-Villarreal AL, Rojas-Padilla J, Chaparro-Encinas LA, Díaz-Rodríguez AM, Valenzuela-Ruiz V, Herrera-Sepúlveda A, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2023. Soil salinity shifts cultivable microbial communities of wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, México. *Agrociencia* 57(5): 882-919. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2882

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: October 03, 2022.

Approved: May 12, 2023.

Published in *Agrociencia*:

July 17, 2023.

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



INTRODUCTION

The Yaqui Valley is located in the south of the Sonora State in Mexico and is the main wheat producer state in this country (Matson and Jewett, 2012). This valley contributes 47 % of the national wheat production (1.7×10^6 Mg year⁻¹), which is produced in 173 000 ha (SIAP, 2018). However, this crop is highly sensitive to environmental conditions, such as extreme temperature, water reduction, and saline soils (Porter and Semenov, 2005).

Salinity in agricultural soils is recognized as a major constraint for food production. It has been estimated that 20 % of cultivated fields around the world are affected by this abiotic condition (Flowers, 2004). Saline soils are a common issue in commercial fields using intensive and irrigated agricultural practices under arid or semi-arid climates, *i.e.* the Yaqui Valley (approximately 12 % of its agricultural soils are classified as saline (> 4 dS m⁻¹)) (Cortés-Jimenez *et al.*, 2009; Pulido-Madrigal *et al.*, 2010). Thus, it has been reported that wheat yield is reduced by ~ 65 % under moderately saline soils (Shafi *et al.*, 2010), at a rate of 7 % per 1 dS m⁻¹ in increment (Wang *et al.*, 2015). Soil salinity affects almost all aspects of plant development including germination, vegetative growth, and yield (Foolad, 2004), due to hyperosmotic stress that causes a build-up of salt in roots, which decreases their ability to uptake water and generates oxidative stress (Annunziata *et al.*, 2017).

Salinity also regulates the abundance, diversity, and function of soil microbial communities, due to a negative osmotic potential in microbial cells that generates plasmolysis and loss of cellular activity (Wang *et al.*, 2017), as well as specific ion toxicity (Ibekwe *et al.*, 2017). This microbial unbalance in agroecosystems leads to high economic and environmental costs due to a reduction in crop yield, fertilizer volatilization, generation of greenhouse gases, and contamination of groundwater (Cortés-Jimenez *et al.*, 2009). Therefore, microbiota represent a sustainable alternative contributing to food security since these microorganisms carry out several vital ecosystemic services, such as i) social and ecological sustainability, ii) adaptation and mitigation of climate change, iii) biotechnological resources for humanity, iv) biogeochemical cycles, and v) increase in agricultural production (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018b).

Microbial communities can interact with crops (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2019), regulating their growth and productivity through different mechanisms such as phytohormone production, fixation of atmospheric nitrogen, siderophore production, mineral nutrients solubilization, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity, excretion of antibiotics, toxins, lytic enzymes, and induced systemic resistance (Orhan, 2016; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019; Robles-Montoya *et al.*, 2019; Villa-Rodríguez *et al.*, 2019; Rojas-Padilla *et al.*, 2020), which are named Plant Growth-Promoting Microorganisms (PGPM) (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019). Under salinity conditions, the protective effect of PGPM consists of reducing the production of ethylene, increasing the concentrations of phytohormones such as abscisic acid, auxins, gibberellins, and cytokinins, giving protection against reactive oxygen species (ROS), producing compatible solutes, solubilize phosphates, produce

exopolysaccharides and control phytopathogens (Numan *et al.*, 2018; Egamberdieva *et al.*, 2019).

Currently, PGPM has been used to mitigate the effect of soil salinity on crops (Qin *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016). For example, Upadhyay and Singh (2014) showed that the salinity-tolerant bacteria (*Bacillus pumilus*, *Bacillus aquimaris*, *Bacillus arsinicus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas mendocina*, and *Arthrobacter* sp.) inoculation to wheat fields increased bulk density (1.32 to 1.55 g cm⁻³), organic carbon (1.3 to 3.8 %), particulate density (1.42 to 1.6 g cm⁻³) and water-holding capacity (8.2 to 12 %), while sodium content (33 to 10 ppm), electrical conductivity (4.8 to 1.6 dS m⁻¹) and pH (8.1 to 6.8) decreased. Furthermore, the inoculation of plant growth-promoting bacteria (*Bacillus*, *Halobacillus*, *Thalassobacillus*, *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Staphylococcus*, and *Zhihengliuella*) to wheat under salt stress (200 mM NaCl) significantly increased (compared to the un-inoculated treatment) plant height and root length, as well as the total weight of plants as compared to the un-inoculated plants (Orhan, 2016). This work aimed to assess the cultivable microbial (bacteria and fungi) diversity having plant growth-promoting attributes associated with wheat rhizosphere in commercial fields, under a saline soil gradient in the Yaqui Valley, Mexico. This study provides the first insight, from the beginning of the Yaqui Valley (since the 1930s), into the salt-tolerant plant growth-promoting microorganisms associated with wheat and their potential role as a saline stress-mitigating agent in this crop.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and nutritional analysis

Seven wheat commercial zones in the Yaqui Valley, Mexico (26° 45' - 27° 33' N latitude and 109° 30' - 110° 37' W longitude) were analyzed in this study. For 10 years, all studied agricultural zones received a similar amount and source of synthetic fertilizers according to wheat nutritional requirements (N, 263 kg ha⁻¹; P, 120 kg ha⁻¹; and K, 60 kg ha⁻¹). Additionally, all studied zones had the same conventional tillage (subsoiling, fallow, leveling), irrigation (4 times, 13 cm irrigation per time), and planting density (180 kg ha⁻¹) (Cortés-Jimenez *et al.*, 2009). The soil samples were collected (30 cm depth) according to SAGARPA (2011) and SENASICA (2015), using a "zig-zag" sampling method, obtaining three composite (21 individual samples) soil samples for each wheat commercial zones. Samples collected for physical and chemical analyses were transferred to paper bags to dry (60 °C), and then analyzed according to NOM-021-SEMARNAT-2000; while those collected for microbiological analysis were placed into moist chambers and transported in a cooler at 4 °C (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

Microbial isolation

The isolation of microorganisms was carried out by dependent culture techniques, where 10.0 g of each soil sample was placed in a 250 mL Erlenmeyer flask containing

90 mL of sterile (121 °C and 15 psi for 15 min) distilled water and homogenized in a rotatory shaker for 1 h at 150 rpm. Serial dilutions (1:10) were prepared until 10⁻⁴ for bacteria and 10⁻³ for fungi isolation. Then, 100 µL of each serial dilution was poured on Petri dishes containing Nutrient Agar (NA) supplemented with 80 ppm of terbinafine for bacteria isolation, Potato Dextrose Agar (PDA) supplemented with 80 ppm of nalidixic acid for fungi isolation, and incubated for 3 days at 28 °C. Colony Forming Units (CFU) were used to estimate the microbial population in each wheat commercial zones (Córdova-Bautista *et al.*, 2009; Villa-Rodríguez *et al.*, 2016).

All bacterial isolates were preserved in Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA) (www.itson.mx/COLMENA) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018b; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2021).

Taxonomic affiliation of isolated microorganisms

Genomic DNA from each obtained isolate was extracted according to Valenzuela-Aragon *et al.* (2019). The 16S rRNA gene was used to affiliate bacterial strains (primers FD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and RD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), and the 5.8S rRNA gene for fungal strains (primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). Ribosomal genes amplification was carried out by using a 50 µL Polymerase Chain Reaction (PCR) mixture, containing 100 ng genomic DNA as a template, 0.2 µmol of forward and reverse primers, and 4 U MyTaq DNA polymerase. The PCR condition consisted of a denaturation step at 94 °C (3 min), 35 cycles of denaturation at 94°C (30 s), followed by annealing at 55 °C (30 s), and extension at 72 °C (1 min), and a final extension step at 72 °C (10 min). The amplicons were verified by electrophoresis on agarose (2 %) gel and sequenced by the Sanger platform. The obtained sequences were edited by using FINCH TV software (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>), and analyzed by the NCBI BLASTn tool (Altschul *et al.*, 1990), considering the lowest Expect value (E value), and the highest identity percentage (Max ident). The DNA sequences were deposited in the GenBank database and accession numbers were assigned (Table 1).

Table 1. Taxonomic assignment of the 78 microorganisms isolated from the seven ha-wheat commercial zones in the Yaqui Valley, Mexico.

| Strain | NCBI accession number | Genus | Species | Reference strain accession number | Query cover (%) | Identity (% sequence length) |
|--------|-----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------------------|
| TRQ15A | OM047158 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | FJ377887.1 | 94 % | 97.35 % |
| TRQ15 | MK493677 | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | MN626631.1 | 97 % | 99.42 % |
| TRQ16 | OM047159 | <i>Cupriavidus</i> | <i>alkaliphilus</i> | MT935666.1 | 99 % | 99.60 % |
| TRQ17 | OM047160 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>indicatrix</i> | MW303508.1 | 100 % | 98.97 % |
| TRQ18 | MK493678 | <i>Sphingomonas</i> | sp. | MZ960296.1 | 100 % | 99.77 % |
| TRQ19 | MK493679 | <i>Brevundimonas</i> | <i>vesicularis</i> | MK248082.1 | 100 % | 99.88 % |

Table 1. Continue

| Strain | NCBI accession number | Genus | Species | Reference strain accession number | Query cover (%) | Identity (% sequence length) |
|--------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------------------|
| TRQ20A | OM047161 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | CP050951.1 | 91 % | 99.39 % |
| TRQ21 | OM047162 | <i>Streptomyces</i> | <i>galilaeus</i> | CP023703.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ22 | OM047163 | <i>Streptomyces</i> | <i>galilaeus</i> | CP023703.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ61 | MK493703 | <i>Cupriavidus</i> | <i>alkaliphilus</i> | MT935666.1 | 100 % | 96.37 % |
| TRQ62A | OM047164 | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | MT525296.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ63 | OM047165 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | CP050183.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ64 | MK493705 | <i>Cupriavidus</i> | <i>taiwanensis</i> | LT991977.1 | 100 % | 98.69 % |
| TRQ65 | MN587961 | <i>Bacillus</i> | <i>paralicheniformis</i> | MN396257.1 | 100 % | 90.91 % |
| TRQ66A | ON103400 | <i>Bacillus</i> | <i>paramycoides</i> | MT875316.1 | 100 % | 99.77 % |
| TRQ67A | OM047166 | <i>Pseudomonas</i> | sp. | DQ977702.1 | 100 % | 97.35 % |
| TRQ24 | MK493680 | <i>Microbacterium</i> | <i>arborescens</i> | JN644505.1 | 99 % | 99.20 % |
| TRQ25 | MK493681 | <i>Acinetobacter</i> | <i>lactucae</i> | CP053391.1 | 99 % | 99.61 % |
| TRM13 | MK493715 | <i>Delftia</i> | sp. | MT101746.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ27A | OM047167 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | KP241046.1 | 100 % | 99.88 % |
| TRQ28A | MN133867 | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | MH168997.1 | 100 % | 99.76 % |
| TRQ29 | MK493682 | <i>Delftia</i> | <i>tsuruhatensis</i> | MT271888.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ30A | OM047168 | <i>Curtobacterium</i> | <i>pusillum</i> | MT487611.1 | 100 % | 98.18 % |
| TRQ69 | ON011078 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | CP020754.1 | 100 % | 88.20 % |
| TRQ70 | MK493708 | <i>Paenibacillus</i> | <i>lautus</i> | LC588571.1 | 99 % | 96.71 % |
| TRQ71 | MK493709 | <i>Microbacterium</i> | <i>oxydans</i> | JQ660100.1 | 100 % | 99.01 % |
| TRQ72 | OM047169 | <i>Stenotrophomonas</i> | sp. | MG818736.1 | 100 % | 99.91 % |
| TRQ73 | MK493710 | <i>Bordetella</i> | <i>hinzii</i> | LC521276.1 | 84 % | 98.22 % |
| TRQ74 | MK493711 | <i>Staphylococcus</i> | <i>sciuri</i> | MK015796.1 | 100 % | 94.12 % |
| TRQ32 | MK493683 | <i>Bacillus</i> | <i>sonorensis</i> | JX237852.1 | 99 % | 99.89 % |
| TRQ33 | OM967032 | <i>Cupriavidus</i> | <i>taiwanensis</i> | LT984801.1 | 96 % | 98.63 % |
| TRQ34 | MK493685 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | MT271890.1 | 97 % | 95.88 % |
| TRQ35A | OM047170 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | MT271890.1 | 100 % | 99.69 % |
| TRQ36 | MK493686 | <i>Bacillus</i> | <i>licheniformis</i> | KR909301.1 | 99 % | 99.26 % |
| TRQ37A | OM047171 | <i>Cupriavidus</i> | <i>neocaledonicus</i> | LT984806.1 | 87 % | 94.10 % |
| TRQ38 | MK493687 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | LC106036.1 | 99 % | 97.93 % |
| TRQ39 | MK493688 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | MK841317.1 | 99 % | 99.49 % |
| TRQ76A | OM047172 | <i>Acinetobacter</i> | <i>calcoaceticus</i> | MT197389.1 | 99 % | 99.50 % |
| TRQ40 | OM047173 | <i>Microbacterium</i> | <i>paraoxydans</i> | MT279337.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ41 | OM047174 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | MK855127.1 | 100 % | 99.89 % |
| TRQ42 | OM047175 | <i>Lysinibacillus</i> | sp. | MH683160.1 | 100 % | 99.49 % |
| TRQ43 | MK493689 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | MK855127.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ44 | MK493690 | <i>Rhizobium</i> | <i>pusense</i> | CP053857.1 | 100 % | 99.89 % |
| TRQ46 | MK493691 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | KJ499779.1 | 98 % | 94.91 % |
| TRQ47 | MK493692 | <i>Bacillus</i> | <i>subtilis</i> | JX126864.1 | 99 % | 95.12 % |
| TRQ77 | MK493713 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | MN209840.1 | 100 % | 88.94 % |
| TRQ78 | OM047176 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | MK855127.1 | 100 % | 99.78 % |
| TRQ48 | MK493693 | <i>Bacillus</i> | <i>subtilis</i> | JN555584.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ49 | MK493754 | <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> | HQ684014.1 | 99 % | 99.87 % |
| TRQ51 | MK493694 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | CP045551.1 | 100 % | 99.56 % |
| TRQ52 | MK493695 | <i>Pseudomonas</i> | <i>frederiksbergensis</i> | MN865449.1 | 100 % | 99.89 % |
| TRQ90 | OM047177 | <i>Pseudomonas</i> | <i>chlororaphis</i> | KP784660.1 | 99 % | 99.72 % |
| TRQ55A | MK493697 | <i>Achromobacter</i> | sp. | LC133693.2 | 100 % | 99.86 % |

Table 1. Continue

| Strain | NCBI accession number | Genus | Species | Reference strain accession number | Query cover (%) | Identity (% sequence length) |
|--------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------------------|
| TRQ56 | MK493698 | <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> | JQ659737.1 | 99 % | 98.73 % |
| TRQ57A | MK493699 | <i>Pseudomonas</i> | <i>extremorientalis</i> | MT348509.1 | 99 % | 99.77 % |
| TRQ58 | MK493700 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | MT124564.1 | 100 % | 97.25 % |
| TRQ59A | MN133852 | <i>Bacillus</i> | <i>amyloliquefaciens</i> | CP054479.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ60 | MK493702 | <i>Pseudomonas</i> | <i>chlororaphis</i> | MT540543.1 | 99 % | 98.23 % |
| TRQ79 | OM964575 | <i>Taifanglania</i> | sp. | KT163397.1 | 98 % | 99.62 % |
| TRQ81 | OM964576 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MT603963.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ82 | OM964577 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MW147622.1 | 78 % | 98 % |
| TRQ83 | OM964578 | <i>Aspergillus</i> | <i>nidulans</i> | MH237626.1 | 99 % | 99.07 % |
| TRQ84 | OM964579 | <i>Penicillium</i> | <i>citrinum</i> | MK281570.1 | 99 % | 99.22 % |
| TRQ85 | OM964580 | <i>Trichoderma</i> | sp. | MK871126.1 | 100 % | 99.62 % |
| TRQ86 | OM964581 | <i>Mortierella</i> | <i>alpina</i> | FJ025187.1 | 98 % | 98.90 % |
| TRQ87 | OM964582 | <i>Penicillium</i> | <i>rubidurum</i> | HQ608058.1 | 98 % | 98.90 % |
| TRQ88 | OM964583 | <i>Albifimbria</i> | <i>verrucaria</i> | MH001947.1 | 99 % | 100 % |
| TRQ89 | OM964584 | <i>Aspergillus</i> | <i>tubingensis</i> | MF135503.1 | 99 % | 99.82 % |
| TRQ90 | OM964585 | <i>Penicillium</i> | <i>rubidurum</i> | HQ608058.1 | 98 % | 99.08 % |
| TRQ91 | OM964586 | <i>Fusarium</i> | <i>chlamydosporum</i> | MK212931.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ92 | OM964587 | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> | MK742795.1 | 97 % | 99.64 % |
| TRQ93 | OM964588 | <i>Trichoderma</i> | sp. | MK871126.1 | 100 % | 99.62 % |
| TRQ94 | OM964589 | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> | MH345952.1 | 98 % | 98.82 % |
| TRQ95 | OM964590 | <i>Clonostachys</i> | <i>rosea</i> | MG748667.1 | 100 % | 98.81 % |
| TRQ96 | OM964591 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MT603963.1 | 100 % | 99.83 % |
| TRQ97 | OM964592 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MT603964.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ98 | OM964593 | <i>Mortierella</i> | <i>alpina</i> | MT453274.1 | 100 % | 99.68 % |
| TRQ99 | OM964594 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MT603963.1 | 100 % | 100 % |

Plant growth-promoting traits in isolated microbial strains

Phosphate solubilization

This trait was assayed on Pikovskaya medium supplemented with bromophenol blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$), and tricalcium phosphate as an insoluble phosphate source (Pikovskaya, 1948). The composition of the Pikovskaya medium was: 10 g L⁻¹ glucose; 5 g L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂; 0.5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0.2 g L⁻¹ NaCl; 0.1 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 0.2 g L⁻¹ KCl; 0.5 g L⁻¹ yeast extract; 0.002 g L⁻¹ MnSO₄·H₂O; 0.002 g L⁻¹ FeSO₄·7H₂O; and 15 g L⁻¹ Agar. The presence of a white/transparent halo around the inoculated (1x10³ CFU or spores) microbial strain was observed after 7 days of incubation at 28 °C.

Siderophore production

The ability of the studied microorganisms to produce siderophores was quantified as described by de los Santos-Villalobos *et al.* (2012), using the CAS (Chrome Azurol S) medium. This medium was prepared by carefully combining four solutions, having

the following composition. Solution 1: 10 mL 1 mM FeCl₃ (dissolved in 1 mM HCl) and 50 mL CAS (1.21 mg mL⁻¹) were added to 40 mL of CTAB (1.82 mg mL⁻¹). Solution 2: 30.24 g PIPES was dissolved in 750 mL salt solution (0.3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, and 1 g NH₄Cl), the pH was adjusted to 6.8 with KOH at 50 %, and the volume was adjusted to 800 mL, and then 15 g agar was added. Solution 3: 2 g glucose, 2 g mannitol, 493 mg MgSO₄, 11 mg CaCl₂, 1.17 mg MnSO₄, 1.4 mg H₃BO₃, 0.04 mg CuSO₄, 1.2 mg ZnSO₄, and 1 mg Na₂MoO₄ were dissolved in 70 mL of water. Solution 4: filtered 30 mL of 10 % casamino acids. The presence of a colored halo around the inoculated (1×10³ CFU or spores) microbial strain was observed after 10 days of incubation at 28° C.

The siderophore production and phosphate solubilization by the studied microbial strains was quantified using the index (Rojas-Padilla *et al.*, 2020):

$$SI \text{ or } PI = H_1 / H_2$$

SI = solubilization index

PI = production index

H₁ = diameter of halo including the microbial colony (mm)

H₂ = diameter of the microbial colony (mm)

Indole production

Each microbial strain was inoculated at a concentration of 1×10³ CFU or spores of in a 250 mL Erlenmeyer flasks containing 90 mL of sterile Nutritive Broth (NB) supplemented with tryptophan (100 mg L⁻¹) at 28 °C for 5 days and 120 rpm. After the incubation period, the microbial culture was centrifuged at 8000 rpm for 10 min, the supernatant was mixed in a 1:2 volume ratio with Salkowsky reagent and incubated for 30 min in the dark at room temperature (Glickmann and Dessaux, 1995). The quantification of indoles produced by microbial strains was analyzed at 540 nm.

Hemolytic blood assay

This assay was carried out using a volume of 10 µL of each microbial strain at 1×10⁶ CFU or spores mL⁻¹, which were inoculated onto Petri dishes containing Columbia Agar supplemented with 5 % Sheep Blood. After 3 days of incubation at 28 °C, hemolytic activity was categorized as reported by Villa-Rodríguez *et al.* (2019). Partial or α-hemolysis was represented by a color change to dark green, while β-hemolysis was observed by a clear zone around the microbial colony (indicating erythrocyte breakage), and non-alteration over the medium (γ-hemolysis) indicated no damage to erythrocytes.

Statistical analysis

Data (n = 5) were analyzed by one-way analyses of variance (ANOVA) test, and the Tukey-Kramer test (*p* ≤ 0.05), using the Statgraphics Plus software v5.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Texture, soil organic matter, and pH values showed no significant differences among studied wheat commercial zones. The texture observed for soils collected in all studied zones was clay, which has been previously reported in 45 % of soils in the Yaqui Valley (Cortés-Jimenez *et al.*, 2009; Verhulst *et al.*, 2011). The soil organic matter content ranged from 1.4 % to 1.5 % (with no significant differences), which suggests a medium biological activity in this soil (Bhat *et al.*, 2017). The pH value in the study zones was slightly alkaline, ranging from 7.8 to 8.1 (with no significant differences), which has been previously reported for agricultural soil located in arid or semi-arid zones (such as the Yaqui Valley), where the low humidity and the limited washing of salts and carbonates increase the soil pH value (Corrales-Maldonado *et al.*, 2014). In addition, the chemical analysis of soils collected in all studied zones showed the following mean (with no significant differences) values (ppm): N: 11.5, P: 12.5, Mg: 1067.5, K: 3433, Na: 540, Fe: 10.3, Mn: 12.2, Zn: 4, Cu: 0.4 and B: 0.5, which are standard nutrients concentrations for soils having intensive agricultural practices. Finally, the soil electrical conductivity showed a significant difference among all studied zones, showing values from 0.9 to 6.4 dS m⁻¹, *i.e.* 0.9 ± 0.1 (zone 1), 1.6 ± 0.3 (zone 2), 2.4 ± 0.2 (zone 3), 3.5 ± 0.4 (zone 4), 4.5 ± 0.1 (zone 5), 5.2 ± 0.1 (zone 6), and 6.4 ± 0.1 1.6 dS m⁻¹ (zone 7), which may be related to the land topography, climatic conditions, soil erosion, tillage, irrigation with poor quality water, and the excessive use of synthetic agro-inputs (Yan *et al.* 2015; Medina-García, 2016).

High electrical conductivities negatively affect the physical and chemical properties of soils, as well as their microbial population and diversity (Orhan, 2016), due to an osmotic regulation (Yan *et al.*, 2015). Plants interact with ~ 1x10⁹ microbial cells g⁻¹ dry soil and 1x10⁵ microbial species g⁻¹ dry soil, showing the ability to transform the soil organic matter and nutrients, and regulate plant and phytopathogen growth (Grover *et al.*, 2011; Dohrmann *et al.*, 2012). Consequently, microorganisms have an important role in agroecosystems, and studying the modulation of those microbial communities by saline soils is a daunting prospect since salt stress represents one of the most common constraints in agriculture (Yan *et al.*, 2015). Various PGPM have been reported to mitigate osmotic stress on plants in saline soils (Kumar and Verma, 2018). In order to improve plant growth under salt stress conditions, PGPM have developed diverse mechanisms, including regulation of water flow by changing root architecture, modulation of K⁺ and Na⁺ ions uptake, exopolysaccharides production, production of VOC and osmoprotectants synthesis, up-regulating antioxidant defense enzymes, production of ACC deaminase production, and the expression of stress-responsive genes, among others (Gupta *et al.*, 2022). For example, the inoculation of *B. paralicheniformis* TRQ65, a salt-tolerant strain, reduces the negative salt effect on wheat, increasing the shoot height by 24.5 % and the root length by 136 % compared to the un-inoculated treatment (Ibarra-Villarreal *et al.*, 2021). Besides, some studies have shown that this strain contains genes involved in tolerance to salinity stress conditions, such as OsmY, OpuCC, OpuCB, and OpuCA (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019).

In this work, wheat commercial zones having 1.6 dS m^{-1} showed a fungal population ($2.59 \times 10^6 \text{ CFU g}^{-1}$ dry soil) higher than the other study zones (Figure 1A). In addition, no fungal strains from zones having 3.5, 4.5, and 5.2 dS m^{-1} were isolated (Figure 1A). Soils having 1.6 dS m^{-1} are considered non-saline (very low abiotic stress) (Bronicka *et al.*, 2007). The most important metabolic strategy for fungi to tolerate this low level of salinity level is the use of compatible solutes, which generate a balance in the environmental osmotic pressure by the accumulation of organic molecules (glycerol) that help to maintain low intracellular salt concentrations (Perl *et al.*, 2017). However, the efficiency of this metabolic strategy depends on the genetic background of each fungal strain. Thus, based on the 5.8S rRNA gene sequencing, the most abundant fungal genera were *Rhizopus*, *Aspergillus*, and *Penicillium* (Figure 1B). *Rhizopus* has a high variability of lifestyles and habitats due to its capacity to use a wide range of carbon sources and tolerance to osmotic and thermal stress (Meussen *et al.*, 2012; Kaerger *et al.*, 2015). In addition, it has been reported as a biocontrol agent against *Fusarium*, the causal agent of *Fusarium* head blight (FHB) of wheat (Mullenborn *et al.*, 2008). On the other hand, *Penicillium* is one of the most common fungi found in extreme (salinity, temperature, water, and pH) environments, where its function in nature is the decomposition of organic materials (Yadav *et al.*, 2018). *Aspergillus* is found in spoiled foods, stored grains, nuts, and spices. This genus generally grows at higher temperatures or lower water activities and produces spores that often are more resistant to light and chemicals than *Penicillium* (Pitt and Hocking, 2009).

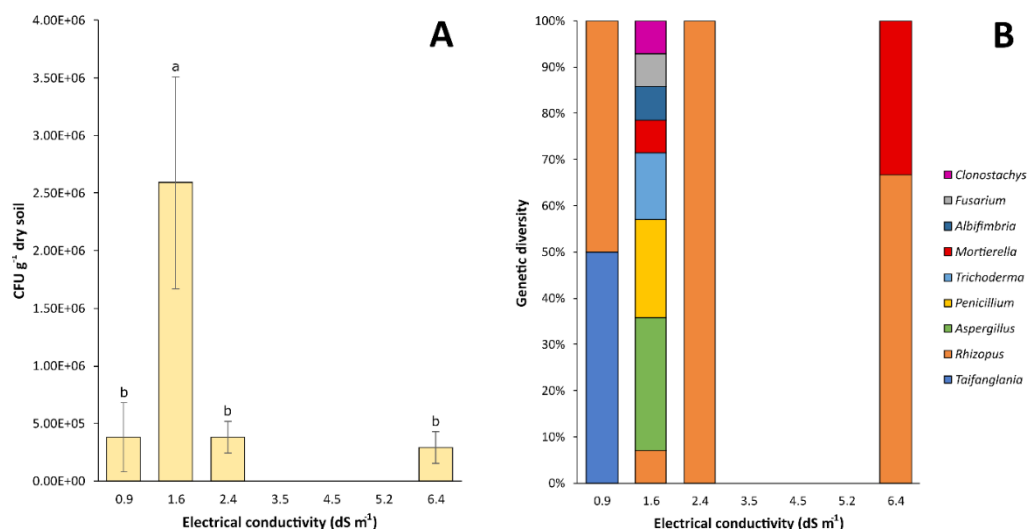


Figure 1. Cultivable fungal communities found in seven wheat commercial zones in the Yaqui Valley, under different levels of soil electrical conductivity. A: Cultivable fungi population; B: genetic diversity of the obtained fungal strains (based on the 5.8S rRNA gene sequencing). Different letters indicate significant difference using the Tukey-Kramer test ($p \leq 0.05$).

Similarly, wheat commercial zones having 1.6 dS m⁻¹ showed a higher bacterial population (2.88×10^7 CFU g⁻¹ dry soil) than the other zones evaluated (Figure 2A). The most abundant and well-distributed (in all study zones) genus was *Bacillus* (Figure 2B), which has a greater genetic and metabolic background involved in the production of antibiotics, antimicrobial and antifungal metabolites, siderophores, lytic enzymes, toxins, induction of systemic resistance in plants, and adaptability to extreme environmental conditions (Luna-Martínez *et al.*, 2013; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2019; Robles-Montoya *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019; Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). *Bacillus* is the most widely distributed bacteria in soils by its ability to form spores and tolerate a wide range of environmental conditions (heat, radiation, chemicals, and pH) (Parvathi *et al.*, 2009).

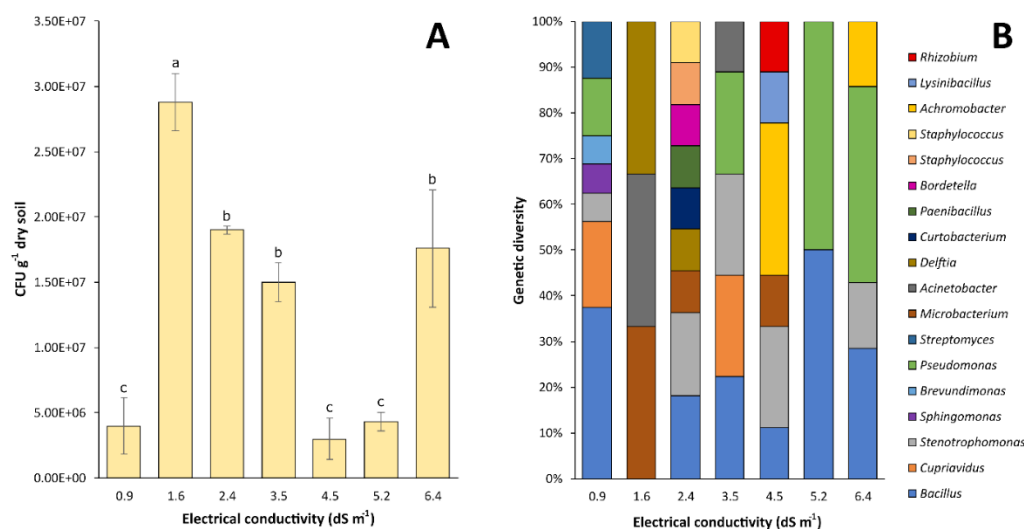


Figure 2. Cultivable bacterial communities in seven wheat commercial zones in the Yaqui Valley, under different levels of soil electrical conductivity. A: Cultivable bacteria population; B: genetic diversity of the obtained bacterial strains (based on the 16S rRNA gene sequencing). Different letters indicate significant difference using the Tukey-Kramer test ($p \leq 0.05$).

In all studied zones the bacterial population was higher than the fungal population (Figure 1A, Figure 2A). Similarly, Yan *et al.* (2015) have reported an increment in the bacteria/fungi ratio in saline soil. The higher abundance of bacteria compared to other microorganisms in saline soils can be explained by their faster growth, and their ability to use a wide range of carbon and nitrogen substrates (Calvo-Vélez *et al.*, 2008). In addition, bacteria have several adaptation strategies to combat saline conditions, such as i) the accumulation of solutes (KCl) in the cytoplasm to compensate for the osmotic pressure of the external environment (Ramírez *et al.* 2006), and ii) the salt exclusion from the cytoplasm to synthesize and/or accumulate solutes that do not interfere with the enzymatic activity (Oren, 2008).

To identify promising PGPM, the obtained bacterial and fungal strains were *in vitro* characterized for plant growth-promoting traits, such as phosphate solubilization, siderophore, and indole production. In this study, 36 % of bacterial strains showed the ability to solubilize insoluble phosphates. Such bacteria belong to the genus *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Stenotrophomonas* (Table 2). It has been reported that a high diversity of bacterial species can solubilize insoluble inorganic phosphates, such as tricalcium phosphate, dicalcium phosphate, hydroxyapatites, and phosphoric rock (Goldstein, 1986), which have been reported as plant growth-promoting bacteria (El-Azouni, 2008; Ahemad and Kibret, 2014).

Table 2. Metabolic traits of bacterial strains isolated from the study zones in the Yaqui Valley, grouped by soil electrical conductivity.

| Electrical conductivity (dS m ⁻¹) | Strain | Genus | Species | Phosphorus solubilization (PI)* | Siderophores production (SI)* | Indole production (µg mL ⁻¹)* | Hemolysis |
|---|-----------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|-----------|
| 0.9 | TRQ15A | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | -- ~ | -- | 14.0 ± 1.7 d | γ |
| | TRQ15 | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | 1.4 ± 0.1 ab | -- | 9.3 ± 0.9 d | γ |
| | TRQ16 | <i>Cupriavidus</i> | <i>alkaliphilus</i> | -- | -- | 1.8 ± 0.2 e | β |
| | TRQ17 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>indicatrix</i> | -- | 1.1 ± 0.0 a | 1.2 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ18 | <i>Sphingomonas</i> | sp. | -- | -- | 3.0 ± 0.7 e | γ |
| | TRQ19 | <i>Brevundimonas</i> | <i>vesicularis</i> | -- | -- | 3.6 ± 0.9 e | γ |
| | TRQ20A | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | -- | -- | 5.3 ± 0.5 de | α |
| | TRQ21 | <i>Streptomyces</i> | <i>galilaeus</i> | 1.2 ± 0.0 b | -- | 38.9 ± 7.1 c | α |
| | TRQ22 | <i>Streptomyces</i> | <i>galilaeus</i> | 1.4 ± 0.0 b | -- | 17.4 ± 2.1 d | γ |
| | TRQ61 | <i>Cupriavidus</i> | <i>alkaliphilus</i> | -- | -- | 1.5 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ62A | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | -- | -- | 3.2 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ63 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | -- | -- | 5.6 ± 0.2 e | β |
| | TRQ64 | <i>Cupriavidus</i> | <i>taiwanensis</i> | -- | -- | 1.5 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ65 | <i>Bacillus</i> | <i>paralicheniformis</i> | 1.4 ± 0.1 b | -- | 39.3 ± 1.7 c | γ |
| | TRQ66A | <i>Bacillus</i> | <i>paramycoides</i> | -- | 1.5 ± 0.1 a | 46.1 ± 2.6 ab | γ |
| | TRQ67A | <i>Pseudomonas</i> | sp. | -- | 1.1 ± 0.1 a | 2.7 ± 0.2 e | γ |
| 1.6 | TRQ24 | <i>Microbacterium</i> | <i>arborescens</i> | -- | -- | 2.1 ± 0.1 e | β |
| | TRQ25 | <i>Acinetobacter</i> | <i>lactucae</i> | 1.3 ± 0.1 b | -- | 52.7 ± 2.9 ab | γ |
| | TRM13 | <i>Delftia</i> | sp. | -- | -- | 2.1 ± 0.2 e | γ |
| 2.4 | TRQ27A | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | 1.3 ± 0.1 b | -- | 6.0 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ28A | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | 1.3 ± 0.0 b | -- | 2.2 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ29 | <i>Delftia</i> | <i>tsuruhatensis</i> | 1.2 ± 0.1 b | 1.5 ± 0.0 a | 72.1 ± 4.1 a | γ |
| | TRQ30A | <i>Curtobacterium</i> | <i>pusillum</i> | 1.6 ± 0.0 b | -- | 2.2 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ69 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | 1.2 ± 0.0 b | -- | 1.5 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ70 | <i>Paenibacillus</i> | <i>lautus</i> | -- | 1.1 ± 0.0 a | 2.1 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ71 | <i>Microbacterium</i> | <i>oxydans</i> | -- | -- | 4.6 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ72 | <i>Stenotrophomonas</i> | sp. | -- | -- | 8.6 ± 0.1 d | γ |
| TRQ73 | <i>Bordetella</i> | <i>hinzii</i> | -- | -- | 1.9 ± 0.0 e | γ | |
| TRQ74 | <i>Staphylococcus</i> | <i>sciuri</i> | -- | -- | 8.6 ± 0.2 d | γ | |

Table 2. Continue

| Electrical conductivity (dS m ⁻¹) | Strain | Genus | Species | Phosphorus solubilization (PI)* | Siderophores production (SI)* | Indole production (µg mL ⁻¹)* | Hemolysis |
|---|--------|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|-----------|
| 3.5 | TRQ32 | <i>Bacillus</i> | <i>sonorensis</i> | -- | -- | 1.6 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ33 | <i>Cupriavidus</i> | <i>taiwanensis</i> | -- | -- | 1.6 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ34 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | -- | 1.1 ± 0.0 a | 4.2 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ35A | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | 1.8 ± 0.2 a | -- | 3.9 ± 0.3 e | γ |
| | TRQ36 | <i>Bacillus</i> | <i>licheniformis</i> | 1.3 ± 0.1 b | -- | 2.1 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ37A | <i>Cupriavidus</i> | <i>neocaledonicus</i> | -- | -- | 2.2 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ38 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | -- | 1.7 ± 0.1 a | 3.3 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ39 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | -- | -- | 3.1 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ76A | <i>Acinetobacter</i> | <i>calcoaceticus</i> | 1.5 ± 0.1 ab | -- | 2.6 ± 0.1 e | γ |
| 4.5 | TRQ40 | <i>Microbacterium</i> | <i>paraoxydans</i> | -- | -- | 13.4 ± 1.0 d | γ |
| | TRQ41 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | 1.5 ± 0.1 ab | -- | 3.0 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ42 | <i>Lysinibacillus</i> | sp. | -- | -- | 12.2 ± 1.7 d | α |
| | TRQ43 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | 1.3 ± 0.0 b | -- | 1.5 ± 0.17 e | γ |
| | TRQ44 | <i>Rhizobium</i> | <i>pusense</i> | 1.3 ± 0.1 b | 1.0 ± 0.0 a | 5.2 ± 0.5 e | γ |
| | TRQ46 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | -- | -- | 1.9 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ47 | <i>Bacillus</i> | <i>subtilis</i> | -- | -- | 37.8 ± 1.1 c | γ |
| | TRQ77 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | 1.3 ± 0.1 b | 1.6 ± 0.0 a | 1.4 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ78 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | -- | -- | 5.3 ± 0.2 e | γ |
| 5.2 | TRQ48 | <i>Bacillus</i> | <i>subtilis</i> | -- | 1.8 ± 0.8 a | 2.3 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ49 | <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> | 1.3 ± 0.1 b | -- | 3.2 ± 0.0 e | β |
| | TRQ51 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | -- | -- | 4.5 ± 0.1 e | α |
| | TRQ52 | <i>Pseudomonas</i> | <i>frederiksbergensis</i> | 1.4 ± 0.0 ab | -- | 3.7 ± 0.1 e | γ |
| 6.4 | TRQ90 | <i>Pseudomonas</i> | <i>chlororaphis</i> | -- | 1.2 ± 0.0 a | 3.1 ± 0.1 e | β |
| | TRQ55A | <i>Achromobacter</i> | sp. | -- | -- | 2.5 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ56 | <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> | -- | 1.2 ± 0.0 a | 48.9 ± 2.5 ab | γ |
| | TRQ57A | <i>Pseudomonas</i> | <i>extremorientalis</i> | 1.6 ± 0.1 ab | -- | 2.1 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ58 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | 1.3 ± 0.1 b | 1.3 ± 0.0 a | 7.8 ± 0.2 de | γ |
| | TRQ59A | <i>Bacillus</i> | <i>amyloliquefaciens</i> | 1.4 ± 0.1 ab | -- | 2.5 ± 0.3 e | β |
| | TRQ60 | <i>Pseudomonas</i> | <i>chlororaphis</i> | -- | 2.3 ± 0.1 a | 2.1 ± 0.1 e | γ |

*Different letter indicates significant difference using the Tukey-Kramer test ($p \leq 0.05$).

(--): negative test.

Moreover, 23 % of fungal strains were able to solubilize phosphorus, *i.e.*, *Taifanglania*, *Penicillium*, *Rhizopus*, and *Aspergillus* (Table 3). These genera have been reported as phosphate-solubilizing dominants in the rhizosphere (Alam *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2016). The higher phosphate-solubilizing bacterium and fungus were *Pseudomonas putida* TRQ35A (1.83), and *Albifimbria verrucaria* TRQ88 (2.4), respectively. Phosphate solubilization is an important microbial growth promotion mechanism in alkaline soils (Hernández-Leal *et al.*, 2011) because phosphorus is insoluble under this condition, but it is involved in several microbial and plant functions, such as respiration, photosynthesis, macromolecular biosynthesis, energy transfer, and signal transduction (Gupta *et al.*, 2015).

Table 3. Metabolic traits of fungal strains isolated from the study zones in the Yaqui Valley, grouped by soil electrical conductivity.

| Electrical conductivity (dS m ⁻¹) | Strain | Genus | Species | Phosphorus solubilization (PI)* | Siderophores production (SI)* | Indole production (µg mL ⁻¹)* | Hemolysis |
|---|--------|---------------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|-----------|
| 0.9 | TRQ79 | <i>Taifanglania</i> | sp. | -- | -- | 5.9 ± 1.1 b | γ |
| | TRQ81 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | -- | -- | 3.3 ± 0.5 bc | α |
| | TRQ82 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | -- | -- | 2.8 ± 0.2 c | α |
| | TRQ83 | <i>Aspergillus</i> | <i>nidulans</i> | 1.1 ± 0.0 a | -- | 2.9 ± 0.0 c | γ |
| | TRQ84 | <i>Penicillium</i> | <i>citrinum</i> | -- | -- | 4.7 ± 0.9 b | α |
| | TRQ85 | <i>Trichoderma</i> | sp. | -- | 1.2 ± 0.0 | 3.3 ± 0.3 bc | γ |
| | TRQ86 | <i>Mortierella</i> | <i>alpina</i> | -- | -- | 3.3 ± 0.4 bc | γ |
| | TRQ87 | <i>Penicillium</i> | <i>rubidurum</i> | 1.2 ± 0.1 a | -- | 3.5 ± 0.1 bc | γ |
| | TRQ88 | <i>Albifimbria</i> | <i>verrucaria</i> | 2.4 ± 1.3 a | -- | 6.7 ± 0.9 b | α |
| 1.6 | TRQ89 | <i>Aspergillus</i> | <i>tubingensis</i> | -- | -- | 7.0 ± 0.9 b | γ |
| | TRQ90 | <i>Penicillium</i> | <i>rubidurum</i> | 1.3 ± 0.0 a | -- | 1.5 ± 0.0 c | β |
| | TRQ91 | <i>Fusarium</i> | <i>chlamydosporum</i> | -- | -- | 4.0 ± 0.1 bc | α |
| | TRQ92 | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> | -- | -- | 4.6 ± 0.3 bc | β |
| | TRQ93 | <i>Trichoderma</i> | sp. | -- | -- | 11.0 ± 3.3 a | γ |
| | TRQ94 | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> | -- | -- | 4.6 ± 0.9 bc | γ |
| | TRQ95 | <i>Clonostachys</i> | <i>rosea</i> | -- | -- | 3.9 ± 0.8 bc | α |
| 2.4 | TRQ96 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | 1.2 ± 0.0 a | -- | 3.6 ± 0.5 bc | α |
| | TRQ97 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | -- | -- | 8.1 ± 0.9 b | γ |
| 6.4 | TRQ98 | <i>Mortierella</i> | <i>alpina</i> | -- | -- | 2.1 ± 0.1 c | γ |
| | TRQ99 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | -- | -- | 3.0 ± 0.0 bc | α |

*Different letter indicates significant difference using the Tukey-Kramer test (p<0.05).

(--): negative test.

Similar to phosphorus, iron is an essential element for the development of microorganisms and plants, *i.e.*, enzyme cofactor (Gupta *et al.*, 2015). Thus, microorganisms produce siderophores -chelating compounds with low molecular weights- that help to promote plant growth and phytopathogen inhibition by iron sequestration (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018a). The siderophore production was detected in 19 % of the studied bacterial strains, with *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Stenotrophomonas* showing the highest siderophore production; *Pseudomonas chlororaphis* TRQ60 displayed up to 2.3 (Table 2). For fungal strains, only the *Trichoderma* sp. TRQ85 showed the ability to produce siderophores, 1.2 (Table 3).

For indole production, all studied microbial strains were able to produce this phytohormone from 1.2 to 72.1 µg mL⁻¹ (using tryptophan as a precursor). *Delftia tsuruhatensis* TRQ29 showed the ability to produce the highest indole concentration, 72.1 µg mL⁻¹, followed by strains of the *Bacillus* genus (~ 50 µg mL⁻¹) (Table 2). Fungal strains showed a low production of this compound, where the highest indole producer

was *Trichoderma* sp. TRQ93, with $11.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 3). Indoles are the most common plant hormones, which are involved in the regulation of the surface and length of the root; thus, plants inoculated with indole-producing microorganisms have an increased uptake of soil nutrients, cell elongation, cell division, and cell differentiation (Glick, 2012; Kumla *et al.*, 2014; Fu *et al.* 2015).

Finally, the hemolysis test helps to know the potential impact of these microbial strains on animal and human health. In this study, 83 % of bacterial strains (Table 2) and 52 % of fungal strains (Table 3) showed the ability to produce γ -hemolysis, which indicates that those microorganisms do not cause any alteration to erythrocytes in the culture medium, and therefore, are not harmful to human and animals. However, the remaining microbial strains showed potential health risks (α - or β -hemolysis), degrading erythrocytes (totally or partially) (Villa-Rodriguez *et al.*, 2019). The evolution of microbial hemolysis for the sole purpose of lysing red blood cells *in vivo* to improve growth is highly unlikely. Thus, several specific and detailed assays need to be developed to guarantee that the application of these strains is not a reservoir of human, animal, or plant pathogens or harmful microorganisms, even when they improve soil fertility and food production.

CONCLUSIONS

Salinity negatively impacts the population and diversity of bacteria and fungi in soils from wheat commercial fields in the Yaqui Valley, Mexico. *Bacillus* and *Rhizopus* were the most abundant and well-distributed microbial genera in the gradient of studied saline soils. In addition, the effect of salinity on bacterial and fungal diversity was observed. Their metabolic background was not species- or genus-specific, showing that it was at a strain-specific level. These findings suggest future experimental approaches in the context of important ecological and sustainability issues to be addressed, such as i) the resilience of the Yaqui Valley to saline soils to anticipate the biological soil/environment degradation in terms of functional and/or genetic bacterial diversity; and ii) the development of sustainable alternatives to mitigate the negative impacts of saline soils on wheat yield and quality. Finally, since microbes help plants tolerate salinity, it is important to identify promising plant growth-promoting microorganisms for improving crop productivity under this abiotic stress condition, without a negative impact on animal and human health. Thus, this work provides a microbial culture collection having several beneficial traits that need to be studied in the future for its application to wheat growing under saline soil conditions to increase its yield and quality in the Yaqui Valley (and other agroecosystems having saline soils worldwide) through the use of sustainable agricultural practices.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the CONACyT Project 1774, the CONACyT Project 257246, and the PROFAPI ITSON project 2023_002. Arlett L. Ibarra Villarreal CVU 479660, Jonathan Rojas Padilla CVU 262903, Luis Abraham Chaparro-Encinas CVU 292582, Alondra M. Díaz Rodríguez

CVU 908966 and Valeria Valenzuela Ruiz CVU 712969 acknowledge the support by CONACYT for the fellowship granted for their postgraduate studies.

REFERENCES

- Ahemad M, Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University* 26 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alam S, Khalil S, Ayub N, Rashid M. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology* 4 (4): 454–458.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Annunziata MG, Ciarmiello LF, Woodrow P, Maximova E, Fuggi A, Carillo P. 2017. Durum wheat roots adapt to salinity remodeling the cellular content of nitrogen metabolites and sucrose. *Frontiers in Plant Science* 7: 2035. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02035>
- Bhat NA, Riar A, Ramesh A, Iqbal S, Sharma MP, Sharma SK, Bhullar GS. 2017. Soil biological activity contributing to phosphorus availability in vertisols under long-term organic and conventional agricultural management. *Frontiers in Plant Science* 8: 1523. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01523>
- Bronicka M, Raman A, Hodgkins D, Nicol H. 2007. Abundance and diversity of fungi in a saline soil in central-west New South Wales, Australia. *Syndowia* 59 (1): 7–24.
- Calvo-Vélez P, Reymundo-Meneses L, Zúñiga-Dávila D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* 7 (1–2): 141–148.
- Córdova-Bautista Y, Rivera-Cruz MC, Ferrera-Cerrato R, Obrador-Olán JJ, Córdova-Ávalos V. 2009. Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar ‘Gran enano’ y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia* 25 (3): 253–265.
- Corrales-Maldonado C, Vargas-Arispuro S, Vallejo-Cohen S, Martínez-Téllez M. 2014. Deficiencia de azufre en suelos cultivables y su efecto en la productividad. *Biotecnia* 16 (1): 38–44. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i1.32>
- Cortés-Jimenez JM, Troyo-Diéguez E, Murillo-Amador B, García-Hernández JL, Garatuzapayan J, Suh Lee S. 2009. Índices de calidad del agua del acuífero del Valle del Yaqui, Sonora. *Terra Latinoamericana* 27 (2): 133–141.
- de los Santos-Villalobos S, Barrera-Galicia GC, Miranda-Salcedo MA, Peña-Cabrales JJ. 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (8): 2615–2623. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1071-9>
- de los Santos-Villalobos S, Díaz-Rodríguez AM, Ávila-Mascareño MF, Martínez-Vidales AD, Parra-Cota FI. 2021. Colmena: A culture collection of native microorganisms for harnessing the agro-biotechnological potential in soils and contributing to food security. *Diversity* 13 (8): 337. <https://doi.org/10.3390/d13080337>
- de los Santos-Villalobos S, Guzmán-Ortiz DA, Gómez-Lim MA, Délano-Frier JP, de-Folter S, Sánchez-García P, Peña-Cabrales JJ. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control* 64 (1): 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.006>
- de los Santos-Villalobos S, Kremer JM, Parra-Cota FI, Hayano-Kanashiro AC, García-Ortega LF, Gunturu SK, Peña-Cabrales JJ. 2018a. Draft genome of the fungicidal biological control agent *Burkholderia anthina* strain XXVI. *Archives of Microbiology* 200 (5): 803–810. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1490-6>

- de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota F, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragón B, Estrada-Mora JC. 2018b. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9 (1): 191–202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- de los Santos-Villalobos S, Robles-Montoya RI, Parra-Cota FI, Larsen J, Lozano P, Tiedje JM. 2019. *Bacillus cabiralesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (12): 3939–3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>
- Díaz-Rodríguez A, Parra-Cota FI, Santoyo G, de los Santos-Villalobos S. 2019. Chlorothalonil tolerance of indole producing bacteria associated to wheat (*Triticum turgidum* L.) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *Ecotoxicology* 28 (5): 569–577. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02053-x>
- Dohrmann AB, Küting M, Jünemann S, Jaenicke S, Schlüter A, Tebbe CC. 2012. Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt- and conventional maize varieties. *The ISME Journal* 7 (1): 37–49. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.77>
- Egamberdieva D, Wirth S, Bellingrath-Kimura SD, Mishra J, Arora NK. 2019. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology* 10: 2791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>
- El-Azouni I. 2008. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Journal of Applied Sciences Research* 4 (6): 592–598.
- Elias F, Woyessa D, Muleta D. 2016. Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology* 2016 (3): 5472601. <https://doi.org/10.1155/2016/5472601>
- Flowers TJ. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55 (396): 307–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh003>
- Foolad MR. 2004. Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76 (2): 101–119. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000007308.47608.88>
- Fu SF, Wei JY, Chen HW, Liu YY, Lu HY, Chou JY. 2015. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling and Behavior* 10 (8): e1048052. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Glick BR. 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* 12: 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2): 793–796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>
- Goldstein AH. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture* 1 (2): 51–57. <https://doi.org/10.1017/S0889189300000886>
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (5): 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
- Gupta A, Bano A, Rai S, Mishra R, Singh M, Sharma S, Pathak N. 2022. Mechanistic insights of plant-microbe interaction towards drought and salinity stress in plants for enhancing the agriculture productivity. *Plant Stress* 4: 100073. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100073>
- Gupta G, Singh P, Kumar N, Kumar S, Singh V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 7 (2): 96–102. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
- Hernández-Leal TI, Carrión G, Heredia G. 2011. Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia* 45: 881–892.
- Ibarra-Villarreal AL, Gándara-Ledezma A, Godoy-Flores AD, Herrera-Sepúlveda A, Díaz-Rodríguez AM, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2021. Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum*

- subsp. *durum*). Journal of Arid Environments 186: 104399. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>
- Ibekwe AM, Ors S, Ferreira JFS, Liu X, Suarez DL. 2017. Seasonal induced changes in spinach rhizosphere microbial community structure with varying salinity and drought. Science of The Total Environment 579: 1485–1495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.151>
- Kaerger K., Schwartze VU, Dolatabadi S, Nyilasi I, Kovács SA, Binder U, Papp T, Hoog S, Jacobsen ID, Voigt K. 2015. Adaptation to thermotolerance in *Rhizopus* coincides with virulence as revealed by avian and invertebrate infection models, phylogeny, physiological and metabolic flexibility. Virulence 6 (4): 395–403. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1029219>
- Kumar A, Verma JP. 2018. Does plant-microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? Microbiological Research 207: 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>
- Kumla J, Suwannarach N, Bussaban B, Matsui K, Lumyong S. 2014. Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand. Annals of Microbiology 64 (2): 707–720. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0706-x>
- Luna-Martínez L, Martínez-Peniche RA, Hernández-Iturriaga M, Arvizu-Medrano SM, Pacheco-Aguilar JR. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista Fitotecnia Mexicana 36 (1): 63–69.
- Matson P, Jewett P. 2012. Ecosystems and land-use change in the Yaqui Valley: Does Agricultural intensification “spare land for nature”? In Seeds of Sustainability, Matson P. (ed.). Island Press: Washington, DC, USA, pp: 7–62.
- Medina-García LR. 2016. La agricultura, la salinidad y los hongos micorrízicos arbusculares: una necesidad, un problema y una alternativa. Cultivos Tropicales 37 (3): 42–49. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1117.9765>
- Meussen B, Weusthuis R, Sanders J, Graaff L. 2012. Production of cyanophycin in *Rhizopus oryzae* through the expression of a cyanophycin synthetase encoding gene. Applied Genetics and Molecular Biotechnology 93 (3): 1167–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3604-9>
- Numan M, Bashir S, Khan Y, Mumtaz R, Shinwari Z, Khan AL, Khan A, Al-Harrasi A. 2018. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review. Microbiological Research 209 (2018): 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
- Mullenborn C, Steiner U, Ludwig M, Oerke E. 2008. Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. European Journal of Plant Pathology 120 (2): 157–166. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9204-y>
- Oren A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Systems 4 (1): 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
- Orhan F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). Brazilian Journal of Microbiology 47 (3): 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.001>
- Parvathi A, Krishna K, Jose J, Joseph N, Nair S. 2009. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. Brazilian Journal of Microbiology 40 (2): 269–275. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200012>
- Pikovskaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. Microbiology 17: 362–370.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Aspergillus* and related teleomorphs. In Fungi and food spoilage; Pitt J, Hocking A. (eds.) Springer: London, UK, pp: 275–337. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_8
- Porter JR, Semenov MA. 2005. Crop responses to climatic variation. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360 (1463): 2021–2035. <https://doi.org/10.1098/rstb.202005.1752>
- Pulido-Madrigal L, González-Meraz J, Wiegand CL, Infante-Reyes J, Delgado JM. 2010. Monitoreo de la salinidad mediante sensores remotos. Terra Latinoamericana 28 (1): 15–26.

- Qin Y, Druzhinina I, Pan X, Yuan Z. 2016. Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances* 34 (7): 1245–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.005>
- Ramírez N, Serrano RJ, Sandoval TH. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37 (3): 56–71.
- Robles-Montoya RI, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* TRQ8, a plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech* 9 (6): 201. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1726-4>
- Rojas-Padilla J, Chaparro-Encinas LA, Robles-Montoya RI, de los Santos-Villalobos S. 2020. Growth promotion in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) by co-inoculation of native *Bacillus* strains isolated from the Yaqui Valley, Mexico. *Nova Scientia* 12: 24. <https://doi.org/10.21640/ns.v12i24.2136>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2011. *Agronomía del Trigo en el Sur de Sonora. Libro Técnico No. 6.* Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México, México.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2015. *Manual técnico de muestreo de productos agrícolas y fuentes de agua para la determinación de contaminantes microbiológicos.* Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Ciudad de México, México. <http://www.cesavep.org/descargas/PIA/MANUAL03.pdf> (Retrieved: September 2022).
- Shafi M, Bakht J, Guoping Z, Khan MA, Islam EU, Khan MD. 2010. Effect of cadmium and salinity stresses on root morphology of wheat. *Pakistan Journal of Botany* 42 (4): 2747–2754.
- Sharma S, Kulkarni J, Jha B. 2016. Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Frontiers in Microbiology* 7: 1600. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01600>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. *Atlas agroalimentario 2012-2018.* Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México, México. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018 (Retrieved: September 2022)
- Perl T, Kis-Papo T, Nevo E. 2017. Fungal biodiversity in the hypersaline dead sea: extinction and evolution. *Biological Journal of the Linnean Society* 121: 122–132. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blw025>
- Upadhyay S, Singh D. 2014. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biology* 17 (19): 288–293. <https://doi.org/10.1111/plb.12173>
- Valenzuela-Aragon B, Parra-Cota FI, Santoyo G, Arellano-Wattenbarger GL, de los Santos-Villalobos S. 2019. Plant-assisted selection: A promising alternative for *in vivo* identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) growth promoting bacteria. *Plant and Soil* 435: 367–384. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>
- Valenzuela-Ruiz V, Robles-Montoya RI, Parra-Cota FI, Santoyo G, Orozco-Mosqueda M, Rodríguez-Ramírez R, de los Santos-Villalobos S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech* 9: 436. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1972-5>
- Verhulst N, Carillo-García A, Moeller C, Trethowan R, Sayre K, Govaerts B. 2011. Conservation agriculture for wheat-based cropping systems under gravity irrigation: Increasing resilience through improved soil quality. *Plant and Soil* 340 (1–2): 467–479. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0620-y>
- Villa-Rodríguez E, Lugo-Enríquez C, de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Figueroa-López P. 2016. First report of *Cochliobolus sativus* causing spot blotch on durum wheat (*Triticum durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *Plant Disease* 100 (11): 2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0634-PDN>

- Villa-Rodríguez E, Parra-Cota FI, Castro-Longoria E, López-Cervantes J, de los Santos-Villalobos S. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control* 132: 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez E, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2018. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36 (1): 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wang S, Hou X, Su H. 2017. Exploration of the relationship between biogas production and microbial community under high salinity conditions. *Scientific Reports* 7: 1149. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01298-y>
- Wang X, Yang J, Liu G, Yao R, Yu S. 2015. Impact of irrigation volume and water salinity on winter wheat productivity and soil salinity distribution. *Agricultural Water Management* 149: 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.10.027>
- Yadav AN, Verma P, Kumar V, Sangwan P, Mishra S, Panjar N, Gupta VK, Saxena AK. 2018. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Penicillium system properties and applications*; Gupta VK, Rodriguez-Couto S. (eds.). Elsevier: Amsterdam, Netherlands, pp. 3–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>
- Yan N, Marschner P, Cao W, Zuo C, Qin W. 2015. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research* 3: 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>

LA SALINIDAD DEL SUELO DESPLAZA A LAS COMUNIDADES MICROBIANAS CULTIVABLES DE LA RIZOSFERA DEL TRIGO (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) EN EL VALLE DEL YAQUI, MEXICO

Arlett Leticia Ibarra-Villarreal¹, Jonathan Rojas-Padilla¹, Luis Abraham Chaparro-Encinas², Alondra María Díaz-Rodríguez¹, Valeria Valenzuela-Ruiz¹, Angélica Herrera-Sepúlveda³, Fannie Isela Parra-Cota⁴, Sergio de los Santos-Villalobos^{1*}

¹ Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro, Ciudad Obregón, Sonora, México. C. P. 85000.

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez, Valle Verde, Torreón, Coahuila, México. C. P. 27054.

³ Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui. Av. Tecnológico, Block 611, Bacum, Sonora, México. C. P. 85276.

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Norman E. Borlaug. Calle Norman E. Borlaug km 12, Ciudad Obregón, Sonora, México. C. P. 85000.

* Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx

Citation: Ibarra-Villarreal AL, Rojas-Padilla J, Chaparro-Encinas LA, Díaz-Rodríguez AM, Valenzuela-Ruiz V, Herrera-Sepúlveda A, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2023. La salinidad del suelo desplaza a las comunidades microbianas cultivables de la rizosfera del trigo (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) en el Valle del Yaqui, México. *Agrociencia* 57(5): 882-919. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2882

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: October 03, 2022.
Approved: May 12, 2023.
Published in Agrociencia:
July 17, 2023.

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



RESUMEN

Los suelos salinos son un problema común en campos comerciales que utilizan prácticas agrícolas intensivas y de riego bajo climas áridos o semiáridos, como el Valle del Yaqui en México, una de las regiones productoras de trigo más importantes a nivel mundial. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la diversidad microbiana cultivable (con atributos promotores del crecimiento vegetal) asociada a la rizosfera del trigo en campos comerciales, bajo un gradiente de suelos salinos en el Valle del Yaqui. Para ello, se estudiaron siete zonas comerciales de trigo de acuerdo a su conductividad eléctrica (0.9 a 6.4 dS cm⁻¹). El aislamiento de los microorganismos se realizó mediante técnicas de cultivo dependiente, secuenciación de los genes 16S (bacterias) y 5.8S (hongos) ARNr, y se evaluaron los atributos promotores del crecimiento vegetal: solubilización de fosfatos (medio Pikovskaya), producción de sideróforos (medio Cromo Azurol S), producción de indoles (reactivo de Salkowsky) y actividad hemolítica (placas de Petri 5 % Sangre de Oveja). Las zonas comerciales de trigo con 1.6 dS m⁻¹ mostraron las mayores poblaciones fúngicas (2.59 x 10⁶ UFC g⁻¹ suelo seco) y bacterianas (2.88 x 10⁷ UFC g⁻¹ suelo seco), siendo *Rhizopus* y *Bacillus* los géneros microbianos más abundantes y mejor distribuidos, respectivamente. El impacto de los suelos salinos sobre el fondo metabólico microbiano no fue específico de especie o género, sino a nivel de cepa. Además, el 52 % de las cepas fúngicas y el 83 % de las bacterianas mostraron la capacidad de producir γ -hemólisis, lo que sugiere que no es perjudicial para humanos y animales. Este trabajo proporciona una colección de cultivos microbianos en la que sus miembros han mostrado varios rasgos beneficiosos que potencialmente aumentan el rendimiento y la calidad del trigo cultivado en condiciones de suelo salino.

Palabras clave: microorganismos promotores del crecimiento vegetal, *Bacillus*, *Rhizopus*, conductividad eléctrica, afiliación taxonómica.

INTRODUCCIÓN

El Valle del Yaqui se localiza en el sur del Estado de Sonora en México y es el principal estado productor de trigo en este país (Matson y Jewett, 2012). Este valle aporta el 47 % de la producción nacional de trigo (1.7×10^6 Mg año⁻¹), que se produce en 173 000 ha (SIAP, 2018). Sin embargo, este cultivo es altamente sensible a condiciones ambientales, como temperaturas extremas, reducción de agua y suelos salinos (Porter y Semenov, 2005).

La salinidad en los suelos agrícolas se reconoce como una limitación importante para la producción de alimentos. Se calcula que el 20 % de los campos cultivados de todo el mundo están afectados por esta condición abiótica (Flowers, 2004). Los suelos salinos son un problema común en los campos comerciales que utilizan prácticas agrícolas intensivas y de riego bajo climas áridos o semiáridos, por ejemplo, el Valle del Yaqui (aproximadamente 12 % de sus suelos agrícolas se clasifican como salinos (> 4 dS m⁻¹)) (Cortés-Jimenez *et al.*, 2009; Pulido-Madrigal *et al.*, 2010). Se ha reportado que el rendimiento de trigo se reduce en ~ 65 % bajo suelos moderadamente salinos (Shafi *et al.*, 2010), a una tasa de 7 % para el incremento en 1 dS m⁻¹ (Wang *et al.*, 2015). La salinidad del suelo afecta a casi todos los aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la germinación, el crecimiento vegetativo y el rendimiento (Foolad, 2004), debido al estrés hiperosmótico que provoca una acumulación de sal en las raíces, lo que disminuye su capacidad de absorción de agua y genera estrés oxidativo (Annunziata *et al.*, 2017).

La salinidad también regula la abundancia, diversidad y función de las comunidades microbianas del suelo, debido a un potencial osmótico negativo en las células microbianas que genera plasmólisis y pérdida de actividad celular (Wang *et al.*, 2017), así como toxicidad iónica específica (Ibekwe *et al.*, 2017). Este desequilibrio microbiano en los agroecosistemas conlleva elevados costes económicos y ambientales debido a la reducción del rendimiento de los cultivos, la volatilización de fertilizantes, la generación de gases de efecto invernadero y la contaminación de las aguas subterráneas (Cortés-Jimenez *et al.*, 2009). Por lo tanto, la microbiota representa una alternativa sostenible que contribuye a la seguridad alimentaria, ya que estos microorganismos realizan varios servicios ecosistémicos vitales, como i) sostenibilidad social y ecológica, ii) adaptación y mitigación del cambio climático, iii) recursos biotecnológicos para la humanidad, iv) ciclos biogeoquímicos, y v) aumento de la producción agrícola (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018b).

Las comunidades microbianas pueden interactuar con los cultivos (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2019), regulando su crecimiento y productividad a través de diferentes mecanismos como la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos, solubilización de nutrientes minerales, actividad ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminasa, excreción de antibióticos, toxinas, enzimas líticas y resistencia sistémica inducida (Orhan, 2016; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019; Robles-Montoya *et al.*, 2019; Villa-Rodríguez *et al.*, 2019; Rojas-Padilla *et al.*, 2020), recibiendo el nombre de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (MPCV) (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019). Bajo condiciones

de salinidad, el efecto protector de los MPCV consiste en reducir la producción de etileno, aumentar las concentraciones de fitohormonas como ácido abscísico, auxinas, giberelinas y citoquininas, dar protección contra especies reactivas de oxígeno (ROS), producir solutos compatibles, solubilizar fosfatos, producir exopolisacáridos y controlar fitopatógenos (Numan *et al.*, 2018; Egamberdieva *et al.*, 2019).

Actualmente, los MPCV se ha utilizado para mitigar el efecto de la salinidad del suelo en los cultivos (Qin *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016). Por ejemplo, Upadhyay y Singh (2014) demostraron que la inoculación de bacterias tolerantes a la salinidad (*Bacillus pumilus*, *Bacillus aquimaris*, *Bacillus arsinicus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas mendocina* y *Arthrobacter* sp.) en campos de trigo aumentó la densidad aparente (de 1.32 a 1.55 g cm⁻³), el carbono orgánico (1.3 a 3.8 %), la densidad de partículas (1.42 a 1.6 g cm⁻³) y la capacidad de retención de agua (8.2 a 12 %), mientras que disminuyeron el contenido de sodio (33 a 10 ppm), la conductividad eléctrica (4.8 a 1.6 dS m⁻¹) y el pH (8.1 a 6.8). Además, la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Bacillus*, *Halobacillus*, *Thalassobacillus*, *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Staphylococcus* y *Zhihengliuella*) al trigo bajo estrés salino (200 mM NaCl) aumentó significativamente (en comparación con el tratamiento no inoculado) la altura de la planta y la longitud de la raíz, así como el peso total de las plantas en comparación con las plantas no inoculadas (Orhan, 2016).

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la diversidad microbiana cultivable (bacterias y hongos) que tienen atributos promotores del crecimiento vegetal asociados con la rizosfera de trigo en campos comerciales, bajo un gradiente de suelo salino en el Valle del Yaqui, México. Este estudio proporciona la primera visión, desde los inicios del Valle del Yaqui (década de 1930), de los microorganismos tolerantes a la sal que promueven el crecimiento vegetal asociados con el trigo, y su papel potencial como agente mitigador del estrés salino en este cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y análisis nutricional

En este estudio se analizaron siete hectáreas de zonas comerciales de trigo en el Valle del Yaqui, México (26° 45' - 27° 33' de latitud norte y 109° 30' - 110° 37' de longitud oeste). Durante 10 años, todas las zonas agrícolas estudiadas recibieron una cantidad y fuente similar de fertilizantes sintéticos de acuerdo a los requerimientos nutricionales del trigo (N, 263 kg ha⁻¹; P, 120 kg ha⁻¹; y K, 60 kg ha⁻¹). Además, todas las zonas estudiadas tuvieron el mismo laboreo convencional (subsulado, barbecho, nivelación), riego (4 veces, 13 cm de riego por vez) y densidad de siembra (180 kg ha⁻¹) (Cortés-Jimenez *et al.*, 2009). Las muestras de suelo se colectaron (30 cm de profundidad) de acuerdo a SAGARPA (2011) y SENASICA (2015), utilizando un método de muestreo en "zig-zag", obteniendo tres muestras compuestas (21 muestras individuales) de suelo para cada zona comercial de trigo. Las muestras colectadas para análisis físico-químicos se transfirieron a bolsas de papel para su secado (60 °C) y posterior análisis

de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000; mientras que las colectadas para análisis microbiológico se colocaron en cámaras húmedas y se transportaron en hielera a 4 °C (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

Aislamiento microbiano

El aislamiento de microorganismos se llevó a cabo mediante técnicas de cultivo dependiente, en las que 10.0 g de cada muestra de suelo se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 90 mL de agua destilada estéril (121 °C y 15 psi durante 15 min) y se homogeneizaron en un agitador rotatorio durante 1 h a 150 rpm. Se prepararon diluciones seriadas (1:10) hasta 10^{-4} para el aislamiento de bacterias y 10^{-3} para el de hongos. A continuación, se vertieron 100 µL de cada dilución seriada en placas de Petri que contenían agar nutritivo (AN) suplementado con 80 ppm de terbinafina para el aislamiento de bacterias, agar papa dextrosa (APD) suplementado con 80 ppm de ácido nalidíxico para el aislamiento de hongos, y luego se incubaron durante 3 días a 28 °C. Se utilizaron unidades formadoras de colonias (UFC) para estimar la población microbiana en cada zona comercial de trigo (Córdova-Bautista *et al.*, 2009; Villa-Rodríguez *et al.*, 2016).

Todos los aislados bacterianos se conservaron en la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA) (www.itson.mx/COLMENA) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018b; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2021).

Afiliación taxonómica de los microorganismos aislados

Se extrajo el ADN genómico de cada aislado obtenido, de acuerdo con Valenzuela-Aragón *et al.* (2019). Se utilizó el gen 16S ARNr para afiliar las cepas bacterianas (cebadores FD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') y RD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3')), y el gen 5.8S ARNr para las cepas fúngicas (cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). La amplificación de los genes ribosomales se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 50 µL, que contenía 100 ng de ADN genómico como molde, 0.2 µmol de cebadores directo e inverso y 4 U de MyTaq ADN polimerasa. Las condiciones de la PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial a 94 °C (3 min), 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 s), seguidos de un alineamiento a 55 °C (30 s) y extensión a 72 °C (1 min), y un paso final de elongación a 72 °C (10 min). Los amplicones se verificaron por electroforesis en gel de agarosa (2 %) y se secuenciaron mediante la plataforma Sanger. Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el software FINCH TV (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, EE.UU.; <http://www.geospiza.com>), y se analizaron mediante la herramienta NCBI BLASTn (Altschul *et al.*, 1990), considerando el menor valor de expectativa (valor E), y el mayor porcentaje de identidad (Max ident). Las secuencias de ADN se depositaron en la base de datos GenBank y se asignaron números de acceso (Cuadro 1).

Cuadro 1. Asignación taxonómica de los 78 microorganismos aislados de las siete hectáreas de zonas comerciales de trigo en el Valle del Yaqui, México.

| Cepa | Número de acceso NCBI | Género | Especie | Número de acceso de la cepa de referencia | Porcentaje de cobertura (%) | Porcentaje de identidad (%) |
|--------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
| TRQ15A | OM047158 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | FJ377887.1 | 94 % | 97.35 % |
| TRQ15 | MK493677 | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | MN626631.1 | 97 % | 99.42 % |
| TRQ16 | OM047159 | <i>Cupriavidus</i> | <i>alkaliphilus</i> | MT935666.1 | 99 % | 99.60 % |
| TRQ17 | OM047160 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>indicatrix</i> | MW303508.1 | 100 % | 98.97 % |
| TRQ18 | MK493678 | <i>Sphingomonas</i> | sp. | MZ960296.1 | 100 % | 99.77 % |
| TRQ19 | MK493679 | <i>Brevundimonas</i> | <i>vesicularis</i> | MK248082.1 | 100 % | 99.88 % |
| TRQ20A | OM047161 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | CP050951.1 | 91 % | 99.39 % |
| TRQ21 | OM047162 | <i>Streptomyces</i> | <i>galilaeus</i> | CP023703.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ22 | OM047163 | <i>Streptomyces</i> | <i>galilaeus</i> | CP023703.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ61 | MK493703 | <i>Cupriavidus</i> | <i>alkaliphilus</i> | MT935666.1 | 100 % | 96.37 % |
| TRQ62A | OM047164 | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | MT525296.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ63 | OM047165 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | CP050183.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ64 | MK493705 | <i>Cupriavidus</i> | <i>taiwanensis</i> | LT991977.1 | 100 % | 98.69 % |
| TRQ65 | MN587961 | <i>Bacillus</i> | <i>paralicheniformis</i> | MN396257.1 | 100 % | 90.91 % |
| TRQ66A | ON103400 | <i>Bacillus</i> | <i>paramycoides</i> | MT875316.1 | 100 % | 99.77 % |
| TRQ67A | OM047166 | <i>Pseudomonas</i> | sp. | DQ977702.1 | 100 % | 97.35 % |
| TRQ24 | MK493680 | <i>Microbacterium</i> | <i>arborescens</i> | JN644505.1 | 99 % | 99.20 % |
| TRQ25 | MK493681 | <i>Acinetobacter</i> | <i>lactucae</i> | CP053391.1 | 99 % | 99.61 % |
| TRM13 | MK493715 | <i>Delftia</i> | sp. | MT101746.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ27A | OM047167 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | KP241046.1 | 100 % | 99.88 % |
| TRQ28A | MN133867 | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | MH168997.1 | 100 % | 99.76 % |
| TRQ29 | MK493682 | <i>Delftia</i> | <i>tsuruhatensis</i> | MT271888.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ30A | OM047168 | <i>Curtobacterium</i> | <i>pusillum</i> | MT487611.1 | 100 % | 98.18 % |
| TRQ69 | ON011078 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | CP020754.1 | 100 % | 88.20 % |
| TRQ70 | MK493708 | <i>Paenibacillus</i> | <i>lautus</i> | LC588571.1 | 99 % | 96.71 % |
| TRQ71 | MK493709 | <i>Microbacterium</i> | <i>oxydans</i> | JQ660100.1 | 100 % | 99.01 % |
| TRQ72 | OM047169 | <i>Stenotrophomonas</i> | sp. | MG818736.1 | 100 % | 99.91 % |
| TRQ73 | MK493710 | <i>Bordetella</i> | <i>hinzii</i> | LC521276.1 | 84 % | 98.22 % |
| TRQ74 | MK493711 | <i>Staphylococcus</i> | <i>sciuri</i> | MK015796.1 | 100 % | 94.12 % |
| TRQ32 | MK493683 | <i>Bacillus</i> | <i>sonorensis</i> | JX237852.1 | 99 % | 99.89 % |
| TRQ33 | OM967032 | <i>Cupriavidus</i> | <i>taiwanensis</i> | LT984801.1 | 96 % | 98.63 % |
| TRQ34 | MK493685 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | MT271890.1 | 97 % | 95.88 % |
| TRQ35A | OM047170 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | MT271890.1 | 100 % | 99.69 % |
| TRQ36 | MK493686 | <i>Bacillus</i> | <i>licheniformis</i> | KR909301.1 | 99 % | 99.26 % |
| TRQ37A | OM047171 | <i>Cupriavidus</i> | <i>neocaledonicus</i> | LT984806.1 | 87 % | 94.10 % |
| TRQ38 | MK493687 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | LC106036.1 | 99 % | 97.93 % |
| TRQ39 | MK493688 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | MK841317.1 | 99 % | 99.49 % |
| TRQ76A | OM047172 | <i>Acinetobacter</i> | <i>calcoaceticus</i> | MT197389.1 | 99 % | 99.50 % |
| TRQ40 | OM047173 | <i>Microbacterium</i> | <i>paraoxydans</i> | MT279337.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ41 | OM047174 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | MK855127.1 | 100 % | 99.89 % |
| TRQ42 | OM047175 | <i>Lysinibacillus</i> | sp. | MH683160.1 | 100 % | 99.49 % |
| TRQ43 | MK493689 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | MK855127.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ44 | MK493690 | <i>Rhizobium</i> | <i>pusense</i> | CP053857.1 | 100 % | 99.89 % |
| TRQ46 | MK493691 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | KJ499779.1 | 98 % | 94.91 % |
| TRQ47 | MK493692 | <i>Bacillus</i> | <i>subtilis</i> | JX126864.1 | 99 % | 95.12 % |

Cuadro 1. Continúa.

| Cepa | Número de acceso NCBI | Género | Especie | Número de acceso de la cepa de referencia | Porcentaje de cobertura (%) | Porcentaje de identidad (%) |
|--------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
| TRQ77 | MK493713 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | MN209840.1 | 100 % | 88.94 % |
| TRQ78 | OM047176 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylooxidans</i> | MK855127.1 | 100 % | 99.78 % |
| TRQ48 | MK493693 | <i>Bacillus</i> | <i>subtilis</i> | JN555584.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ49 | MK493754 | <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> | HQ684014.1 | 99 % | 99.87 % |
| TRQ51 | MK493694 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | CP045551.1 | 100 % | 99.56 % |
| TRQ52 | MK493695 | <i>Pseudomonas</i> | <i>frederiksborgensis</i> | MN865449.1 | 100 % | 99.89 % |
| TRQ90 | OM047177 | <i>Pseudomonas</i> | <i>chlororaphis</i> | KP784660.1 | 99 % | 99.72 % |
| TRQ55A | MK493697 | <i>Achromobacter</i> | sp. | LC133693.2 | 100 % | 99.86 % |
| TRQ56 | MK493698 | <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> | JQ659737.1 | 99 % | 98.73 % |
| TRQ57A | MK493699 | <i>Pseudomonas</i> | <i>extremorientalis</i> | MT348509.1 | 99 % | 99.77 % |
| TRQ58 | MK493700 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | MT124564.1 | 100 % | 97.25 % |
| TRQ59A | MN133852 | <i>Bacillus</i> | <i>amyloliquefaciens</i> | CP054479.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ60 | MK493702 | <i>Pseudomonas</i> | <i>chlororaphis</i> | MT540543.1 | 99 % | 98.23 % |
| TRQ79 | OM964575 | <i>Taifanglania</i> | sp. | KT163397.1 | 98 % | 99.62 % |
| TRQ81 | OM964576 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MT603963.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ82 | OM964577 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MW147622.1 | 78 % | 98 % |
| TRQ83 | OM964578 | <i>Aspergillus</i> | <i>nidulans</i> | MH237626.1 | 99 % | 99.07 % |
| TRQ84 | OM964579 | <i>Penicillium</i> | <i>citrinum</i> | MK281570.1 | 99 % | 99.22 % |
| TRQ85 | OM964580 | <i>Trichoderma</i> | sp. | MK871126.1 | 100 % | 99.62 % |
| TRQ86 | OM964581 | <i>Mortierella</i> | <i>alpina</i> | FJ025187.1 | 98 % | 98.90 % |
| TRQ87 | OM964582 | <i>Penicillium</i> | <i>rubidurum</i> | HQ608058.1 | 98 % | 98.90 % |
| TRQ88 | OM964583 | <i>Albifimbria</i> | <i>verrucaria</i> | MH001947.1 | 99 % | 100 % |
| TRQ89 | OM964584 | <i>Aspergillus</i> | <i>tubingensis</i> | MF135503.1 | 99 % | 99.82 % |
| TRQ90 | OM964585 | <i>Penicillium</i> | <i>rubidurum</i> | HQ608058.1 | 98 % | 99.08 % |
| TRQ91 | OM964586 | <i>Fusarium</i> | <i>chlamydosporum</i> | MK212931.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ92 | OM964587 | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> | MK742795.1 | 97 % | 99.64 % |
| TRQ93 | OM964588 | <i>Trichoderma</i> | sp. | MK871126.1 | 100 % | 99.62 % |
| TRQ94 | OM964589 | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> | MH345952.1 | 98 % | 98.82 % |
| TRQ95 | OM964590 | <i>Clonostachys</i> | <i>rosea</i> | MG748667.1 | 100 % | 98.81 % |
| TRQ96 | OM964591 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MT603963.1 | 100 % | 99.83 % |
| TRQ97 | OM964592 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MT603964.1 | 100 % | 100 % |
| TRQ98 | OM964593 | <i>Mortierella</i> | <i>alpina</i> | MT453274.1 | 100 % | 99.68 % |
| TRQ99 | OM964594 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | MT603963.1 | 100 % | 100 % |

Rasgos promotores del crecimiento vegetal en cepas microbianas aisladas

Solubilización de fosfatos

Este rasgo se ensayó en el medio Pikovskaya suplementado con azul de bromofenol ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$), y fosfato tricálcico como fuente de fosfato insoluble (Pikovskaya, 1948). La composición del medio Pikovskaya era: 10 g L⁻¹ de glucosa; 5 g L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂; 0.5 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; 0.2 g L⁻¹ de NaCl; 0.1 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O; 0.2 g L⁻¹ de KCl; 0.5 g L⁻¹ de extracto de levadura; 0.002 g L⁻¹ de MnSO₄·H₂O; 0.002 g L⁻¹ de FeSO₄·7H₂O; y 15 g L⁻¹

de Agar. Se observó la presencia de un halo blanco/transparente alrededor de la cepa microbiana inoculada (1×10^3 UFC o esporas) tras 7 días de incubación a 28 °C.

Producción de sideróforos

La capacidad de los microorganismos estudiados para producir sideróforos se cuantificó según lo descrito por de los Santos-Villalobos *et al.* (2012), utilizando el medio CAS (Cromo Azurol S). Este medio se preparó combinando cuidadosamente cuatro soluciones, teniendo la siguiente composición. Solución 1: 10 mL de FeCl_3 1 mM (disuelto en HCl 1 mM) y 50 mL de CAS (1.21 mg mL^{-1}) se añadieron a 40 mL de CTAB (1.82 mg mL^{-1}). Solución 2: se disolvieron 30.24 g de PIPES en 750 mL de solución salina (0.3 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de NaCl y 1 g de NH_4Cl), se ajustó el pH a 6.8 con KOH al 50 % y se ajustó el volumen a 800 mL, añadiéndose a continuación 15 g de agar. Solución 3: se disolvieron 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg de MgSO_4 , 11 mg de CaCl_2 , 1.17 mg de MnSO_4 , 1.4 mg de H_3BO_3 , 0.04 mg de CuSO_4 , 1.2 mg de ZnSO_4 y 1 mg de Na_2MoO_4 en 70 mL de agua. Solución 4: se filtraron 30 mL de casaminoácidos al 10 %. Se observó la presencia de un halo coloreado alrededor de la cepa microbiana inoculada (1×10^3 UFC o esporas) tras 10 días de incubación a 28° C. La producción de sideróforos y la solubilización de fosfatos por las cepas microbianas estudiadas se cuantificó mediante el índice (Rojas-Padilla *et al.*, 2020):

$$SI \text{ o } PI = H_1 / H_2$$

SI= índice de solubilización

PI= índice de producción

H_1 = diámetro del halo incluyiendo la colonia microbiana (mm)

H_2 = diámetro de la colonia microbiana (mm)

Producción de indoles

Se inocularon 1×10^3 UFC o esporas de cada cepa microbiana en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 90 mL de Caldo Nutritivo (CN) estéril, suplementado con triptófano (100 mg L^{-1}) a 28 °C durante 5 días, y 120 rpm. Tras el periodo de incubación, el cultivo microbiano se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se mezcló en una proporción de volumen 1:2 con el reactivo de Salkowsky y se incubó durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente (Glickmann y Dessaux, 1995). La cuantificación de los indoles producidos por las cepas microbianas se analizó a 540 nm.

Análisis hemolítico de la sangre

Este ensayo se llevó a cabo utilizando un volumen de 10 μL de cada cepa microbiana a 1×10^6 UFC o esporas mL^{-1} , las cuales fueron inoculadas en cajas Petri conteniendo Agar Columbia suplementado con 5 % de Sangre de Oveja. Después de 3 días de incubación a 28 °C, se categorizó la actividad hemolítica según lo informado por Villa-Rodríguez *et al.* (2019). La hemólisis parcial o α se representó por un cambio de color a

verde oscuro, mientras que la β -hemólisis se observó en una zona clara alrededor de la colonia microbiana (indicando rotura de eritrocitos), y la no alteración sobre el medio (γ -hemólisis) indicó que no había daño a los eritrocitos.

Análisis estadístico

Los datos ($n = 5$) se analizaron mediante análisis unidireccionales de la prueba de varianza (ANOVA), y la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$), utilizando el software Statgraphics Plus v5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de textura, materia orgánica del suelo y pH no mostraron diferencias significativas entre las zonas comerciales de trigo estudiadas. La textura observada para los suelos colectados en todas las zonas estudiadas fue arcillosa, la cual ha sido reportada previamente en 45 % de los suelos del Valle del Yaqui (Cortés-Jimenez *et al.*, 2009; Verhulst *et al.*, 2011). El contenido de materia orgánica del suelo osciló entre 1.4 % y 1.5 % (sin diferencias significativas), lo que sugiere una actividad biológica media en dichos suelos (Bhat *et al.*, 2017). El valor del pH en las zonas de estudio fue ligeramente alcalino, oscilando entre 7.8 y 8.1 (sin diferencias significativas), lo cual ha sido reportado previamente para suelos agrícolas ubicados en zonas áridas o semiáridas (como el Valle del Yaqui), donde la baja humedad y el limitado lavado de sales y carbonatos incrementan el valor del pH del suelo (Corrales-Maldonado *et al.*, 2014). Además, el análisis químico de los suelos recolectados en todas las zonas estudiadas mostró los siguientes valores medios (sin diferencias significativas) (ppm): N: 11.5, P: 12.5, Mg: 1067.5, K: 3433, Na: 540, Fe: 10.3, Mn: 12.2, Zn: 4, Cu: 0.4 y B: 0.5, que son concentraciones de nutrientes estándar para suelos con prácticas agrícolas intensivas.

Por último, la conductividad eléctrica del suelo mostró una diferencia significativa entre todas las zonas estudiadas, mostrando valores de 0.9 a 6.4 dS m^{-1} , es decir, 0.9 ± 0.1 (zona 1), 1.6 ± 0.3 (zona 2), 2.4 ± 0.2 (zona 3), 3.5 ± 0.4 (zona 4), 4.5 ± 0.1 (zona 5), 5.2 ± 0.1 (zona 6), y 6.4 ± 0.1 1.6 dS m^{-1} (zona 7), lo que puede estar relacionado con la topografía del terreno, las condiciones climáticas, la erosión del suelo, el laboreo, el riego con agua de mala calidad y el uso excesivo de agroinsumos sintéticos (Yan *et al.*, 2015; Medina-García, 2016).

Las conductividades eléctricas elevadas afectan negativamente a las propiedades físicas y químicas de los suelos, así como a su población y diversidad microbiana (Orhan, 2016), debido a una regulación osmótica (Yan *et al.*, 2015). Las plantas interactúan con $\sim 1 \times 10^9$ células microbianas g^{-1} suelo seco y 1×10^5 especies microbianas g^{-1} suelo seco, mostrando la capacidad de transformar la materia orgánica y los nutrientes del suelo, y regular el crecimiento de las plantas y fitopatógenos (Grover *et al.*, 2011; Dohrmann *et al.*, 2012). En consecuencia, los microorganismos tienen un papel importante en los agroecosistemas, y el estudio de la modulación de esas comunidades microbianas por los suelos salinos es una perspectiva de enormes proporciones, ya que el estrés salino representa una de las limitaciones más comunes en la agricultura (Yan *et al.*, 2015).

Es importante informar que varios MPCV mitigan el estrés osmótico de las plantas en suelos salinos (Kumar y Verma, 2018). Con el fin de mejorar el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés salino, los MPCV han desarrollado diversos mecanismos, incluyendo la regulación del flujo de agua mediante el cambio de la arquitectura de la raíz, la modulación de la absorción de iones K^+ y Na^+ , la producción de exopolisacáridos, la producción de compuestos orgánicos volátiles y osmoprotectores, inducción de enzimas de defensa antioxidante, la producción de ACC deaminasa y la expresión de genes de respuesta al estrés, entre otros (Gupta *et al.*, 2022). Por ejemplo, la inoculación de *B. paralicheniformis* TRQ65, una cepa tolerante a la sal, reduce el efecto negativo de la sal sobre el trigo, aumentando la altura del brote en un 24.5 % y la longitud de la raíz en un 136 % en comparación con el tratamiento no inoculado (Ibarra-Villarreal *et al.* 2021). Además, algunos estudios han demostrado que esta cepa contiene genes que toleran condiciones de estrés por salinidad, como *OsmY*, *OpuCC*, *OpuCB* y *OpuCA* (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019).

En este trabajo, encontramos que las zonas comerciales de trigo que tenían 1.6 dS m^{-1} mostraron una población fúngica ($2.59 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$ suelo seco) superior a las otras zonas de estudio (Figura 1A). Además, no se aislaron cepas fúngicas de las zonas con 3.5, 4.5 y 5.2 dS m^{-1} (Figura 1A). Los suelos con 1.6 dS m^{-1} se consideran no salinos (estrés abiótico muy bajo) (Bronicka *et al.*, 2007). La estrategia metabólica más importante de los hongos para tolerar este bajo nivel de salinidad es el uso de solutos compatibles, que generan un equilibrio en la presión osmótica ambiental por la acumulación de moléculas orgánicas (glicerol) que ayudan a mantener bajas las concentraciones

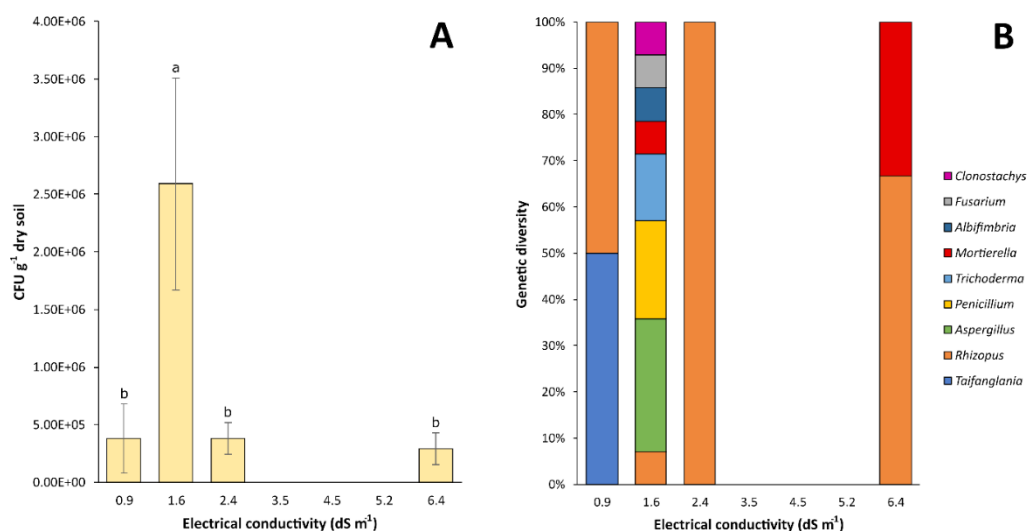


Figura 1. Comunidades de hongos cultivables en siete zonas comerciales de trigo en el Valle del Yaqui, bajo diferentes niveles de conductividad eléctrica del suelo. A: población de hongos cultivables; B: diversidad genética de las cepas fúngicas obtenidas (basada en la secuenciación del gen 5.8S ARNr). Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

salinas intracelulares (Perl *et al.*, 2017). Sin embargo, la eficacia de esta estrategia metabólica depende de los antecedentes genéticos de cada cepa fúngica. Así, basándonos en la secuenciación del gen 5.8S ARNr, los géneros fúngicos más abundantes fueron *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Figura 1B). *Rhizopus* tiene una gran variabilidad de estilos de vida y hábitats debido a su capacidad para utilizar una amplia gama de fuentes de carbono y tolerancia al estrés osmótico y térmico (Meussen *et al.*, 2012; Kaerger *et al.*, 2015). Además, se ha reportado como un agente de biocontrol contra *Fusarium*, el agente causal del tizón de la espiga del trigo (Mullenborn *et al.*, 2008). Por otro lado, *Penicillium* es uno de los hongos más comunes que se encuentran en ambientes extremos (salinidad, temperatura, agua y pH), donde su función en la naturaleza es la descomposición de materiales orgánicos (Yadav *et al.*, 2018). *Aspergillus* se encuentra en alimentos en mal estado, granos almacenados, frutos secos y especias; este género generalmente crece a temperaturas más altas o actividades de agua más bajas y produce esporas que a menudo son más resistentes a la luz y a los productos químicos que *Penicillium* (Pitt y Hocking, 2009).

Del mismo modo, las zonas comerciales de trigo con 1.6 dS m⁻¹ mostraron una población bacteriana más elevada (2.88×10^7 UFC g⁻¹ de suelo seco) que las demás zonas evaluadas (Figura 2A). El género más abundante y bien distribuido (en todas las zonas de estudio) fue *Bacillus* (Figura 2B), el cual tiene un mayor fondo genético y metabólico involucrado en la producción de antibióticos, metabolitos antimicrobianos y antifúngicos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas, inducción de resistencia sistémica en plantas y adaptabilidad a condiciones ambientales extremas (Luna-Martínez *et al.*, 2013; Villa-

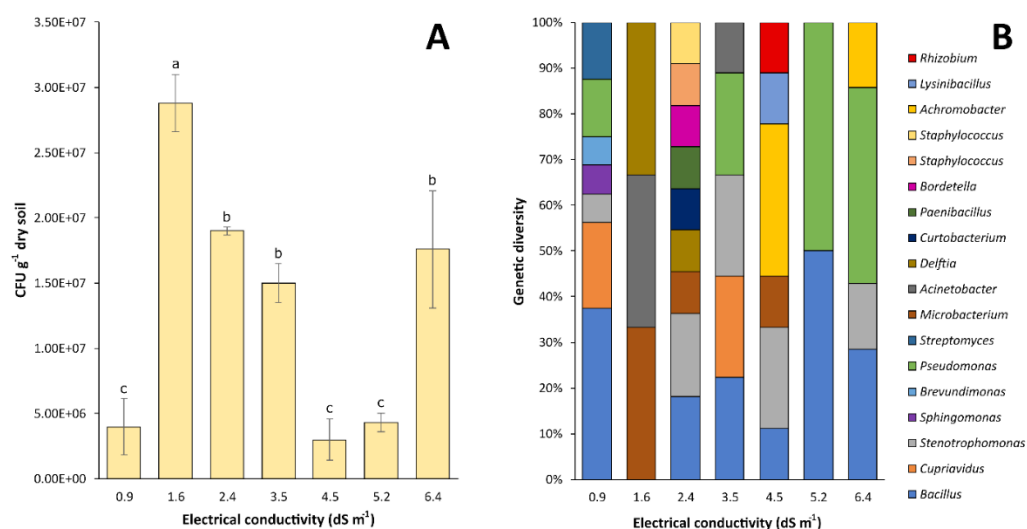


Figura 2. Comunidades bacterianas cultivables en siete zonas comerciales de trigo en el Valle del Yaqui, bajo diferentes niveles de conductividad eléctrica del suelo. A: población de bacterias cultivables; B: diversidad genética de las cepas bacterianas obtenidas (basada en la secuenciación del gen 16S ARNr). Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

rreal-Delgado *et al.*, 2018; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2019; Robles-Montoya *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019; Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). *Bacillus* es la bacteria más ampliamente distribuida en los suelos por su capacidad para formar esporas y tolerar una amplia gama de condiciones ambientales (calor, radiación, productos químicos y pH) (Parvathi *et al.*, 2009).

En todas las zonas estudiadas, la población bacteriana fue superior a la población fúngica (Figura 1A y Figura 2A). De forma similar, Yan *et al.* (2015) han informado de un incremento en la relación bacterias/hongos en suelos salinos. La mayor abundancia de bacterias en comparación con otros microorganismos en suelos salinos puede explicarse por su crecimiento más rápido, y su capacidad para utilizar una amplia gama de sustratos de carbono y nitrógeno (Calvo-Vélez *et al.*, 2008). Además, las bacterias tienen varias estrategias de adaptación para combatir las condiciones salinas, como i) la acumulación de solutos (KCl) en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo (Ramírez *et al.* 2006), y ii) la exclusión de sales del citoplasma para sintetizar y/o acumular solutos que no interfieran con la actividad enzimática (Oren, 2008).

Para identificar MPCV prometedores, las cepas bacterianas y fúngicas obtenidas se caracterizaron *in vitro* por sus rasgos promotores del crecimiento vegetal, como la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos e indoles. En este estudio, el 36 % de las cepas bacterianas mostraron la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles. Tales bacterias pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Stenotrophomonas* (Cuadro 2). Se ha reportado que una alta diversidad de especies

Cuadro 2. Rasgos metabólicos de cepas bacterianas aisladas de las zonas de estudio en el Valle del Yaqui, agrupadas por la conductividad eléctrica del suelo.

| Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹) | Cepa | Género | Especie | Solubilización de fósforo (PI)* | Producción de sideróforos (SI)* | Producción de indoles (µg mL ⁻¹)* | Hemólisis |
|---|--------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|-----------|
| 0.9 | TRQ15A | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | -- ~ | -- | 14.0 ± 1.7 d | γ |
| | TRQ15 | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | 1.4 ± 0.1 ab | -- | 9.3 ± 0.9 d | γ |
| | TRQ16 | <i>Cupriavidus</i> | <i>alkaliphilus</i> | -- | -- | 1.8 ± 0.2 e | β |
| | TRQ17 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>indicatrix</i> | -- | 1.1 ± 0.0 a | 1.2 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ18 | <i>Sphingomonas</i> | sp. | -- | -- | 3.0 ± 0.7 e | γ |
| | TRQ19 | <i>Brevundimonas</i> | <i>vesicularis</i> | -- | -- | 3.6 ± 0.9 e | γ |
| | TRQ20A | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | -- | -- | 5.3 ± 0.5 de | α |
| | TRQ21 | <i>Streptomyces</i> | <i>galilaeus</i> | 1.2 ± 0.0 b | -- | 38.9 ± 7.1 c | α |
| | TRQ22 | <i>Streptomyces</i> | <i>galilaeus</i> | 1.4 ± 0.0 b | -- | 17.4 ± 2.1 d | γ |
| | TRQ61 | <i>Cupriavidus</i> | <i>alkaliphilus</i> | -- | -- | 1.5 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ62A | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | -- | -- | 3.2 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ63 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | -- | -- | 5.6 ± 0.2 e | β |
| | TRQ64 | <i>Cupriavidus</i> | <i>taiwanensis</i> | -- | -- | 1.5 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ65 | <i>Bacillus</i> | <i>paralicheniformis</i> | 1.4 ± 0.1 b | -- | 39.3 ± 1.7 c | γ |
| | TRQ66A | <i>Bacillus</i> | <i>paramycoides</i> | -- | 1.5 ± 0.1 a | 46.1 ± 2.6 ab | γ |
| | TRQ67A | <i>Pseudomonas</i> | sp. | -- | 1.1 ± 0.1 a | 2.7 ± 0.2 e | γ |

Cuadro 2. Continúa.

| Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹) | Cepa | Género | Especie | Solubilización de fósforo (PI)* | Producción de sideróforos (SI)* | Producción de indoles (µg mL ⁻¹)* | Hemólisis |
|---|--------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|-----------|
| 1.6 | TRQ24 | <i>Microbacterium</i> | <i>arborescens</i> | -- | -- | 2.1 ± 0.1 e | β |
| | TRQ25 | <i>Acinetobacter</i> | <i>lactucae</i> | 1.3 ± 0.1 b | -- | 52.7 ± 2.9 ab | γ |
| | TRM13 | <i>Delftia</i> | sp. | -- | -- | 2.1 ± 0.2 e | γ |
| 2.4 | TRQ27A | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | 1.3 ± 0.1 b | -- | 6.0 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ28A | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | 1.3 ± 0.0 b | -- | 2.2 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ29 | <i>Delftia</i> | <i>tsuruhatensis</i> | 1.2 ± 0.1 b | 1.5 ± 0.0 a | 72.1 ± 4.1 a | γ |
| | TRQ30A | <i>Curtobacterium</i> | <i>pusillum</i> | 1.6 ± 0.0 b | -- | 2.2 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ69 | <i>Bacillus</i> | <i>thuringiensis</i> | 1.2 ± 0.0 b | -- | 1.5 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ70 | <i>Paenibacillus</i> | <i>lautus</i> | -- | 1.1 ± 0.0 a | 2.1 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ71 | <i>Microbacterium</i> | <i>oxydans</i> | -- | -- | 4.6 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ72 | <i>Stenotrophomonas</i> | sp. | -- | -- | 8.6 ± 0.1 d | γ |
| | TRQ73 | <i>Bordetella</i> | <i>hinzii</i> | -- | -- | 1.9 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ74 | <i>Staphylococcus</i> | <i>sciuri</i> | -- | -- | 8.6 ± 0.2 d | γ |
| 3.5 | TRQ32 | <i>Bacillus</i> | <i>sonorensis</i> | -- | -- | 1.6 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ33 | <i>Cupriavidus</i> | <i>taiwanensis</i> | -- | -- | 1.6 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ34 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | -- | 1.1 ± 0.0 a | 4.2 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ35A | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | 1.8 ± 0.2 a | -- | 3.9 ± 0.3 e | γ |
| | TRQ36 | <i>Bacillus</i> | <i>licheniformis</i> | 1.3 ± 0.1 b | -- | 2.1 ± 0.2 e | γ |
| | TRQ37A | <i>Cupriavidus</i> | <i>neocaledonicus</i> | -- | -- | 2.2 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ38 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | -- | 1.7 ± 0.1 a | 3.3 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ39 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | -- | -- | 3.1 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ76A | <i>Acinetobacter</i> | <i>calcoaceticus</i> | 1.5 ± 0.1 ab | -- | 2.6 ± 0.1 e | γ |
| 4.5 | TRQ40 | <i>Microbacterium</i> | <i>paraoxydans</i> | -- | -- | 13.4 ± 1.0 d | γ |
| | TRQ41 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | 1.5 ± 0.1 ab | -- | 3.0 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ42 | <i>Lysinibacillus</i> | sp. | -- | -- | 12.2 ± 1.7 d | α |
| | TRQ43 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | 1.3 ± 0.0 b | -- | 1.5 ± 0.17 e | γ |
| | TRQ44 | <i>Rhizobium</i> | <i>pusense</i> | 1.3 ± 0.1 b | 1.0 ± 0.0 a | 5.2 ± 0.5 e | γ |
| | TRQ46 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | -- | -- | 1.9 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ47 | <i>Bacillus</i> | <i>subtilis</i> | -- | -- | 37.8 ± 1.1 c | γ |
| | TRQ77 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | 1.3 ± 0.1 b | 1.6 ± 0.0 a | 1.4 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ78 | <i>Achromobacter</i> | <i>xylosoxidans</i> | -- | -- | 5.3 ± 0.2 e | γ |
| 5.2 | TRQ48 | <i>Bacillus</i> | <i>subtilis</i> | -- | 1.8 ± 0.8 a | 2.3 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ49 | <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> | 1.3 ± 0.1 b | -- | 3.2 ± 0.0 e | β |
| | TRQ51 | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | -- | -- | 4.5 ± 0.1 e | α |
| | TRQ52 | <i>Pseudomonas</i> | <i>frederiksbergensis</i> | 1.4 ± 0.0 ab | -- | 3.7 ± 0.1 e | γ |
| 6.4 | TRQ90 | <i>Pseudomonas</i> | <i>chlororaphis</i> | -- | 1.2 ± 0.0 a | 3.1 ± 0.1 e | β |
| | TRQ55A | <i>Achromobacter</i> | sp. | -- | -- | 2.5 ± 0.0 e | γ |
| | TRQ56 | <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> | -- | 1.2 ± 0.0 a | 48.9 ± 2.5 ab | γ |
| | TRQ57A | <i>Pseudomonas</i> | <i>extremorientalis</i> | 1.6 ± 0.1 ab | -- | 2.1 ± 0.1 e | γ |
| | TRQ58 | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>maltophilia</i> | 1.3 ± 0.1 b | 1.3 ± 0.0 a | 7.8 ± 0.2 de | γ |
| | TRQ59A | <i>Bacillus</i> | <i>amyloliquefaciens</i> | 1.4 ± 0.1 ab | -- | 2.5 ± 0.3 e | β |
| TRQ60 | <i>Pseudomonas</i> | <i>chlororaphis</i> | -- | 2.3 ± 0.1 a | 2.1 ± 0.1 e | γ | |

*Letras diferentes indican una diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$);
(--): prueba negativa.

bacterianas pueden solubilizar fosfatos inorgánicos insolubles, tales como fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatitas y roca fosfórica (Goldstein, 1986), las cuales han sido reportadas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (El-Azouni, 2008; Ahemad y Kibret, 2014).

Además, 23 % de las cepas fúngicas fueron capaces de solubilizar fósforo, por ejemplo, *Taifanglania*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* (Cuadro 3). Estos géneros han sido reportados como solubilizadores de fosfato dominantes en la rizosfera (Alam *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2016). La bacteria y el hongo que más fosfato solubilizaron fueron *Pseudomonas putida* TRQ35A (1.83) y *Albifimbria verrucaria* TRQ88 (2.4), respectivamente.

La solubilización del fosfato es un importante mecanismo de promoción del crecimiento microbiano en suelos alcalinos (Hernández-Leal *et al.*, 2011) porque el fósforo es insoluble en estas condiciones, pero está implicado en varias funciones microbianas y vegetales, como la respiración, la fotosíntesis, la biosíntesis macromolecular, la transferencia de energía y la transducción de señales (Gupta *et al.*, 2015).

De forma similar al fósforo, el hierro es un elemento esencial para el desarrollo de microorganismos y plantas, como cofactor de enzimas (Gupta *et al.*, 2015). Entonces, los

Cuadro 3. Rasgos metabólicos de cepas fúngicas aisladas de las zonas de estudio en el Valle del Yaqui, agrupadas por la conductividad eléctrica del suelo.

| Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹) | Cepa | Género | Especie | Solubilización de fósforo (PI)* | Producción de sideróforos (SI)* | Producción de indoles (µg mL ⁻¹)* | Hemólisis |
|---|-------|---------------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|-----------|
| 0.9 | TRQ79 | <i>Taifanglania</i> | sp. | -- | -- | 5.9 ± 1.1 b | γ |
| | TRQ81 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | -- | -- | 3.3 ± 0.5 bc | α |
| | TRQ82 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | -- | -- | 2.8 ± 0.2 c | α |
| | TRQ83 | <i>Aspergillus</i> | <i>nidulans</i> | 1.1 ± 0.0 a | -- | 2.9 ± 0.0 c | γ |
| | TRQ84 | <i>Penicillium</i> | <i>citrinum</i> | -- | -- | 4.7 ± 0.9 b | α |
| | TRQ85 | <i>Trichoderma</i> | sp. | -- | 1.2 ± 0.0 | 3.3 ± 0.3 bc | γ |
| | TRQ86 | <i>Mortierella</i> | <i>alpina</i> | -- | -- | 3.3 ± 0.4 bc | γ |
| | TRQ87 | <i>Penicillium</i> | <i>rubidurum</i> | 1.2 ± 0.1 a | -- | 3.5 ± 0.1 bc | γ |
| 1.6 | TRQ88 | <i>Albifimbria</i> | <i>verrucaria</i> | 2.4 ± 1.3 a | -- | 6.7 ± 0.9 b | α |
| | TRQ89 | <i>Aspergillus</i> | <i>tubingensis</i> | -- | -- | 7.0 ± 0.9 b | γ |
| | TRQ90 | <i>Penicillium</i> | <i>rubidurum</i> | 1.3 ± 0.0 a | -- | 1.5 ± 0.0 c | β |
| | TRQ91 | <i>Fusarium</i> | <i>chlamydosporum</i> | -- | -- | 4.0 ± 0.1 bc | α |
| | TRQ92 | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> | -- | -- | 4.6 ± 0.3 bc | β |
| | TRQ93 | <i>Trichoderma</i> | sp. | -- | -- | 11.0 ± 3.3 a | γ |
| | TRQ94 | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> | -- | -- | 4.6 ± 0.9 bc | γ |
| | TRQ95 | <i>Clonostachys</i> | <i>rosea</i> | -- | -- | 3.9 ± 0.8 bc | α |
| 2.4 | TRQ96 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | 1.2 ± 0.0 a | -- | 3.6 ± 0.5 bc | α |
| | TRQ97 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | -- | -- | 8.1 ± 0.9 b | γ |
| 6.4 | TRQ98 | <i>Mortierella</i> | <i>alpina</i> | -- | -- | 2.1 ± 0.1 c | γ |
| | TRQ99 | <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae</i> | -- | -- | 3.0 ± 0.0 bc | α |

*Letras diferentes indican una diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$);
(--): prueba negativa.

microorganismos producen sideróforos -compuestos quelantes de bajo peso molecular- que ayudan a promover el crecimiento de las plantas y la inhibición de fitopatógenos mediante el secuestro de hierro (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018a). La producción de sideróforos se detectó en el 19 % de las cepas bacterianas estudiadas, siendo *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* las que mostraron una mayor producción de sideróforos; *Pseudomonas chlororaphis* TRQ60 mostró hasta un índice de 2.3 (Cuadro 2). En cuanto a las cepas fúngicas, sólo la *Trichoderma* sp. TRQ85 mostró capacidad para producir sideróforos, un índice de 1.2 (Cuadro 3). En cuanto a la producción de indoles, todas las cepas microbianas estudiadas fueron capaces de producir esta fitohormona entre 1.2 y 72.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (utilizando triptófano como precursor). *Delftia tsuruhatensis* TRQ29 mostró la capacidad de producir la mayor concentración de indol, 72.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguida de cepas del género *Bacillus* (~ 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Cuadro 2). Las cepas fúngicas mostraron una baja producción de este compuesto, siendo *Trichoderma* sp. TRQ93 el mayor productor de indoles, con 11.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 3). Los indoles son las hormonas vegetales más comunes, que intervienen en la regulación de la superficie y la longitud de la raíz; por lo tanto, las plantas inoculadas con microorganismos productores de indoles tienen una mayor absorción de nutrientes del suelo, elongación celular, división celular y diferenciación celular (Glick, 2012; Kumla *et al.*, 2014; Fu *et al.* 2015).

Por último, la prueba de hemólisis ayuda a conocer el impacto potencial de estas cepas microbianas en la salud animal y humana. En este estudio, 83 % de las cepas bacterianas (Cuadro 2) y 52 % de las cepas fúngicas (Cuadro 3) mostraron la capacidad de producir γ -hemólisis, lo que indica que esos microorganismos no causan ninguna alteración en los eritrocitos del medio de cultivo y, por lo tanto, no son perjudiciales para el ser humano ni para los animales. Sin embargo, el resto de cepas microbianas mostraron riesgos potenciales para la salud (α - o β -hemólisis), degradando los eritrocitos (total o parcialmente) (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). La evolución de la hemólisis microbiana, con el único propósito de lisar glóbulos rojos *in vivo* para mejorar el crecimiento, es altamente improbable. Por lo tanto, es necesario desarrollar varios ensayos específicos y detallados para garantizar que la aplicación de estas cepas no es un reservorio de patógenos humanos, animales o vegetales o microorganismos dañinos, incluso cuando mejoran la fertilidad del suelo y la producción de alimentos.

CONCLUSIONES

La salinidad impacta negativamente a la población y diversidad de bacterias y hongos en suelos de campos comerciales de trigo en el Valle del Yaqui, México. *Bacillus* y *Rhizopus* fueron los géneros microbianos más abundantes y bien distribuidos en el gradiente de suelos salinos estudiados. Además, se observó que el efecto de la salinidad sobre la diversidad bacteriana y fúngica y su fondo metabólico no fue específico de especie o género, mostrando que fue a nivel cepa específica. Estos hallazgos sugieren futuros enfoques experimentales en el contexto de importantes temas ecológicos y de sustentabilidad a ser abordados, tales como i) la resiliencia del Valle del Yaqui a

los suelos salinos para anticipar la degradación biológica suelo/ambiente en términos de diversidad bacteriana funcional y/o genética; y ii) el desarrollo de alternativas sustentables para mitigar los impactos negativos de los suelos salinos en el rendimiento y calidad del trigo. Finalmente, dado que los microorganismos ayudan a las plantas a tolerar la salinidad, es importante identificar microorganismos prometedores que promuevan el crecimiento vegetal para mejorar la productividad de los cultivos bajo esta condición de estrés abiótico, sin generar un impacto negativo en la salud animal y humana. Este estudio proporciona una colección de cultivos microbianos que tienen varios rasgos benéficos que necesitan ser estudiados en el futuro para su aplicación al cultivo de trigo bajo condiciones de suelos salinos para incrementar su rendimiento y calidad en el Valle del Yaqui (y otros agroecosistemas con suelos salinos en todo el mundo) mediante el uso de prácticas agrícolas sustentables.

AGRADECIMIENTOS

Sergio de los Santos-Villalobos, primer autor de esta investigación, agradece el apoyo dado por el CONACyT a través de los Proyectos 1774, y 257246 y el Proyecto PROFAPI ITSON 2023_002. Los autores Arlett L. Ibarra Villarreal CVU 479660, Jonathan Rojas Padilla CVU 262903, Luis Abraham Chaparro-Encinas CVU 292582, Alondra M. Díaz Rodríguez CVU 908966 y Valeria Valenzuela Ruiz CVU 712969 dan las gracias al CONACyT por la beca otorgada para realizar sus estudios de posgrado.

REFERENCIAS

- Ahemad M, Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University* 26 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alam S, Khalil S, Ayub N, Rashid M. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology* 4 (4): 454–458.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Annunziata MG, Ciarmiello LF, Woodrow P, Maximova E, Fuggi A, Carillo P. 2017. Durum wheat roots adapt to salinity remodeling the cellular content of nitrogen metabolites and sucrose. *Frontiers in Plant Science* 7: 2035. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02035>
- Bhat NA, Riar A, Ramesh A, Iqbal S, Sharma MP, Sharma SK, Bhullar GS. 2017. Soil biological activity contributing to phosphorus availability in vertisols under long-term organic and conventional agricultural management. *Frontiers in Plant Science* 8: 1523. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01523>
- Bronicka M, Raman A, Hodgkins D, Nicol H. 2007. Abundance and diversity of fungi in a saline soil in central-west New South Wales, Australia. *Syndowia* 59 (1): 7–24.
- Calvo-Vélez P, Reymundo-Meneses L, Zúñiga-Dávila D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* 7 (1–2): 141–148.
- Córdova-Bautista Y, Rivera-Cruz MC, Ferrera-Cerrato R, Obrador-Olán JJ, Córdova-Ávalos V. 2009. Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar 'Gran enano' y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia* 25 (3): 253–265.
- Corrales-Maldonado C, Vargas-Arispuro S, Vallejo-Cohen, S., Martínez-Télez M. 2014. Deficiencia de azufre en suelos cultivables y su efecto en la productividad. *Biotecnía* 16 (1): 38–44. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i1.32>

- Cortés-Jimenez JM, Troyo-Diéguéz E, Murillo-Amador B, García-Hernández JL, Garatuza-Payan J, Suh Lee S. 2009. Índices de calidad del agua del acuífero del Valle del Yaqui, Sonora. *Terra Latinoamericana* 27 (2): 133–141.
- de los Santos-Villalobos S, Barrera-Galicia GC, Miranda-Salcedo MA, Peña-Cabriales JJ. 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (8): 2615–2623. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1071-9>
- de los Santos-Villalobos S, Díaz-Rodríguez AM, Ávila-Mascareño MF, Martínez-Vidales AD, Parra-Cota FI. 2021. Colmena: A culture collection of native microorganisms for harnessing the agro-biotechnological potential in soils and contributing to food security. *Diversity* 13 (8): 337. <https://doi.org/10.3390/d13080337>
- de los Santos-Villalobos S, Guzmán-Ortiz DA, Gómez-Lim MA, Délano-Frier JP, de-Folter S, Sánchez-García P, Peña-Cabriales, JJ. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control* 64 (1): 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.006>
- de los Santos-Villalobos S, Kremer JM, Parra-Cota FI, Hayano-Kanashiro AC, García-Ortega LF, Gunturu SK, Peña-Cabriales JJ. 2018a. Draft genome of the fungicidal biological control agent *Burkholderia anthina* strain XXVI. *Archives of Microbiology* 200 (5): 803–810. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1490-6>
- de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota F, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragón B, Estrada-Mora JC. 2018b. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9 (1): 191–202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- de los Santos-Villalobos S, Robles-Montoya RI, Parra-Cota FI, Larsen J, Lozano P, Tiedje JM. 2019. *Bacillus cabiralesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (12): 3939–3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>
- Díaz-Rodríguez A, Parra-Cota FI, Santoyo G, de los Santos-Villalobos S. 2019. Chlorothalonil tolerance of indole producing bacteria associated to wheat (*Triticum turgidum* L.) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *Ecotoxicology* 28 (5): 569–577. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02053-x>
- Dohrmann AB, Küting M, Jünemann S, Jaenicke S, Schlüter A, Tebbe CC. 2012. Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt- and conventional maize varieties. *The ISME Journal* 7 (1): 37–49. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.77>
- Egamberdieva D, Wirth S, Bellingrath-Kimura SD, Mishra J, Arora NK. 2019. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology* 10: 2791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>
- El-Azouni I. 2008. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Journal of Applied Sciences Research* 4 (6): 592–598.
- Elias F, Woyessa D, Muleta D. 2016. Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology* 2016 (3): 5472601. <https://doi.org/10.1155/2016/5472601>
- Flowers TJ. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55 (396): 307–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh003>
- Foolad MR. 2004. Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76 (2): 101–119. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000007308.47608.88>
- Fu SF, Wei JY, Chen HW, Liu YY, Lu HY, Chou JY. 2015. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling and Behavior* 10 (8): e1048052. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Glick BR. 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* 12: 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2): 793–796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>
- Goldstein AH. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture* 1 (2): 51–57. <https://doi.org/10.1017/S0889189300000886>
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (5): 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
- Gupta A, Bano A, Rai S, Mishra R, Singh M, Sharma S, Pathak N. 2022. Mechanistic insights of plant-microbe interaction towards drought and salinity stress in plants for enhancing the agriculture productivity. *Plant Stress* 4: 100073. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100073>
- Gupta G, Singh P, Kumar N, Kumar S, Singh V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 7 (2): 96–102. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
- Hernández-Leal TI, Carrión G, Heredia G. 2011. Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia* 45: 881–892.
- Ibarra-Villarreal AL, Gándara-Ledezma A, Godoy-Flores AD, Herrera-Sepúlveda A, Díaz-Rodríguez AM, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2021. Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). *Journal of Arid Environments* 186: 104399. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>
- Ibekwe AM, Ors S, Ferreira JFS, Liu X, Suarez DL. 2017. Seasonal induced changes in spinach rhizosphere microbial community structure with varying salinity and drought. *Science of The Total Environment* 579: 1485–1495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.151>
- Kaerger K., Schwartze VU, Dolatabadi S, Nyilasi I, Kovács SA, Binder U, Papp T, Hoog S, Jacobsen ID, Voigt K. 2015. Adaptation to thermotolerance in *Rhizopus* coincides with virulence as revealed by avian and invertebrate infection models, phylogeny, physiological and metabolic flexibility. *Virulence* 6 (4): 395–403. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1029219>
- Kumar A, Verma JP. 2018. Does plant-microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? *Microbiological Research* 207: 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>
- Kumla J, Suwannarach N, Bussaban B, Matsui K, Lumyong S. 2014. Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand. *Annals of Microbiology* 64 (2): 707–720. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0706-x>
- Luna-Martínez L, Martínez-Peniche RA, Hernández-Iturriaga M, Arvizu-Medrano SM, Pacheco-Aguilar JR. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (1): 63–69.
- Matson P, Jewett P. 2012. Ecosystems and land-use change in the Yaqui Valley: Does Agricultural intensification “spare land for nature”? In *Seeds of Sustainability*. Matson P. (ed.) Island Press: Washington, DC, USA, pp: 7–62.
- Medina-García LR. 2016. La agricultura, la salinidad y los hongos micorrízicos arbusculares: una necesidad, un problema y una alternativa. *Cultivos Tropicales* 37 (3): 42–49. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1117.9765>
- Meussen B, Weusthuis R, Sanders J, Graaff L. 2012. Production of cyanophycin in *Rhizopus oryzae* through the expression of a cyanophycin synthetase encoding gene. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 93 (3): 1167–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3604-9>
- Numan M, Bashir S, Khan Y, Mumtaz R, Shinwari Z, Khan AL, Khan A, Al-Harrasi A. 2018. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review. *Microbiological Research* 209 (2018): 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
- Mullenborn C, Steiner U, Ludwing M, Oerke E. 2008. Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. *European Journal of Plant Pathology* 120 (2): 157–166. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9204-y>

- Oren A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4: 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
- Orhan F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian Journal of Microbiology* 47 (3): 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.001>
- Parvathi A, Krishna K, Jose J, Joseph N, Nair S. 2009. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2): 269–275. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200012>
- Pikovskaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17: 362–370.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Aspergillus* and related teleomorphs. In *Fungi and food spoilage*; Pitt J, Hocking A. (eds.). Springer: London, UK, pp: 275–337. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_8
- Porter JR, Semenov MA. 2005. Crop Responses to climatic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360 (1463): 2021–2035. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1752>
- Pulido-Madriral L, González-Meraz J, Wiegand CL, Infante-Reyes J, Delgado JM. 2010. Monitoreo de la salinidad mediante sensores remotos. *Terra Latinoamericana* 28 (1): 15–26.
- Qin Y, Druzhinina I, Pan X, Yuan Z. 2016. Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances* 34 (7): 1245–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.005>
- Ramírez N, Serrano RJ, Sandoval TH. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37 (3): 56–71. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937307>
- Robles-Montoya RI, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* TRQ8, a plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech* 9 (6): 201. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1726-4>
- Rojas-Padilla J, Chaparro-Encinas LA, Robles-Montoya RI, de los Santos-Villalobos S. 2020. Growth promotion in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) by co-inoculation of native *Bacillus* strains isolated from the Yaqui Valley, Mexico. *Nova Scientia* 12: 24. <https://doi.org/10.21640/ns.v12i24.2136>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2011. *Agronomía del Trigo en el Sur de Sonora*. Libro Técnico No. 6. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México, México.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2015. *Manual técnico de muestreo de productos agrícolas y fuentes de agua para la determinación de contaminantes microbiológicos*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Ciudad de México, México. <http://www.cesavep.org/descargas/PIA/MANUAL03.pdf> (Retrieved: September 2022).
- Shafi M, Bakht J, Guoping Z, Khan MA, Islam EU, Khan MD. 2010. Effect of cadmium and salinity stresses on root morphology of wheat. *Pakistan Journal of Botany* 42 (4): 2747–2754.
- Sharma S, Kulkarni J, Jha B. 2016. Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Frontiers in Microbiology* 7: 1600. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01600>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. *Atlas agroalimentario 2012-2018*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México, México. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018 (Retrieved: September 2022)
- Perl T, Kis-Papo T, Nevo E. 2017. Fungal biodiversity in the hypersaline dead sea: extinction and evolution. *Biological Journal of the Linnean Society* 121: 122–132. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blw025>

- Upadhyay S, Singh D. 2014. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biology* 17 (19): 288–293. <https://doi.org/10.1111/plb.12173>
- Valenzuela-Aragon B, Parra-Cota FI, Santoyo G, Arellano-Wattenbarger GL, de los Santos-Villalobos S. 2019. Plant-assisted selection: A promising alternative for *in vivo* identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) growth promoting bacteria. *Plant and Soil* 435: 367–384. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>
- Valenzuela-Ruiz V, Robles-Montoya RI, Parra-Cota FI, Santoyo G, Orozco-Mosqueda M, Rodríguez-Ramírez R, de los Santos-Villalobos S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subs. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech* 9 (11): 436. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1972-5>
- Verhulst N, Carillo-García A, Moeller C, Trethowan R, Sayre K, Govaerts B. 2011. Conservation agriculture for wheat-based cropping systems under gravity irrigation: Increasing resilience through improved soil quality. *Plant and Soil* 340 (1–2): 467–479. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0620-y>
- Villa-Rodríguez E, Lugo-Enríquez C, de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Figueroa-López P. 2016. First report of *Cochliobolus sativus* causing spot blotch on durum wheat (*Triticum durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *Plant Disease* 100 (11): 2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0634-PDN>
- Villa-Rodríguez E, Parra-Cota FI, Castro-Longoria E, López-Cervantes J, de los Santos-Villalobos S. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control* 132: 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez E, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2018. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36 (1): 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wang S, Hou X, Su H. 2017. Exploration of the relationship between biogas production and microbial community under high salinity conditions. *Scientific Reports* 7: 1149. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01298-y>
- Wang X, Yang J, Liu G, Yao R, Yu S. 2015. Impact of irrigation volume and water salinity on winter wheat productivity and soil salinity distribution. *Agricultural Water Management* 149: 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.10.027>
- Yadav AN, Verma P, Kumar V, Sangwan P, Mishra S, Panjari N, Gupta VK, Saxena AK. 2018. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Penicillium system properties and applications*; Gupta VK, Rodriguez-Couto S. (eds.). Elsevier: Amsterdam, Netherlands, pp. 3–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>
- Yan N, Marschner P, Cao W, Zuo C, Qin W. 2015. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research* 3: 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>

SOIL CONDITIONS AND EFFECT OF FERTILIZATION ON THE EMISSION OF GREENHOUSE GASES IN AN ANDEAN COFFEE GRADIENT

Juan Burneo-Valdivieso^{1*}, Daniel Capa-Mora¹, Pablo Ochoa-Cueva¹

¹ Universidad Técnica Particular de Loja. Departamento de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Calle Marcelino Champagnat s/n, Loja, Ecuador. C. P. 1101608.

* Author for correspondence: jiburneo@utpl.edu.ec

ABSTRACT

Coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) is an important agricultural export product in Ecuador, but yields reported at most coffee farms are low. The main reasons for this are a lack of understanding of soil nutritional status and fertilization management, which implies fertilizer misuse and results in gas emissions into the environment. In this study, the soil nutritional status of coffee plantations was evaluated along an altitudinal gradient of the Ecuadorian Andes as an indicator of soil fertilization plans. A total of 471 farmlands were selected and their pH, soil organic matter, and main macronutrients were determined. The impact of soil fertilization on nitrous oxide emissions was evaluated; for this purpose, an experimental coffee farm was chosen where different doses of mineral and organic soil fertilization were tested, and N₂O emissions were determined. The results showed a negative correlation between soil organic matter, pH, and nitrate concentration with altitude. In all altitudinal strata, the nitrate concentration was higher than that of ammonium. In addition, a strong correlation was observed between soil organic matter and soil nitrate concentration. The amount of potassium decreased as altitude increased, whereas medium and high concentrations of available phosphorus were observed in all altitudinal ranges. However, significant statistical differences were found when comparing low mineral fertilization doses to organic fertilization. The N₂O analyses showed that coffee plantations fertilized with mineral fertilizers emit from 300 to 1142 mg N₂O m⁻² into the environment. High mineral fertilization resulted in the highest N₂O emissions, with statistically significant differences when compared to low mineral doses and organic fertilization. Therefore, it was concluded that changes in soil nutritional status were observed along the Andean gradient of coffee plantations in southern Ecuador, and that high doses of mineral fertilizer can have a significant impact on N₂O emissions.

Keywords: altitudinal gradient, coffee fertilization, greenhouse gases, nitrous oxide emission, soil fertility, Ecuadorian Andes.

INTRODUCTION

Coffee, produced basically by the species *Coffea arabica* and *C. canephora*, is an important product of the global economy because of its widespread consumption. Currently, the coffee market is dominated by large producers such as Brazil, Vietnam, and Colombia.

Citation: Burneo-Valdivieso J, Capa-Mora D, Ochoa-Cueva P. 2023. Soil conditions and effect of fertilization on the emission of greenhouse gases in an Andean coffee gradient. *Agrociencia* 57(5): 920-952. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2359

Editor in Chief:

Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: September 08, 2022.

Approved: May 11, 2023.

Published in Agrociencia:

July 31, 2023.

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



In Ecuador, it is one of the most important agricultural export products, with 4917 Mg of coffee beans exported in 2021 (INEC, 2021). Coffee production is second only to banana production in terms of social, economic, and environmental importance, as more than 4 % of the population directly depend on it for a living. It is also a primary source of foreign exchange for both private producers and the government, and is part of the agroecosystem diversity in Ecuador (Ponce-Vaca *et al.*, 2018).

Coffee production in Ecuador has been among the first 20 crops in the last 15 years, with the largest harvested area and production in 23 out of the 24 provinces of the country (INEC, 2021). In 2018, Arabica coffee (*Coffea arabica*) accounted for 68 % of the national production, whereas Robusta coffee (*Coffea canephora*) constituted 32 %. Additionally, 52 % of farmers grow Arabica coffee and 48 % grow Robusta coffee (Venegas-Sánchez *et al.*, 2018). However, most Arabica and Robusta coffee plantations have low production yields, with a value of 0.22 Mg ha⁻¹ (INEC, 2021).

One possible explanation for low coffee yields is that farmers do not adequately fertilize their crops; furthermore; additionally, there is no structured agronomic management program (including pest management, pruning, and replanting). Other problems reported include the advanced age of plantations, successive stumping, high incidence of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) (Martínez-López *et al.*, 2021), and a lack of application of appropriate technologies (Capa-Mora *et al.*, 2015). This, combined with a labor shortage and a drop in international coffee prices, results in low productivity.

Burneo-Valdivieso *et al.* (2017) reported that a problem of low coffee productivity among some coffee growers in southern Ecuador is their weak administrative structure; many coffee associations do not keep records of their partners' data and do not have adequate crop management information. They have low management input practices, which have a significant negative impact on soil nutrients. In brief, some fields are cultivated for several years without the application of manure or fertilizer, followed by leaving the land fallow when soil nutrients are depleted, causing crop yields to drop dramatically (Benavides-Muñoz *et al.*, 2020).

The nutritional status of soil is another indicator of low productivity, which is rarely considered. Its importance is related to quality and productivity, as soil texture, acidity, and pH have a significant influence on some of the cup quality attributes of coffee (Morales-Ramos *et al.*, 2020). Because coffee producers do not use diagnostic techniques such as soil testing, there is a lack of knowledge about crop-limiting factors. Proper diagnosis and sustainable fertilizer recommendations cannot be made without recent information on the fertility characteristics of soils. Coffee is a crop grown under a variety of conditions and is widely cultivated in tropical climates, similar to those found in the southern region of Ecuador (Ochoa *et al.*, 2017).

Ignorance in fertilization plans contributes to another issue related to environmental pollution caused by fertilizer misuse. Fertilization, whether organic or chemical, is an important factor, along with irrigation, since well-managed applications help produce vigorous and healthy plants while also increasing production (Capa-Mora *et al.*, 2015).

However, the widespread use of mineral fertilizers not only contributes to nitrate and phosphate contamination of water and soil, but also has a negative impact on climate change. Chemical fertilizer application accounts for approximately 57 % of the total greenhouse gas emissions from agricultural inputs, mainly from excess nitrogen (N) fertilizer use, and is mostly attributed to N_2O emissions from croplands (Cheng *et al.*, 2011).

For these reasons, the nutritional status of the soil in coffee plantations was evaluated in relation to an altitudinal gradient in the Ecuadorian Andes, characterizing the chemistry of the crop soil and evaluating the impact of soil fertilization on N_2O emissions. This information is key for producers and decision makers to improve the production chain and serves as a reference for other study areas.

MATERIALS AND METHODS

Study area

This study was conducted in the southern region of Ecuador in the provinces of Loja and Zamora Chinchipe, with an approximate area of 21 622 km² located between 3° 45' S and 4° 55' S (latitude), 78° 50' W and 80° 14' W (longitude) (Figure 1). This is an area where the best coffee in the country is produced, according to contests such as “Golden Cup”, and provides favorable conditions for high-quality coffee production (Ochoa *et al.*, 2017).

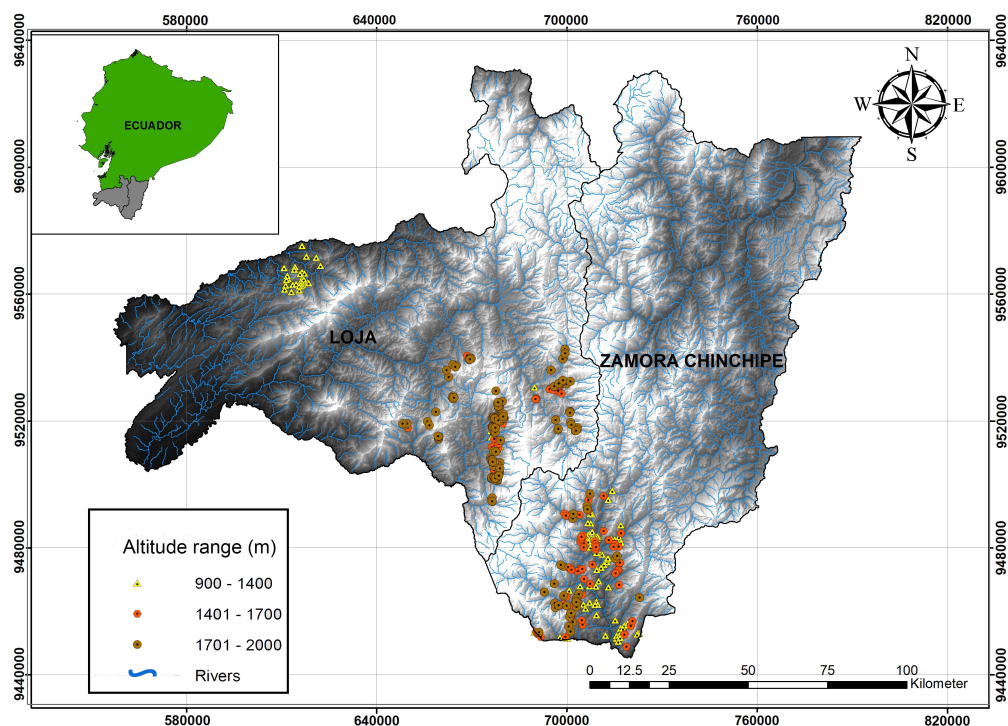


Figure 1. Study area of coffee plantations at various altitudes in southern Ecuador.

Experimental unit and design

To meet the objectives of this study, 471 farms were selected, belonging to five coffee farmer associations with an average farm size between one and three hectares. These associations were: *Productores de Café de Altura del Sudeste de la Provincia de Loja*, *Asociación Agrícola-Artesanal de Productores Orgánicos de la Cuenca del Río Mayo*, *Asociación de Productores Ecológicos Agroartesanales de Café Especial de Loja*, *Asociación Cafeteros Orgánicos de Palanda* and *Asociación de Cafeteros de Altura de Puyango*, all are belonging to the *Federación Regional de Asociaciones de Pequeños Productores de Café Ecológico del Sur Ecuador*.

Three altitudinal ranges were established: the low zone from 900 to 1400 m, the middle zone from 1401 to 1700 m, and the upper zone from 1701 to 2000 m (Figure 1). Loja province has a subtropical-dry climate, with an average annual temperature of 19.4 °C and average annual precipitation of 822 mm. The region is influenced by the Andes mountains, with rains typically falling from December to May, whereas the Zamora Chinchipe province is influenced by tropical easterlies, presenting higher humidity transport from the Amazon Basin (Benavides-Muñoz *et al.*, 2020).

Soil sampling and laboratory analysis

Approximately 500 soil samples were collected throughout the study area. Samples were collected to a depth of 0–30 cm using a borer auger. A composite mineral soil sample was obtained from five subsamples at each study site. The soil samples were collected along an altitudinal sequence that crosses several districts in the Loja and Zamora provinces (Figure 1). Geographical coordinates, altitude, and climatic conditions were also recorded for each study site.

For the determination of chemical soil properties, the samples were air-dried and sieved through a 2 mm mesh size. The pH was measured potentiometrically in deionized water at a 1:2.5 soil-water ratio. Soil organic matter (SOM) was determined by wet oxidation using the Walkley-Black method (Soil Survey Staff, 2011). The determination of NO_3^- was done using colored complexes with brucine acid. Similarly, the determination of NH_4^+ was based on the formation of blue-colored complexes of indophenol. The Bray and Kurtz protocol was used for determining extractable P by the ammonium fluoride method (Bray and Kurtz, 1945). For the determination of inorganic K, extraction with NH_4^+ -Ac solutions was used.

Determination of nitrous oxide (N_2O) emissions

A single experimental farm, located in the province of Loja at an altitude of 2000 m, with a rainfall of 910 mm year⁻¹ and an average temperature of 18 °C, was selected. A one-year-old plantation (*Coffea arabica* L. var. Caturra) with a total area of 2500 m² was designated, and 12 study plots were established using a randomized block experimental design with three replicates per treatment. Fertilization treatments consisted of low inorganic fertilization with 70, 22, and 31 kg NPK ha⁻¹ year⁻¹ and 200, 65, and 62 kg NPK ha⁻¹ year⁻¹; high inorganic fertilization with 225, 65, and 93 kg NPK

ha⁻¹ year⁻¹ and 400, 109, and 187 kg NPK ha⁻¹ year⁻¹; and 3 kg of organic fertilizer plant⁻¹ year⁻¹. The application rates were based on soil analyses and plant requirements.

Nitrous oxide was measured in coffee plantations to compare the emissions of mineral fertilization (high and low doses) and organic fertilization over a year and a half of crop management. The gas sample was collected using the closed chamber method (Capa-Mora *et al.*, 2015), which involved burying a chamber to a depth of 5 cm and tightly sealing it with a lid equipped with a small hole to extract the gas. For each chamber, gas samples were collected every 10 min (1, 11, 21, and 31 min) and immediately transferred into 20 mL pre-evacuated septum-capped glass vials (Vacutainers, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

The samples were analyzed using a gas chromatograph (Shimadzu GC-14B Duisburg, Germany) equipped with a flame ionization detector (FID), an electron capture detector (ECD), and a Porapak Q 80–100 mesh column for N₂O gas (Lofffield *et al.*, 1997). N₂O concentrations were calculated by comparison of integrated peak areas of samples with standard gas (N₂O). The difference in concentrations at the 31st and 1st minute was used to calculate gas fluxes, and N₂O emission rates were calculated by linear interpolation using gas samples from each chamber, with at least three linear points required to validate flux measurements (Koehler *et al.*, 2009).

Statistical analysis

Statistical analysis of the experimental data was performed using the Statistical Professional Social Sciences software (SPSS) 24.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The Kruskal-Wallis test was used on independent samples data ($p < 0.05$). Relationships between different parameters were determined using Spearman's correlation coefficient (r) using a two-tailed test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Soil nutritional status and its relation to the altitudinal gradient

The results for soil pH in the study area ranged from 4 to 7.5 (Figure 2). Statistical analyses revealed significant differences between the medium altitudinal zone (1401–1700 m) and the high altitudinal zone (1701–2000 m). These two, however, did not show statistically significant differences with the low altitudinal zone (900–1400 m) (Table 1).

The pH values in the study area were negatively correlated with altitude ($r = -0.110$, $p < 0.05$), indicating that at higher altitudes, the pH of soils mostly cultivated with coffee tended to be acidified. A similar relationship with a linear decrease was found by De Bauw *et al.* (2016), with pH values of 7.5 at 1000 m and 4.9 at 2200 m. According to these authors, the increase in soil acidity as a function of altitude can be explained by a variety of factors, including greater acidification of the soil at higher altitudes due to more intense leaching (Tables 1 and 2).

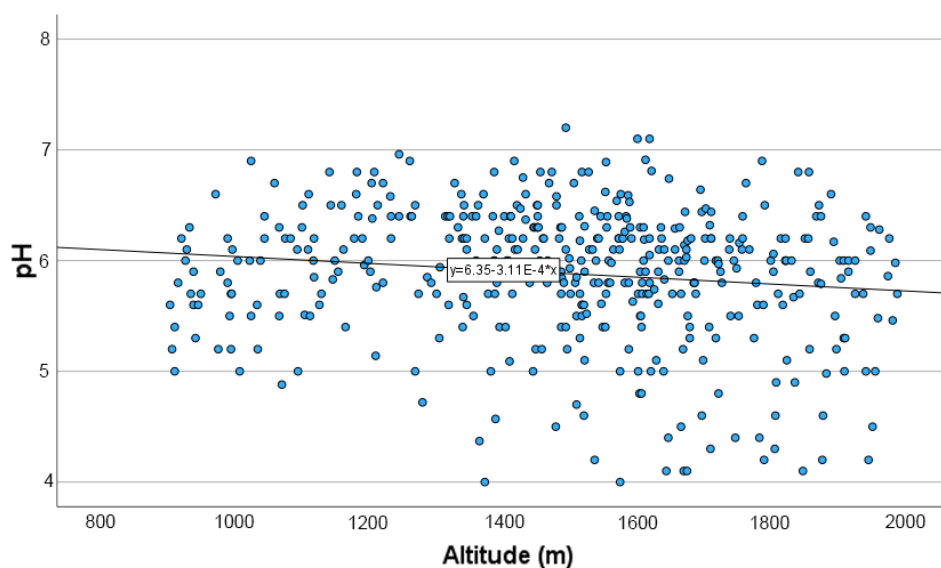


Figure 2. Relationship between soil pH and altitude.

Table 1. Average soil parameters in relation to altitudinal ranges.

| Altitude (m) | pH | SOM (%) | Nitrate | Ammonium (mg kg ⁻¹) | Phosphorus | Potassium |
|--------------------|-----------|-----------|-------------|---------------------------------|-------------|--------------|
| 900–1400 (Low) | 5.9±0.5ab | 2.87±1.1b | 34.26±20.2b | 15.88±11.3a | 46.49±26.8b | 161.8±159.3b |
| 1401–1700 (Medium) | 6.0±0.56b | 2.50±1.0a | 34.26±26.4b | 20.84±18.3b | 37.98±27.5b | 155.8±176.4b |
| 1701–2000 (High) | 5.7±0.66a | 2.33±0.7a | 27.22±22.3a | 14.33±13.9a | 34.80±30.8a | 118.0±153.6a |

Mean values per column with different letters indicate significant differences among altitudes ($p < 0.05$). The standard error is shown next to each mean value. SOM: soil organic matter.

Table 2. Soil analysis interpretation in relation to altitudinal ranges.

| Altitude (m) | pH | SOM* | Nitrate | Ammonium | Phosphorus | Potassium |
|--------------------|---------------|------|---------|----------|------------|-----------|
| 900–1400 (Low) | slightly acid | low | high | high | high | medium |
| 1401–1700 (Medium) | slightly acid | low | high | high | medium | medium |
| 1701–2000 (High) | slightly acid | low | high | high | medium | low |

*SOM: soil organic matter.

Pastor-Mogollón and Martínez (2009) reported similar results in an altitudinal gradient in the Venezuelan Andes, where a decrease in soil pH was observed with altitude, with the highest pH value (6.6) found at 720 m and the lowest value (4.7) found at 1400 m. According to these authors, the low pH values are related to the highest values of precipitation, which are registered in the mountainous region of the Andes in the highest places (Arteaga-Marín *et al.*, 2022), which washes the changeable bases of soil (Jiménez *et al.*, 2007). These studies support our findings in the altitudinal range of 1701–2000 m, where the lowest values of acidity and exchangeable bases, such as potassium, were found. López-Báez *et al.* (2016) found similar trends in the pH behavior with altitude, high precipitation, orographic conditions, and the mineralogical characteristics of geological materials.

The geological substrates of the study area in southern Ecuador are composed of a) Tertiary age sedimentary rocks to the east, b) Quaternary age volcano-sedimentary rocks located northeast, and c) rocks of intrusive magmatic origin (granites and granodiorites) located throughout the provinces that have intruded into the Paleozoic, Cretaceous, and Tertiary rocks. In addition, Wilcke *et al.* (2003) argued that the soils of these areas have Oxisol characteristics, with metamorphic and crystalline rocks as the most outstanding parent materials, which is typical of the final stage of ferralitization (the processes associated with strong weathering that led to the formation of Oxisols or Ferrosols). As a result, these soils are acidic.

Soil acidity may be caused by the accumulation of organic matter on the soil surface because of minimal tillage. However, our results revealed the opposite, namely, a higher degree of soil acidity as a function of the decrease in organic matter in the higher areas, which could be explained by the use of nitrogen fertilizer as well as the inclusion of certain tree species that increase soil acidity (Tully *et al.*, 2013). A local study on mineral and organic fertilization for coffee cultivation (Capa-Mora *et al.*, 2015) reported that any nitrogen contribution (mineral or organic) contributes to soil acidification.

SOM average concentrations in the study area ranged between 2.3 and 2.9 %, with the lowest value (2.3 %) located in the high altitudinal zone (1701–2000 m) and the highest value (2.9 %) in the low altitudinal zone. These results showed significant difference among the low altitudinal zone *versus* the middle and upper zones. However, there were no significant differences between the last two altitudinal zones (Figure 3). A negative correlation with the height ($r = -0.219$, $p < 0.05$) was revealed, indicating that the higher altitude of coffee plantations, less organic matter accumulates. Additionally, this may be due to the needs and characteristics of the crop, which develops in optimal altitude ranges between 1200 and 1600 m.

In the soils of the Ecuadorian highlands, SOM values below 3 % are considered low for all altitudinal ranges (Table 2). Generally, SOM is expected to increase with elevation (De Bauw *et al.*, 2016); however, this trend was not observed in our results, as SOM concentration decreased as altitude increased. This contradiction implies that other factors, not included in this study, such as farmers' management of the cultivation

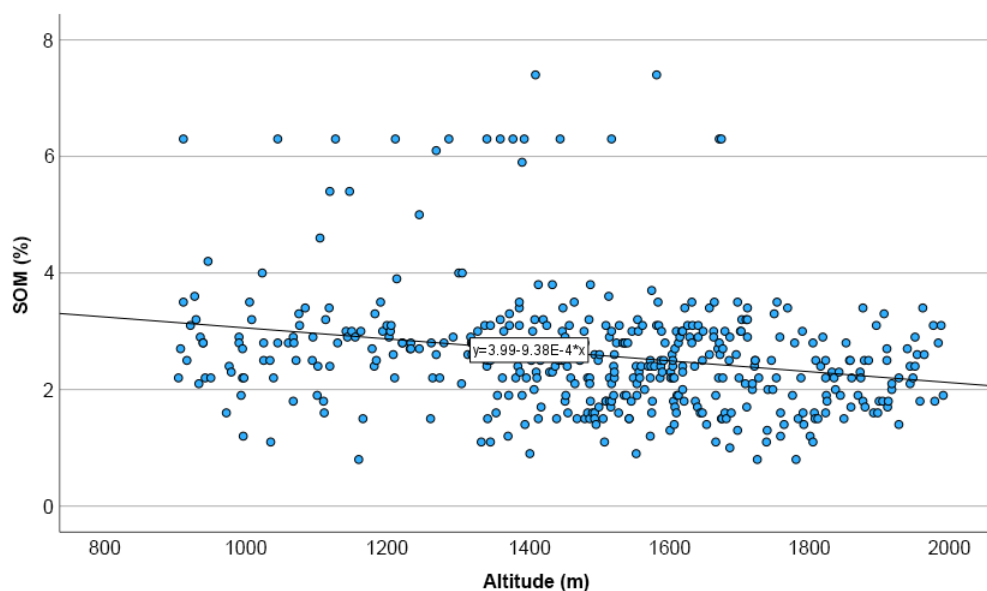


Figure 3. Relationship between soil organic matter SOM concentration (%) and altitude.

system, type of vegetation, soil erosion, and topography, among others (Arteaga-Marín *et al.*, 2022), have an impact on SOM reserves.

SOM and sediment accumulation are often favored by topography (López-Báez *et al.*, 2016; Arteaga-Marín *et al.*, 2022), where SOM is transported to the lowest point in the landscape through runoff processes. This type of erosion may have long-lasting secondary effects on plant growth and litterfall input (Quichimbo *et al.*, 2017). If erosion reduces productivity by limiting replenishment, the amount of SOM may decrease in the long term (Bahr *et al.*, 2013).

Erosion studies in our area show a high to moderate susceptibility, mainly due to climatic and topographic factors (Arteaga-Marín *et al.*, 2022). This could explain why, in this study, a lower SOM concentration was found in high areas than in low areas, possibly due to the high soil erosion risk in the area. The influence of the land relief is determinant in both the SOM quantity and quality, because the characteristics of the soil change with altitude in many cases. Also, precipitation, temperature, and the vegetation type influence the microbial biomass and the microbiological activity in soil (Quichimbo *et al.*, 2017), which is directly related to the SOM concentration. According to Vélez-Mora *et al.* (2022), areas with intensive agricultural activity have the lowest SOM levels. This could explain the tendency of SOM to decrease, depending on the height found in our study. However, the average SOM concentration in the study area is within the appropriate ranges for this crop (> 2 %) (Ochoa *et al.*, 2017).

Alternatively, our results indicate that as the height of the study area increased, the nitrate concentration of the soil decreased ($r = -0.20$, $p < 0.05$). However, no significant difference was observed between the low and medium altitudinal zones, but both showed a significant difference with the higher zone (Figure 4A). Furthermore,

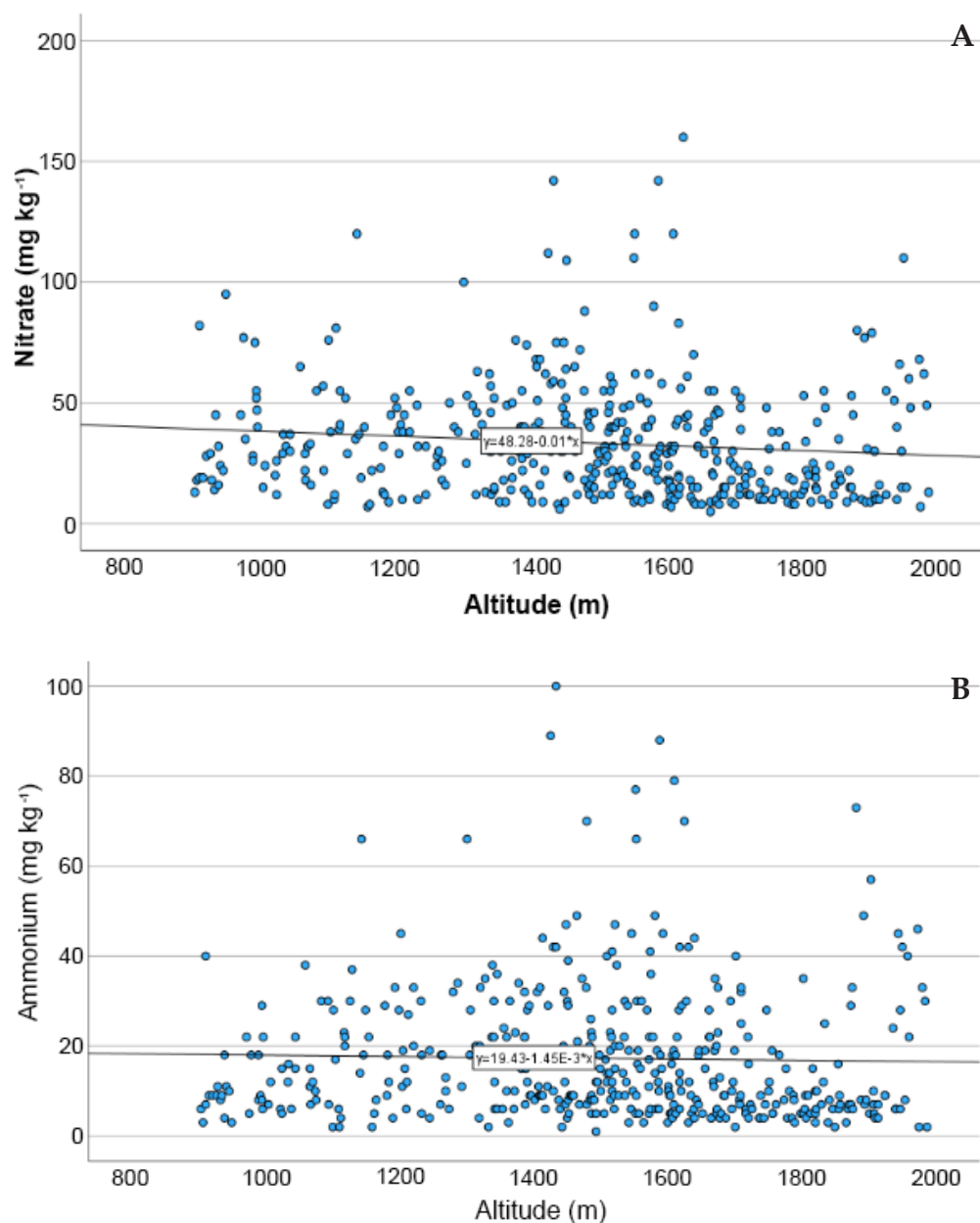


Figure 4. Inorganic forms of nitrogen in relation to altitude. A: nitrate concentration; B: ammonium concentration.

ammonium concentration showed a similar statistical relationship, with statistical differences in the low and high areas in relation to the soil in the medium zone, which contained the highest levels of ammonium (20.84 mg kg⁻¹) (Figure 4B).

Nitrogen forms available to plants, such as nitrate (N-NO₃⁻) and ammonium (N-NH₄⁺), vary depending on environmental factors such as temperature and humidity. Nitrate

concentrations between 20 and 30 mg kg⁻¹ are considered high, while ammoniacal nitrogen concentrations above 10 mg kg⁻¹ are considered high (Table 2). Plant and animal waste degradation in the soil is a biological process in which carbon is recycled to the atmosphere as carbon dioxide, nitrogen is transformed into a usable form by plants as ammonium and nitrate, and other associated elements such as phosphorus, sulfur and several microelements are also transformed (Bahr *et al.*, 2013). This supports our findings as higher altitudes showed less SOM and lower nitrate, ammonium, phosphorus, and potassium concentrations.

In all the altitudinal zones studied, the nitrate concentration was higher than that of ammonium. Also, a strong correlation was observed between SOM and soil nitrate concentration. According to Valarezo-Torres *et al.* (2021), in areas with higher SOM, the addition of organic waste is accompanied by an increase in the microbial population, which requires nitrogen to allow the growth of the microbial biomass. Because plants require nitrogen for growth and the microbial flora reduces its levels, particularly of ammonium, nitrogen availability for nitrifying organisms and plants is reduced.

While Zebarth *et al.* (2015) observed that lowering the soil pH limits soil nitrification and thus soil inorganic N will remain primarily in the NH₄⁺ form, this may explain why in the upper zone (1701–2000 m), where the lowest pH values were present (5.7), a decrease in nitrate was also observed. Meanwhile, the average pH values in the middle zone (1401–1700 m) were 6, with an increase in nitrate concentration. However, it must be emphasized that in all the studied areas, the nitrate values were always higher than those of ammonium. By decreasing the SOM mineralization rates, less inorganic nitrogen is released, resulting in lower ammonium concentrations. This aspect is reflected in our results, since lower values of SOM and ammonium were found in higher areas.

Phosphorus availability was also related to altitudinal range. Results showed that the low SOM concentrations may also influence the low concentrations of other macronutrients at higher altitudes such as phosphorus (P) and potassium (K), since the majority of these nutrients are found in the organic layer of the soil. Therefore, in the lower zone (900–1400 m), where the highest SOM values were found (2.87 %), the highest P and K values were also obtained.

Available phosphorus analysis indicates that values between 20 and 40 mg kg⁻¹ are considered medium, whereas values above 40 mg kg⁻¹ are considered high. In the middle and high zones studied, medium phosphorus concentrations were observed, whereas in the low zone, high phosphorus values were registered (Tables 1 and 2). Statistical differences were observed between the lower zone and the other two altitudinal zones, also indicating a negative correlation ($r = -0.16$, $p < 0.05$), with lower phosphorus concentration available at higher heights (Figure 5).

After nitrogen, phosphorus (P) is usually the most limiting nutrient for crop production. It is a macronutrient with a low soil supply rate and noticeably low retention or bioavailability (Howell *et al.*, 2016). Because of root exudates, soil P solubility can affect some plants (Campos-Janegitz *et al.*, 2017). Different plant species, and even cultivars

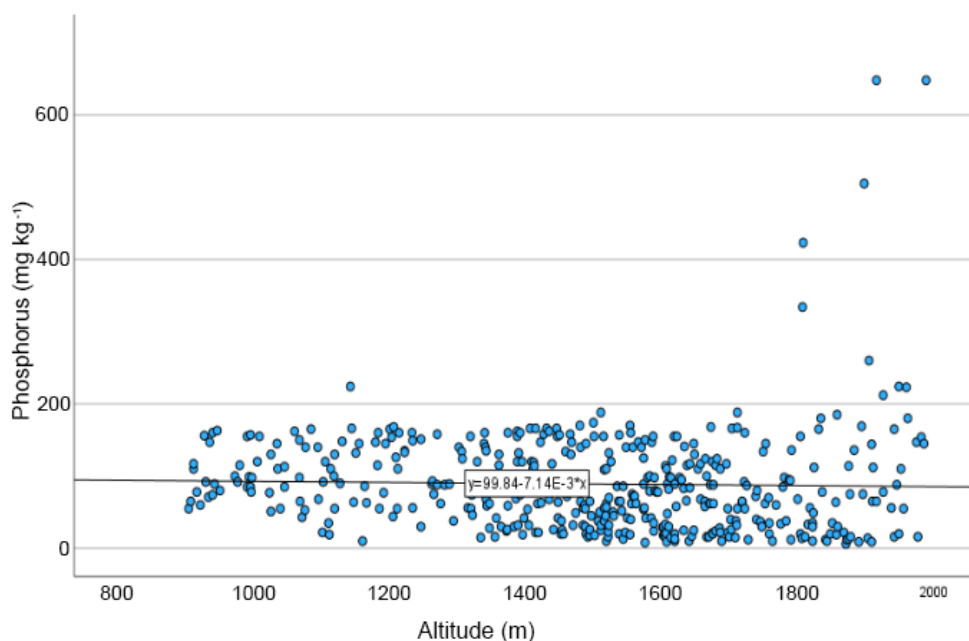


Figure 5. Relationship between phosphorus (P) concentration in soil and altitude.

of the same species, may exhibit growth variability due to phosphorus concentration (Akhtar *et al.*, 2016). Therefore, phosphorus is added in much greater quantities than the crop can remove. Soil heating can also increase phosphorus availability by partially oxidizing organic phosphorus in the soil. Slash and burn farming practices significantly increase phosphorus stocks (Hamer *et al.*, 2013). This could explain the higher phosphorus concentration in lower areas, where fire incidence is lower.

The findings of this study revealed statistically significant differences in potassium levels. This nutrient decreases with increasing altitude, with a negative correlation of $r = -0.34$ ($p < 0.05$) (Figure 6). Soluble potassium values below 150 mg kg^{-1} are considered low, as would be the case in the high zone with 118.0 mg kg^{-1} , while the middle (155.8 mg kg^{-1}) and low (161.8 mg kg^{-1}) zones were in the medium potassium concentration (Table 2). According to Howell *et al.* (2016), intensive cropping, runoff, leaching, and soil erosion lead to soil potassium deficiency, resulting in stunted growth and limited physiological activities of the plant.

The average K reserves in soil are generally large, but the most of its are not available to plants. Olaniyan *et al.* (2022) stated that physical, chemical, mineralogical, and biological factors, particularly soil microbiota, influence the release of potassium from soil minerals through cation exchange and dissolution processes. In this sense, soil pH and acidity play a key role in K release from clay minerals, which is related to the findings in this study as low potassium values were found in soils in lower zones with higher soil acidity.

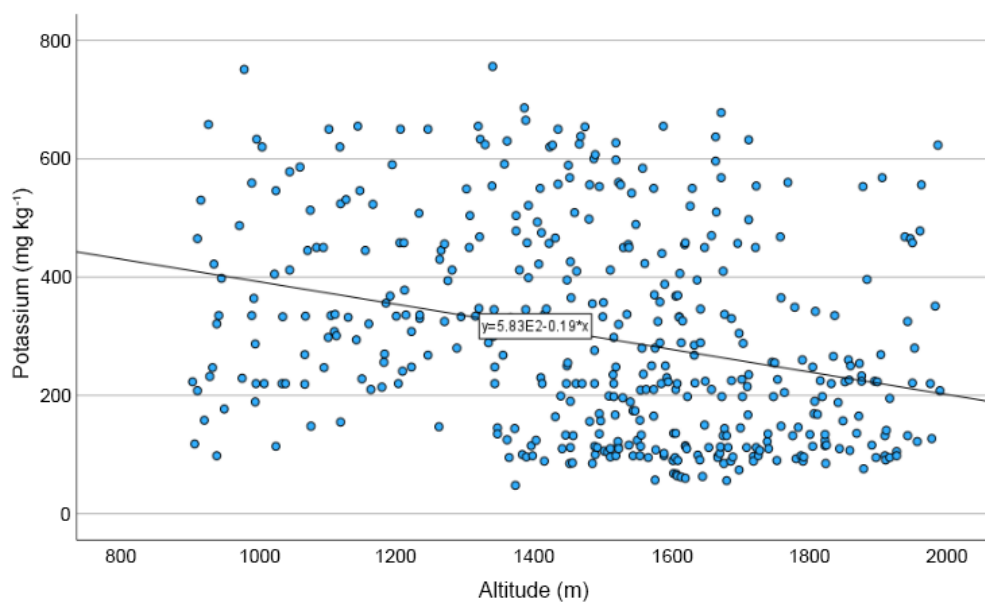


Figure 6. Relationship between potassium (K) concentration in soil and altitude.

Fertilizer application recommendation

Based on a comprehensive analysis of soil fertility in coffee cultivation at various altitudes, inorganic fertilization was proposed (Table 3). This fertilization program is intended for crop plots.

Table 3. Recommendations for coffee fertilization of soil macronutrients (N-P-K) in relation to altitude.

| Altitude (m) | N g per plant | P ₂ O ₅ g per plant | K ₂ O g per plant |
|--------------------|---------------|---|------------------------------|
| 900–1400 (Low) | 120 | 60 | 200 |
| 1401–1700 (Medium) | 120 | 100 | 200 |
| 1701–2000 (High) | 120 | 100 | 280 |

While organic fertilization of this crop based on age of coffee would be 3 kg plant⁻¹, depending on the age of the plantation, older age, greater development, and greater need for organic fertilizer to meet nutritional needs.

Impact of soil fertilization on N₂O emission.

Significant statistical differences were found in the experimental farm chosen to evaluate the impact of soil fertilization on N₂O emissions when compared to low mineral

fertilization doses and organic fertilization. Furthermore, there was no statistically significant difference between the low mineral dose and organic fertilization.

According to N_2O analyses, coffee plantations fertilized with mineral fertilizers emit between 300 and 1142 $mg N_2O m^{-2}$ emissions to the environment, while coffee plantations fertilized with organic matter reported fluxes of less than 300 $mg N_2O m^{-2}$, regardless of the type and amount of organic matter used (Figure 7). In addition, Noponen *et al.* (2012) found that organic fertilization contributes less N_2O emissions to the environment. These authors indicated that nitrogen-based fertilization could contribute up to 50 % of N_2O emissions, which is corroborated here, since coffee farmers mostly use urea as a nitrogen source to fertilize their coffee plantations, often without considering a previous soil analysis, affecting the environmental sustainability of these ecosystems and contributing to the emission of greenhouse gases and climate change. Similarly, Martinson *et al.* (2013) reported that the addition of nitrogen increases N_2O emissions.

Verchot *et al.* (2006) reported that high nitrogen fertilization in coffee crops can emit up to 7 $kg N_2O ha^{-1} y^{-1}$. If we scale our N_2O emission data to the scale of one hectare, the results for coffee plantations with high doses of mineral fertilization would reach 11 $kg ha^{-1} y^{-1}$ of N_2O emission, demonstrating that the more fertilizer used, the more gas emissions are produced. Farmers in our study's vicinity, on the other hand, use high doses of nitrogen fertilizers such as urea because, according to them, these high doses result in higher yields in their coffee plots. However, according to Tully *et al.* (2013),

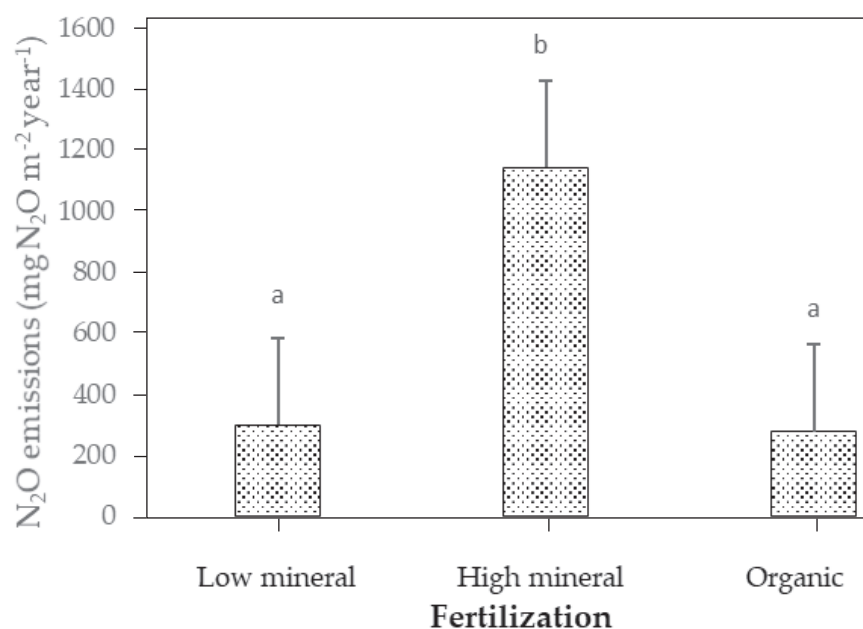


Figure 7. N_2O emissions in coffee plantations of mineral fertilization (high and low doses), and organic fertilization.

the way and amount of how much N is applied can have a differential impact on the higher leaching of mineral fertilizers and, as observed in our results, result in higher N₂O emissions to the environment.

CONCLUSIONS

Changes in the nutritional status of the soil were observed along an Andean gradient in coffee plantations in southern Ecuador. This is due to the high susceptibility of these soils to erosion, primarily due to their steep slopes, which promote nutrient accumulation in lowlands. A high rate of mineral fertilization rapidly improves coffee crop productivity; however, the environmental impact is greater because of high N₂O emissions. When organic fertilization is used, nutrient assimilation is slower, but N₂O emissions to the environment are reduced. Therefore, organic fertilization would be more environmentally sustainable.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the local coffee growers for their active participation in the project, as well as the managers of the Regional Federation of Associations of Small Ecological Coffee Growers of Southern Ecuador (FAPECAFES). We also appreciate the technical support of Ing. Mauricio Muñoz, SWISSCONTACT Project Manager. We also thank the *Universidad Técnica Particular de Loja* (UTPL) for supporting this research and the publication of the paper.

REFERENCES

- Akhtar MS, Oki Y, Nakashima Y, Adachi T, Nishigaki M. 2016. Phosphorus stress-induced differential growth, and phosphorus acquisition and use efficiency by spring wheat cultivars. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 47 (1): 15–27. <https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1232089>
- Arteaga-Marín J, Mejía-Veintimilla D, Ochoa-Cueva P. 2022. Estimación de la producción de sedimentos por prácticas de manejo de suelos en una cuenca transfronteriza. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 38: 1–12. <https://doi.org/10.20937/rica.54315>
- Bahr E, Hamer U, Chamba-Zaragocin D, Makeschin F. 2013. Different fertilizer types affected nitrogen and carbon cycling in eroded and colluvial soils of Southern Ecuador. *Agricultural Sciences* 4 (12): 19–32. <https://doi.org/10.4236/as.2013.412a002>
- Benavides-Muñoz H, Arias-Zari J, Fries A, Sánchez-Paladines J, Gallegos-Reina A, Hernández-Ocampo R, Ochoa-Cueva P. 2020. *Management of hydrological systems*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA. 144 p.
- Bray RH, Kurtz LT. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59 (1): 39–45. <https://doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>
- Burneo-Valdivieso JI, Capa-Mora ED, Jiménez-Álvarez LS, Ochoa-Cueva P. 2017. Caficultura, un espacio de encuentro entre la academia y el sector productivo. +E: *Revista de Extensión Universitaria* (7): 290–295.
- Campos-Janegitz M, Helene-Martins AR, Rosolem CA. 2017. Cover crops and soil phosphorus availability. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 48 (10): 1240–1246. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1341918>
- Capa-Mora ED, Pérez-Esteban J, Masaguer A. 2015. Unsustainability of recommended fertilization rates for coffee monoculture due to high N₂O emissions. *Agronomy for Sustainable Development* 35 (4): 1551–1559. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0316-z>
- Cheng K, Pan G, Smith P, Luo T, Li L, Zheng J, Zhang X, Han X, Yan M. 2011. Carbon footprint of China's crop production—An estimation using agro-statistics data over 1993–2007.

- Agriculture, Ecosystems and Environment 142 (3–4): 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.05.012>
- De Bauw P, Van Asten P, Jassogne L, Merckx R. 2016. Soil fertility gradients and production constraints for coffee and banana on volcanic mountain slopes in the East African Rift: a case study of Mt. Elgon. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 231: 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.036>
- Hamer U, Potthast K, Burneo JJ, Makeschin F. 2013. Nutrient stocks and phosphorus fractions in mountain soils of Southern Ecuador after conversion of forest to pasture. *Biogeochemistry* 112 (1–3): 495–510. <https://doi.org/10.1007/s10533-012-9742-z>
- Howell DM, Das Gupta S, Pinno BD, MacKenzie MD. 2016. Reclaimed soils, fertilizer, and bioavailable nutrients: determining similarity with natural benchmarks over time. *Canadian Journal of Soil Science* 97 (2): 149–158. <https://doi.org/10.1139/cjss-2016-0069>
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2021. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua - ESPAC. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Quito, Ecuador. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/> (Retrieved: March 2022).
- Jiménez LS, Mezquida ET, Benito-Capa M, Rubio-Sánchez A. 2007. Cambio en las propiedades del suelo por transformación de áreas boscosas en pastizales en Zamora-Chinchipe (Ecuador). *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 22: 65–70.
- Koehler B, Corre MD, Veldkamp E, Wullaert H, Wright SJ. 2009. Immediate and long-term nitrogen oxide emissions from tropical forest soils exposed to elevated nitrogen input. *Global Change Biology* 15 (8): 2049–2066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01826.x>
- Lofftfield N, Flessa H, Augustin J, Beese F. 1997. Automated gas chromatographic system for rapid analysis of the atmospheric trace gases methane, carbon dioxide, and nitrous oxide. *Journal of Environmental Quality* 26 (2): 560–564. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600020030x>
- López-Báez W, Castro-Mendoza I, Salinas-Cruz E, Reynoso-Santos R, López-Martínez J. 2016. Propiedades de los suelos cafetaleros en la Reserva de la Biósfera El Triunfo, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7 (3): 607–618.
- 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.
- Martinson GO, Corre MD, Veldkamp E. 2013. Responses of nitrous oxide fluxes and soil nitrogen cycling to nutrient additions in montane forests along an elevation gradient in southern Ecuador. *Biogeochemistry* 112 (1–3): 625–636. <https://doi.org/10.1007/s10533-012-9753-9>
- Morales-Ramos V, Escamilla-Prado E, Ruiz-Carbajal RA, Pérez-Sato JA, Velázquez-Morales JA, Servín-Juárez R. 2020. On the soil-bean-cup relationships in *Coffea arabica* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100 (15): 5434–5441. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10594>
- Noponen MRA, Edwards-Jones G, Hagggar JP, Soto G, Attarzadeh N, Healey JR. 2012. Greenhouse gas emissions in coffee grown with differing input levels under conventional and organic management. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 151: 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.01.019>
- Ochoa PA, Chamba YM, Arteaga JG, Capa-Mora ED. 2017. Estimation of suitable areas for coffee growth using a GIS approach and multicriteria evaluation in regions with scarce data. *Applied Engineering in Agriculture* 33 (6): 841–848. <https://doi.org/10.13031/aea.12354>
- Olaniyan FT, Alori ET, Adekiya AO, Ayorinde BB, Daramola FY, Osemwegie OO, Babalola, OO. 2022. The use of soil microbial potassium solubilizers in potassium nutrient availability in soil and its dynamics. *Annals of Microbiology* 72: 45. <https://doi.org/10.1186/s13213-022-01701-8>
- Pastor-Mogollón J, Martínez A. 2009. Variación de la actividad biológica del suelo en un transecto altitudinal de la sierra de San Luis, estado Falcón. *Agronomía Tropical* 59 (4): 469–479.
- Ponce-Vaca LA, Orellana-Suarez KD, Acuña-Velásquez IR, Alfonso-Alemán JL, Fuentes-Figueroa T. 2018. Situación de la caficultura ecuatoriana: perspectivas. *Revista Estudios del Desarrollo Social: Cuba y América Latina* 6 (1): 307–325.

- Quichimbo P, Jiménez L, Veintimilla D, Tischer A, Günter S, Mosandl R, Hamer U. 2017. Forest site classification in the Southern Andean region of Ecuador: a case study of pine plantations to collect a base of soil attributes. *Forest* 8 (12): 473. <https://doi.org/10.3390/f8120473>
- Soil Survey Staff. 2011. Soil Survey Laboratory Information Manual. Soil Survey Investigations Report No. 45, Version 2.0. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Lincoln, NE, USA. <https://www.nrcs.usda.gov/sites/default/files/2022-10/SSIR45.pdf> (Retrieved: March 2022)
- Tully KL, Wood SA, Lawrence D. 2013. Fertilizer type and species composition affect leachate nutrient concentrations in coffee agroecosystems. *Agroforestry Systems* 87 (5): 1083–1100. <https://doi.org/10.1007/s10457-013-9622-0>
- Valarezo-Torres GE, Carrión-Paladines HV, Capa-Mora ED, Jiménez-Álvarez LS. 2021. Soil quality/health indicators in a disturbed ecosystem in southern Ecuador. *Soil Science Annual* 72 (2): 135991. <https://doi.org/10.37501/soilsa/135991>
- Vélez-Mora DP, Guzmán E, Espinosa CI, Quintana-Ascencio PF. 2022. Changes in climate, grazing pressure and nutrient inputs affect the structural integrity and functioning of Andean shrublands. *Plant Ecology and Diversity* 15 (5–6): 309–327. <https://doi.org/10.1080/17550874.2022.2122753>
- Venegas-Sánchez S, Orellana-Bueno D, Pérez-Jara P. 2018. La realidad ecuatoriana en la producción de café. *Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento* 2 (2): 72–91.
- Verchot LV, Hutabarat L, Hairiah K, van Noordwijk M. 2006. Nitrogen availability and soil N₂O emissions following conversion of forests to coffee in southern Sumatra. *Global Biogeochemical Cycles* 20 (4). <https://doi.org/10.1029/2005GB002469>
- Wilcke W, Valladarez H, Stoyan R, Yasin S, Valarezo C, Zech W. 2003. Soil properties on a chronosequence of landslides in montane rain forest, Ecuador. *Catena* 53 (1): 79–95. [https://doi.org/10.1016/S0341-8162\(02\)00196-0](https://doi.org/10.1016/S0341-8162(02)00196-0)
- Zebarth BJ, Forge TA, Goyer C, Brin LD. 2015. Effect of soil acidification on nitrification in soil. *Canadian Journal of Soil Science* 95 (4): 359–363. <https://doi.org/10.4141/cjss-2015-040>

CONDICIONES DEL SUELO Y EFECTO DE LA FERTILIZACION SOBRE LA EMISION DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN UN GRADIENTE CAFETALERO ANDINO

Juan Burneo-Valdivieso^{1*}, Daniel Capa-Mora¹, Pablo Ochoa-Cueva¹

¹ Universidad Técnica Particular de Loja. Departamento de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Calle Marcelino Champagnat s/n, Loja, Ecuador. C. P. 1101608.

* Autor para correspondencia: jiburneo@utpl.edu.ec

RESUMEN

El café (*Coffea arabica* and *C. canephora*) es un importante producto agrícola de exportación en Ecuador, pero los rendimientos registrados en la mayoría de las explotaciones cafetaleras son bajos. Las principales razones son el desconocimiento del estado nutricional del suelo y la administración de la fertilización, que implica un mal uso de los abonos y provoca emisiones de gases al medio ambiente. En este estudio se evaluó el estado nutricional del suelo de los cafetales a lo largo de un gradiente altitudinal de los Andes ecuatorianos, como indicador de los planes de fertilización del suelo. Se seleccionaron 471 sectores del cultivo y se determinó su pH, materia orgánica del suelo y los principales macronutrientes. También se evaluó el impacto de la fertilización del suelo en las emisiones de óxido nítrico; para ello, se eligió una finca experimental de café donde se probaron diferentes dosis de fertilización mineral y orgánica del suelo, y se determinaron las emisiones de N₂O. Los resultados mostraron una correlación negativa entre la materia orgánica del suelo, el pH y la concentración de nitrato con la altitud. En todos los estratos altitudinales, la concentración de nitrato fue superior a la de amonio. Además, se observó una fuerte correlación entre la materia orgánica del suelo y la concentración de nitrato en el suelo. La cantidad de potasio disminuyó al aumentar la altitud, mientras que se observaron concentraciones medias y altas de fósforo disponible en todos los intervalos altitudinales. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas significativas al comparar las dosis bajas de fertilización mineral con la fertilización orgánica. Los análisis de N₂O mostraron que los cafetales fertilizados con abonos minerales emiten al medio ambiente de 300 a 1142 mg de N₂O m⁻². La fertilización mineral alta dio lugar a las mayores emisiones de N₂O, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con las dosis minerales bajas y la fertilización orgánica. Por lo tanto, se concluyó que hubo cambios en el estado nutricional del suelo a lo largo del gradiente andino de las plantaciones de café en el sur de Ecuador y que altas dosis de fertilizantes minerales pueden tener un fuerte impacto en las emisiones de N₂O.

Palabras clave: gradiente altitudinal, fertilización del café, gases de efecto invernadero, emisión de óxido nítrico, fertilidad del suelo, Andes ecuatorianos.

Citation: Burneo-Valdivieso J, Capa-Mora D, Ochoa-Cueva P. 2023. Condiciones del suelo y efecto de la fertilización sobre la emisión de gases de efecto invernadero en un gradiente cafetalero andino. *Agrociencia* 57(5): 920-952. doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2359

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: September 08, 2022.

Approved: May 11, 2023.

Published in Agrociencia:

July 31, 2023.

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



INTRODUCCIÓN

El café producido principalmente por las especies *Coffea arabica* y *C. canephora*, es un producto importante de la economía mundial por su consumo generalizado. Actualmente, el mercado del café está dominado por grandes productores como Brasil, Vietnam y Colombia. Y en Ecuador, es uno de los productos agrícolas de exportación más importantes, con 4917 Mg de café en grano exportados en 2021 (INEC, 2021). La producción de café sólo es superada por la de plátanos en importancia social, económica y medioambiental, ya que más del 4 % de la población depende directamente de ella para vivir. También es una fuente primaria de divisas tanto para los productores privados como para el gobierno, y forma parte de la diversidad del agroecosistema en Ecuador (Ponce-Vaca *et al.*, 2018).

La producción de café en Ecuador ha estado entre los primeros 20 cultivos en los últimos 15 años, con la mayor superficie cosechada y producción en 23 de las 24 provincias del país (INEC, 2021). En 2018, la producción de café arábica (*Coffea arabica*) representó el 68 % de la producción nacional, mientras que el café robusta (*Coffea canephora*) constituyó el 32 %. Además, 52 % de los agricultores cultivan café arábica y 48 % café robusta (Venegas-Sánchez *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayoría de las plantaciones de café arábica y robusta tienen bajos rendimientos de producción, con un valor de 0.22 Mg ha⁻¹ (INEC, 2021).

Una posible explicación del bajo rendimiento del café es que los agricultores no abonan adecuadamente sus cultivos; además, no existe un programa estructurado de gestión agronómica (que incluya la gestión de plagas, la poda y la replantación). Otros problemas reportados incluyen la avanzada edad de las plantaciones, el desmoche sucesivo, la alta incidencia de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) (Martínez-López *et al.*, 2021) y la falta de tecnologías apropiadas (Capa-Mora *et al.*, 2015). Esto, unido a la falta de mano de obra y a la caída de los precios internacionales del café, se traduce en una baja productividad.

Burneo-Valdivieso *et al.* (2017) informaron que uno de los problemas de la baja productividad del café entre algunos caficultores del sur de Ecuador es su débil estructura administrativa; muchas asociaciones cafetaleras no llevan registros de los datos de sus socios y no disponen de información adecuada sobre la gestión de los cultivos. Sus prácticas tienen escasos insumos de gestión, lo que genera un importante impacto negativo en la nutrición del suelo. En resumen, algunos campos se cultivan durante varios años sin aplicar estiércol ni fertilizantes, para luego dejar la tierra en barbecho cuando se agotan los nutrientes del suelo, lo que hace que el rendimiento de los cultivos disminuya drásticamente (Benavides-Muñoz *et al.*, 2020).

El estado nutricional del suelo es otro indicador de baja productividad que rara vez se tiene en cuenta. Su importancia está relacionada con la calidad y la productividad, ya que la textura, la acidez y el pH del suelo influyen significativamente en algunos de los atributos de calidad del café en taza (Morales-Ramos *et al.*, 2020). Debido a que los productores de café no utilizan técnicas de diagnóstico como el análisis de suelos, existe una falta de conocimiento sobre los factores que limitan el cultivo. Sin

información reciente sobre las características de fertilidad de los suelos no se pueden hacer diagnósticos adecuados ni recomendaciones sostenibles de fertilizantes. El café es un cultivo que se desarrolla en diversas condiciones y es ampliamente cultivado en climas tropicales, similares a los que se encuentran en la región sur de Ecuador (Ochoa *et al.*, 2017).

El desconocimiento de los planes de fertilización contribuye a otro problema relacionado con la contaminación ambiental, causada por el mal uso de los fertilizantes. La fertilización, ya sea orgánica o química, es un factor importante junto con el riego, ya que las aplicaciones bien gestionadas ayudan a producir plantas vigorosas y sanas, al tiempo que aumentan la producción (Capa-Mora *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso inadecuado de fertilizantes minerales no sólo contribuye a la contaminación por nitratos y fosfatos del agua y el suelo, sino que también tiene un impacto negativo en el cambio climático. La aplicación de fertilizantes químicos representa aproximadamente el 57 % de las emisiones totales de gases de efecto invernadero procedentes de insumos agrícolas, principalmente por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados (N), y se atribuye sobre todo a las emisiones de N₂O de las tierras de cultivo (Cheng *et al.*, 2011). Por estas razones, se evaluó el estado nutricional del suelo en cafetales en relación a un gradiente altitudinal en los Andes ecuatorianos, caracterizando la química del suelo del cultivo y evaluando el impacto de la fertilización del suelo en las emisiones de N₂O. Esta información es clave para que los productores puedan tomar decisiones para mejorar la cadena productiva y sirve de referencia para otras áreas de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este estudio se realizó en la región sur de Ecuador, en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, con un área aproximada de 21 622 km² ubicada entre 3°45' S y 4°55' S (latitud), 78°50' O y 80°14' O (longitud) (Figura 1). Ésta es una zona donde se produce el mejor café del país, según concursos como "Taza de Oro", y ofrece condiciones favorables para la producción de café de alta calidad (Ochoa *et al.*, 2017).

Unidad experimental y diseño

Para cumplir con los objetivos de este estudio, se seleccionaron 471 explotaciones pertenecientes a cinco asociaciones de caficultores, con un tamaño medio de explotación entre una y tres hectáreas. Estas asociaciones fueron: Productores de Café de Altura del Sudeste de la Provincia de Loja, Asociación Agrícola y Artesanal de Productores Orgánicos de la Cuenca del Río Mayo, Asociación de Productores Ecológicos Agroartesanales de Café Especial de Loja, Asociación de Productores de Café Orgánico de Palanda y Asociación de Productores de Café de Altura de Puyango, todas ellas pertenecientes a la Federación Regional de Asociaciones de Pequeños Productores de Café Ecológico del Sur del Ecuador.

Se establecieron tres rangos altitudinales, la zona baja de 900 a 1400 m, la zona media de 1401 a 1700 m, y la zona alta de 1701 a 2000 m (Figura 1). La producción de café en

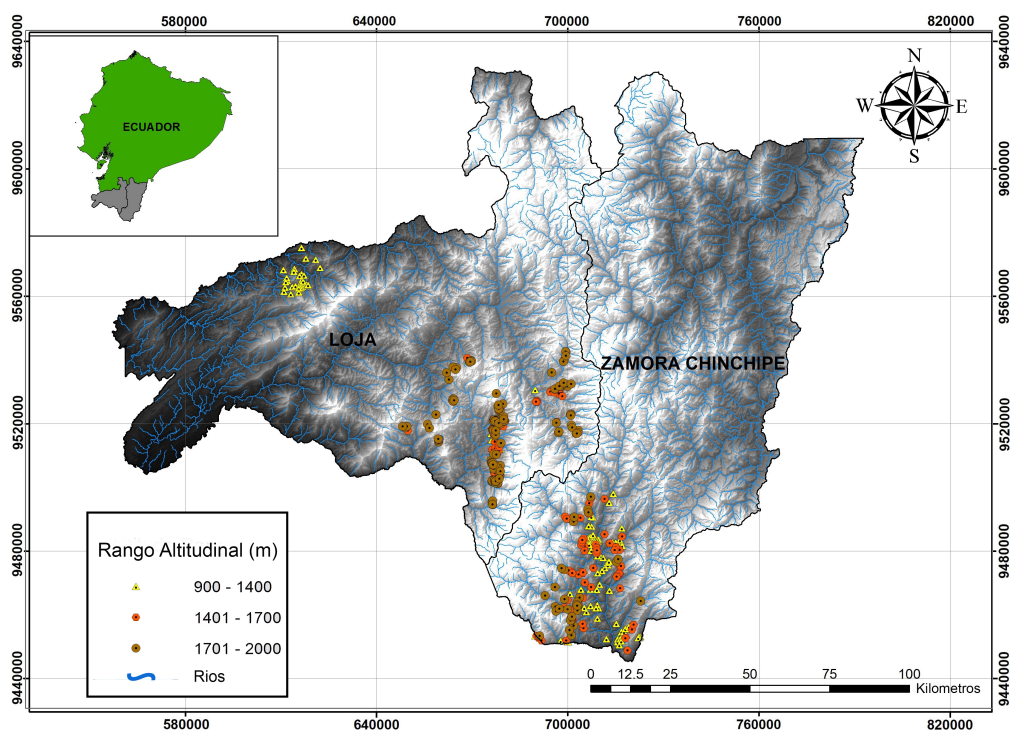


Figura 1. Área de estudio de cafetales a distintas altitudes en el sur de Ecuador.

la provincia de Loja tiene un clima subtropical-seco, con una temperatura media anual de 19.4 °C y una precipitación media anual de 822 mm. La región está influenciada por la cordillera de los Andes, con lluvias típicas de diciembre a mayo, mientras que la provincia de Zamora Chinchipe está bajo el influjo de los vientos del este tropical, presentando mayor transporte de humedad desde la cuenca amazónica (Benavides-Muñoz *et al.*, 2020).

Muestreo de suelos y análisis de laboratorio

Se recogieron aproximadamente 500 muestras de suelo en toda la zona de estudio. La recolección se hizo a una profundidad de 0-30 cm con una barrena. Se obtuvo una muestra compuesta de suelo mineral a partir de cinco submuestras en cada lugar de estudio. Las muestras de suelo se recogieron a lo largo de una secuencia altitudinal que atraviesa algunas zonas de las provincias de Loja y Zamora (Figura 1). También se registraron las coordenadas geográficas, la altitud y las condiciones climáticas de cada lugar de estudio.

Con el fin de determinar las propiedades químicas del suelo, las muestras se secaron al aire y se tamizaron con una malla de 2 mm. El pH se midió potenciométricamente en agua desionizada en una proporción suelo-agua de 1:2.5. La materia orgánica del suelo (MOS) se determinó por oxidación húmeda utilizando el método Walkley-Black (Soil Survey Staff, 2011). La determinación de NO₃⁻ se realizó utilizando complejos

coloreados con ácido brucínico. Del mismo modo, la determinación de NH_4^+ se basó en la formación de complejos de color azul de indofenol. Para la determinación del P extraíble se utilizó el protocolo de Bray y Kurtz por el método del fluoruro de amonio (Bray y Kurtz, 1945). Para la determinación del K inorgánico se utilizó la extracción con soluciones de $\text{NH}_4^+\text{-Ac}$.

Determinación de las emisiones de óxido nitroso (N_2O)

Se seleccionó una finca experimental, situada en la provincia de Loja a 2000 m de altitud, con una pluviometría de 910 mm año^{-1} y una temperatura media de 18 °C. Se eligió una plantación de un año (*Coffea arabica* L. var. Caturra) con una superficie total de 2500 m² y se establecieron 12 parcelas de estudio utilizando un diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos de fertilización consistieron en fertilización inorgánica baja con 70, 22 y 31 kg NPK ha^{-1} año^{-1} y 200, 65 y 62 kg NPK ha^{-1} año^{-1} ; fertilización inorgánica alta con 225, 65 y 93 kg NPK ha^{-1} año^{-1} y 400, 109 y 187 kg NPK ha^{-1} año^{-1} ; y 3 kg de fertilizante orgánico planta⁻¹ año^{-1} . Las dosis de aplicación se basaron en los análisis del suelo y las necesidades de las plantas. Se midió el óxido nitroso en cafetales para comparar las emisiones de la fertilización mineral (dosis altas y bajas) y la fertilización orgánica a lo largo de un año y medio de gestión del cultivo. La muestra de gas se recogió mediante el método de cámara cerrada (Capa-Mora *et al.*, 2015), que consistía en enterrar la cámara a una profundidad de 5 cm y sellarla herméticamente con una tapa provista de un pequeño orificio para extraer el gas. Para cada cámara, se recogieron muestras de gas cada 10 min (1, 11, 21 y 31 min) y se transfirieron inmediatamente a viales de vidrio pre-evacuados con tapón septum de 20 mL (Vacutainers, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC-14B Duisburg, Alemania) equipado con un detector de ionización de llama (FID), un detector de captura de electrones (ECD) y una columna Porapak Q de malla 80-100 para gas N_2O (Loftfield *et al.*, 1997). Las concentraciones de N_2O se calcularon comparando las áreas de pico integradas de las muestras con el gas patrón (N_2O). La diferencia de concentraciones en el minuto 31 y 1 se utilizó para calcular los flujos de gas, y las tasas de emisión de N_2O se calcularon mediante interpolación lineal utilizando muestras de gas de cada cámara, siendo necesarios al menos tres puntos lineales para validar las mediciones de flujo (Koehler *et al.*, 2009).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó utilizando el programa informático Statistical Professional Social Sciences (SPSS) 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con datos de muestras independientes ($p < 0.05$). Las relaciones entre los distintos parámetros se determinaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman (r) utilizando una prueba de dos colas ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estado nutricional del suelo y su relación con el gradiente altitudinal

Los resultados del pH del suelo en la zona de estudio oscilaron entre 4 y 7.5 (Figura 2). Los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas entre la zona de altitud media (1401-1700 m) y la zona de altitud alta (1701-2000 m). Estos dos, sin embargo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con la zona altitudinal baja (900-1400 m) (Cuadro 1).

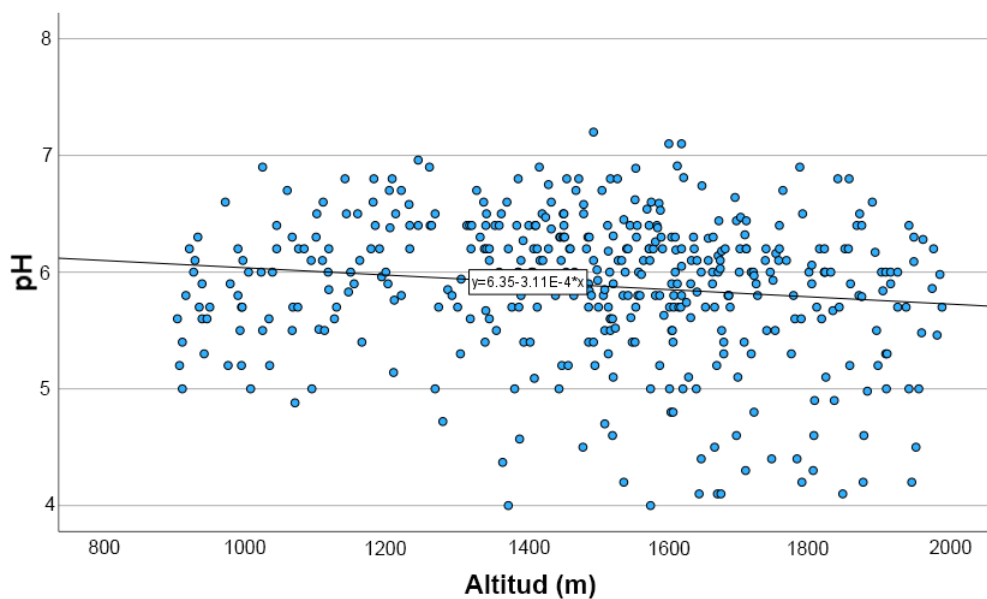


Figura 2. Relación entre el pH del suelo y la altitud.

Cuadro 1. Parámetros edáficos medios en relación con los rangos altitudinales.

| Altitud (m) | pH | MOS (%) | Nitrato | Amonio (mg kg ⁻¹) | Fósforo | Potasio |
|-------------------|-----------|-----------|-------------|-------------------------------|-------------|--------------|
| 900–1400 (Bajo) | 5.9±0.5ab | 2.87±1.1b | 34.26±20.2b | 15.88±11.3a | 46.49±26.8b | 161.8±159.3b |
| 1401–1700 (Medio) | 6.0±0.56b | 2.50±1.0a | 34.26±26.4b | 20.84±18.3b | 37.98±27.5b | 155.8±176.4b |
| 1701–2000 (Alto) | 5.7±0.66a | 2.33±0.7a | 27.22±22.3a | 14.33±13.9a | 34.80±30.8a | 118.0±153.6a |

Los valores medios por columna con letras diferentes indican diferencias significativas entre altitudes ($p < 0.05$). El error estándar se muestra junto a cada valor medio. MOS: materia orgánica del suelo.

Los valores de pH en el área de estudio se correlacionaron negativamente con la altitud ($r = -0.110$, $p < 0.05$), indicando que, a mayor altitud, el pH de los suelos tiende a acidificarse más. Una relación similar con una disminución lineal fue reportada por De Bauw *et al.* (2016), con valores de pH de 7.5 a 1000 m y 4.9 a 2200 m. Según estos autores, el aumento de la acidez del suelo en función de la altitud puede explicarse por una variedad de factores, incluyendo una mayor acidificación del suelo a mayor altitud debido a una lixiviación más intensa (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 2. Interpretación del análisis del suelo en relación con los rangos altitudinales.

| Altitud (m) | pH | MOS* | Nitrato | Amonio | Fósforo | Potasio |
|-------------------|-----------------|------|---------|--------|---------|---------|
| 900–1400 (Bajo) | levemente ácido | bajo | alto | alto | alto | medio |
| 1401–1700 (Medio) | levemente ácido | bajo | alto | alto | medio | medio |
| 1701–2000 (Alto) | levemente ácido | bajo | alto | alto | medio | bajo |

*MOS: materia orgánica del suelo.

Pastor-Mogollón y Martínez (2009) reportaron resultados similares en un gradiente altitudinal en los Andes venezolanos, donde se observó una disminución del pH del suelo con la altitud, encontrando el valor más alto de pH (6.6) a 720 m y el valor más bajo (4.7) a 1400 m. Según estos autores, los bajos valores de pH están relacionados con los mayores valores de precipitación registrados en la región montañosa de los Andes, en los lugares más altos (Arteaga-Marín *et al.*, 2022), que lavan las bases cambiables del suelo (Jiménez *et al.*, 2007). Estos estudios apoyan nuestros hallazgos en el rango altitudinal de 1701-2000 m, donde se encontraron los valores más bajos de acidez y bases intercambiables, como el potasio. López-Báez *et al.* (2016) encontraron tendencias similares en el comportamiento del pH con la altitud, las altas precipitaciones, las condiciones orográficas y las características mineralógicas de los materiales geológicos. Los sustratos geológicos del área de estudio en el sur de Ecuador consisten en a) rocas de edad terciaria de origen sedimentario al este, b) rocas vulcano-sedimentarias de edad cuaternaria, localizadas al noreste, y c) rocas de origen magmático intrusivo (granitos y granodioritas) localizadas a lo largo de las provincias, que se han introducido en las rocas paleozoicas, cretácicas y terciarias. Además, Wilcke *et al.* (2003) argumentaron que los suelos de estas zonas tienen características de Oxisol, con rocas metamórficas y cristalinas como materiales parentales más destacados, lo que es típico de la etapa final de la ferralitización (los procesos asociados a la meteorización fuerte que condujeron a la formación de Oxisoles o Ferrosoles). Como consecuencia, estos suelos son ácidos.

La acidez del suelo podría deberse a la acumulación de materia orgánica en la superficie del suelo debido a un laboreo mínimo. Sin embargo, estos resultados revelaron lo contrario, es decir, un mayor grado de acidez del suelo en función de la disminución de la materia orgánica en las zonas más altas, lo que podría explicarse por el uso de fertilizantes nitrogenados, así como por la inclusión de determinadas especies arbóreas que aumentan la acidez del suelo (Tully *et al.*, 2013). Un estudio local sobre fertilización mineral y orgánica para el cultivo de café (Capa-Mora *et al.*, 2015) informó que cualquier aporte de nitrógeno (mineral u orgánico) contribuye a la acidificación del suelo.

Las concentraciones medias de MOS en el área de estudio oscilaron entre 2.3 y 2.9 %, localizándose el valor más bajo (2.3 %) en la zona altitudinal alta (1701-2000 m) y el valor más alto (2.9 %) en la zona altitudinal baja. Estos resultados mostraron diferencias significativas entre la zona altitudinal baja y las zonas media y alta. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las dos últimas zonas altitudinales (Figura 3). Se reveló una correlación negativa con la altitud ($r = -0.219$, $p < 0.05$), lo que indica que a mayor altitud de los cafetales se acumula menos materia orgánica. Además, esto puede deberse a las necesidades y características del cultivo, que se desarrolla en rangos óptimos de altitud entre 1200 y 1600 m.

En los suelos de la sierra ecuatoriana, los valores de MOS por debajo del 3 % se consideran bajos para todos los rangos altitudinales (Cuadro 2). En general, se espera que la MOS aumente con la altitud (De Bauw *et al.*, 2016); sin embargo, esta tendencia no se observó en nuestros resultados, ya que la concentración de MOS disminuyó a medida que aumentó la altitud. Esta contradicción implica que otros factores, no incluidos en este estudio, como el manejo del sistema de cultivo por parte de los agricultores, el

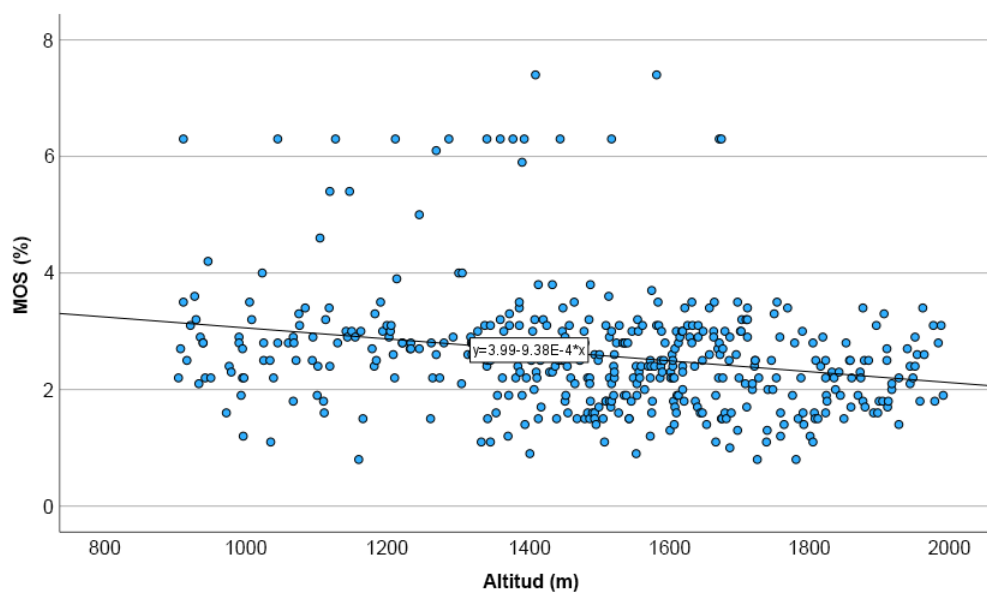


Figura 3. Relación entre la concentración de materia orgánica del suelo SOM (%) y la altitud.

tipo de vegetación, la erosión del suelo y la topografía, entre otros (Arteaga-Marín *et al.*, 2022), tienen un efecto directo sobre las reservas de SOM.

La MOS y la acumulación de sedimentos se ven a menudo favorecidas por la topografía (López-Báez *et al.*, 2016; Arteaga-Marín *et al.*, 2022), donde la MOS es transportada al punto más bajo del terreno a través de procesos de escorrentía. Este tipo de erosión puede tener efectos secundarios duraderos sobre el crecimiento de las plantas y el aporte de hojarasca (Quichimbo *et al.*, 2017). Si la erosión reduce la productividad al limitar la reposición, la cantidad de MOS puede disminuir a largo plazo (Bahr *et al.*, 2013).

Los estudios de erosión en nuestra zona muestran una susceptibilidad de alta a moderada, debido principalmente a factores climáticos y topográficos (Arteaga-Marín *et al.*, 2022). Esto podría explicar por qué en este estudio se encontró una concentración de MOS menor en las zonas altas que en las bajas, posiblemente debido al alto riesgo de erosión del suelo en la zona. La influencia del relieve del terreno es determinante tanto en la cantidad como en la calidad de la MOS, ya que las características del suelo cambian con la altitud en muchos casos. Asimismo, las precipitaciones, la temperatura y el tipo de vegetación influyen en la biomasa microbiana y la actividad microbiológica del suelo (Quichimbo *et al.*, 2017), que está directamente relacionada con la concentración de MOS. Según Vélez-Mora *et al.* (2022), las zonas con actividad agrícola intensiva presentan los niveles más bajos de MOS. Esto podría explicar la tendencia de la MOS a disminuir, dependiendo de la altura encontrada en este estudio. Sin embargo, la concentración media de MOS en la zona de estudio se encuentra dentro de los rangos adecuados para este cultivo ($> 2\%$) (Ochoa *et al.*, 2017).

Los resultados indican que a medida que aumentaba la altitud de la zona de estudio, disminuía la concentración de nitratos en el suelo ($r = -0.20$, $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las zonas de altitud baja y media, pero ambas mostraron una diferencia significativa con la zona más alta (Figura 4A). Además, la concentración de amonio mostró una relación estadística similar, con diferencias estadísticas en las zonas baja y alta en relación con el suelo de la zona media, que contenía los niveles más altos de amonio (20.84 mg kg^{-1}) (Figura 4B).

Las formas de nitrógeno disponibles para las plantas, como el nitrato (N-NO_3^-) y el amonio (N-NH_4^+), cambian en función de factores ambientales como la temperatura y la humedad. Las concentraciones de nitrato entre 20 y 30 mg kg^{-1} se consideran elevadas, mientras que las concentraciones de nitrógeno amoniacal superiores a 10 mg kg^{-1} se consideran altas (Cuadro 2). La degradación de los residuos vegetales y animales en el suelo es un proceso biológico en el que el carbono se recicla a la atmósfera en forma de dióxido de carbono, el nitrógeno se transforma en una forma utilizable por las plantas como amonio y nitrato, y también se transforman otros elementos asociados como el fósforo, el azufre y varios microelementos (Bahr *et al.*, 2013). Esto respalda nuestros hallazgos, ya que a mayor altitud se observó menos MOS y menores concentraciones de nitrato, amonio, fósforo y potasio.

En todas las zonas altitudinales estudiadas, la concentración de nitrato fue superior a la de amonio. Asimismo, se observó una fuerte correlación entre la MOS y la

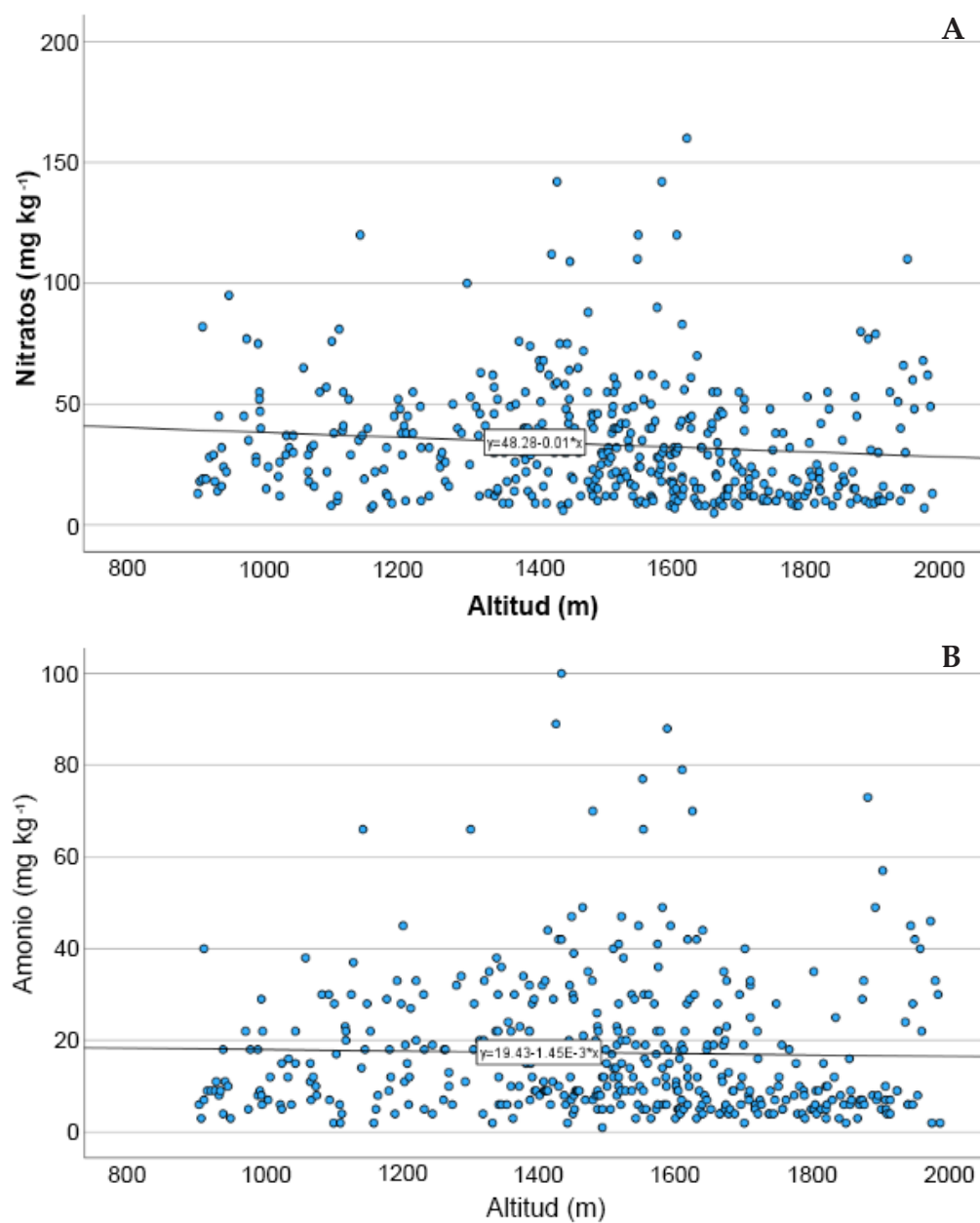


Figura 4. Formas inorgánicas de nitrógeno en relación con la altitud. A: concentración de nitrato; B: concentración de amonio.

concentración de nitrato en el suelo. Según Valarezo-Torres *et al.* (2021), en zonas con mayor MOS, la adición de residuos orgánicos va acompañada de un aumento de la población microbiana, que requiere nitrógeno para permitir el crecimiento de la biomasa microbiana. Dado que las plantas necesitan nitrógeno para crecer y que la flora microbiana reduce sus niveles, sobre todo de amonio, disminuye la disponibilidad de nitrógeno para los organismos nitrificantes y las plantas.

Si bien Zebarth *et al.* (2015) observaron que la disminución del pH del suelo limita la nitrificación del suelo y, por lo tanto, el N inorgánico del suelo permanecerá principalmente en la forma NH_4^+ , esto puede explicar por qué en la zona superior (1701-2000 m), donde se presentaron los valores más bajos de pH (5.7), también se observó una disminución del nitrato. A su vez, en la zona media (1401-1700 m), los valores medios de pH fueron de 6 y se observó un aumento en la concentración de nitrato. No obstante, cabe destacar que en todas las zonas estudiadas los valores de nitrato fueron siempre superiores a los de amonio.

Al disminuir las tasas de mineralización de la MOS, se libera menos nitrógeno inorgánico, por lo que la concentración de amonio es menor. Este aspecto se refleja en estos resultados, ya que se encontraron valores más bajos de MOS y amonio en las zonas más altas. La disponibilidad de fósforo también se relacionó con el rango altitudinal. Los resultados mostraron que las bajas concentraciones de MOS también pueden influir en las bajas concentraciones de otros macronutrientes a mayor altitud, como el fósforo (P) y el potasio (K), ya que la mayoría de estos nutrientes se encuentran en la capa orgánica del suelo. Por lo tanto, en la zona inferior (900-1400 m), fue donde se encontraron los valores más altos de MOS (2.87 %), y también se obtuvieron los valores más altos de P y K.

El análisis del fósforo disponible indica que los valores entre 20 y 40 mg kg^{-1} se consideran medios, mientras que los valores superiores a 40 mg kg^{-1} son altos. En las zonas media y alta estudiadas se observaron concentraciones medias de fósforo, mientras que en la zona baja se registraron valores altos de fósforo (Cuadros 1 y 2). Se observaron diferencias estadísticas entre la zona inferior y las otras dos zonas altitudinales, indicando también una correlación negativa ($r = -0.16$, $p < 0.05$), con una menor concentración de fósforo disponible a mayor altura (Figura 5).

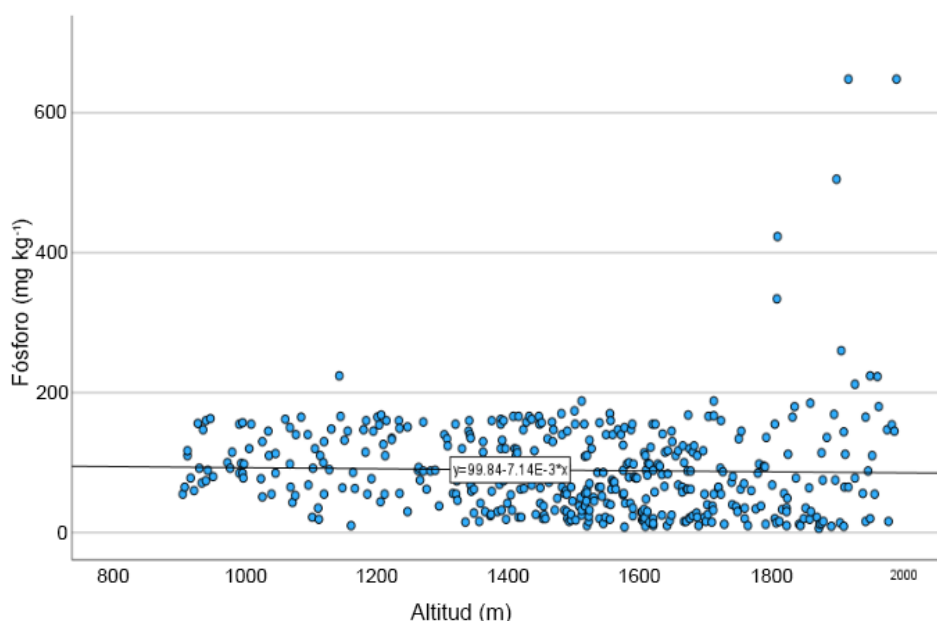


Figura 5. Relación entre la concentración de fósforo (P) en el suelo y la altitud.

Después del nitrógeno, el fósforo (P) suele ser el nutriente más limitante para la producción de cultivos. Es un macronutriente con una baja tasa de suministro en el suelo y una retención o biodisponibilidad notablemente baja (Howell *et al.*, 2016). Debido a los exudados radiculares, la solubilidad del P en el suelo puede afectar a algunas plantas (Campos-Janegitz *et al.*, 2017). Diferentes especies de plantas, e incluso cultivares de la misma especie, pueden mostrar variabilidad en el crecimiento debido a la concentración de fósforo (Akhtar *et al.*, 2016). Por lo tanto, el fósforo se añade en cantidades mucho mayores de las que el cultivo puede eliminar. El calentamiento del suelo también puede aumentar la disponibilidad de fósforo al oxidar parcialmente el fósforo orgánico del suelo. Las prácticas agrícolas de tala y quema provocan un aumento significativo de las reservas de fósforo (Hamer *et al.*, 2013). Esto podría explicar la mayor concentración de fósforo en las zonas bajas, donde la incidencia de incendios es menor.

Los resultados de este estudio revelaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de potasio. Este nutriente disminuye con el aumento de la altitud, con una correlación negativa de $r = -0.34$ ($p < 0.05$) (Figura 6). Los valores de potasio soluble inferiores a 150 mg kg^{-1} se consideran bajos, como sería el caso de la zona alta con 118.0 mg kg^{-1} , mientras que las zonas media (155.8 mg kg^{-1}) y baja (161.8 mg kg^{-1}) se encontraban en la concentración media de potasio (Cuadro 2). Según Howell *et al.* (2016), el cultivo intensivo, la escorrentía, la lixiviación y la erosión del suelo conducen a la deficiencia de potasio en el suelo, lo que provoca un retraso en el crecimiento y actividades fisiológicas limitadas de la planta.

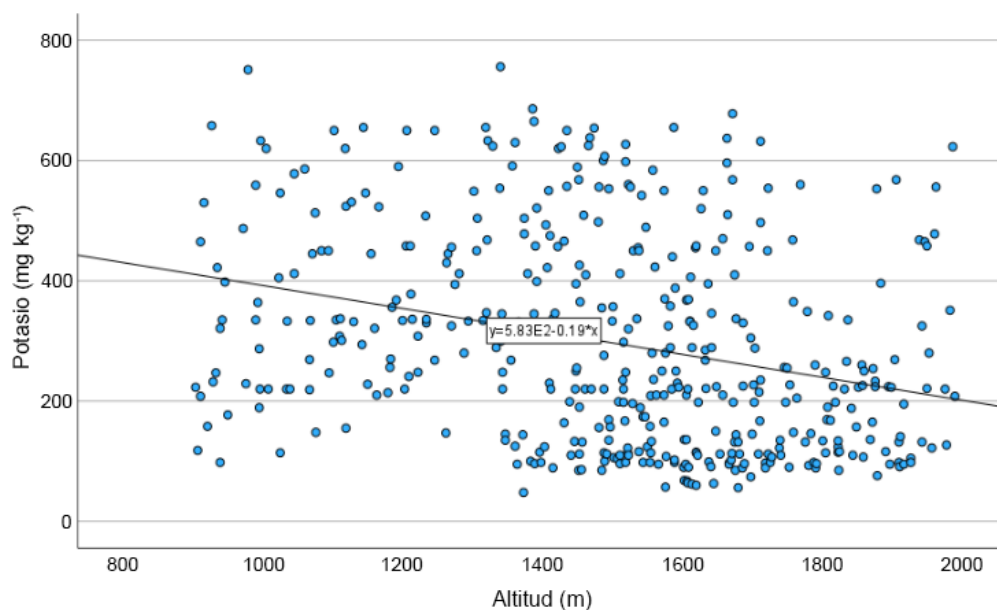


Figura 6. Relación entre la concentración de potasio (K) en el suelo y la altitud.

Las reservas medias de K en el suelo son generalmente grandes, pero la mayoría de ellas no están disponibles para las plantas. Olaniyan *et al.* (2022) afirmaron que los factores físicos, químicos, mineralógicos y biológicos, en particular, la microbiota del suelo, influyen en la liberación de potasio de los minerales del suelo mediante procesos de intercambio catiónico y disolución. En este sentido, el pH y la acidez del suelo desempeñan un papel clave en la liberación de K de los minerales arcillosos, lo que está relacionado con los hallazgos de este estudio, ya que se encontraron valores bajos de potasio en los suelos de las zonas más bajas, donde hay más acidez del suelo.

Recomendación de aplicación de fertilizantes

Sobre la base de un análisis exhaustivo de la fertilidad del suelo en el cultivo del café a diversas altitudes, se propuso la fertilización inorgánica (Cuadro 3). Este programa de fertilización está destinado a las parcelas de cultivo.

Si bien la fertilización orgánica del café según la edad del cultivo sería de 3 kg planta⁻¹, dependiendo de la edad de la plantación, a mayor edad hay mayor desarrollo, y mayor necesidad de abono orgánico para cubrir las necesidades nutricionales.

Cuadro 3. Recomendaciones para la fertilización del café con macronutrientes del suelo (N-P-K) en relación con la altitud.

| Altitud (m) | N g por planta | P ₂ O ₅ g por planta | K ₂ O g por planta |
|-------------------|-------------------|---|----------------------------------|
| 900–1400 (Bajo) | 120 | 60 | 200 |
| 1401–1700 (Medio) | 120 | 100 | 200 |
| 1701–2000 (Alto) | 120 | 100 | 280 |

Impacto de la fertilización del suelo en la emisión de N₂O

Se encontraron diferencias estadísticas significativas en la explotación experimental elegida para evaluar el impacto de la fertilización del suelo sobre las emisiones de N₂O, cuando se comparó la dosis baja de fertilización mineral frente a la de fertilización orgánica.

Según los análisis de N₂O, los cafetales fertilizados con abonos minerales emiten al medio ambiente entre 300 y 1142 mg de N₂O m⁻², mientras que los cafetales fertilizados con materia orgánica registraron flujos inferiores a 300 mg de N₂O m⁻², independientemente del tipo y cantidad de materia orgánica utilizada (Figura 7). Además, Noponen *et al.* (2012) constataron que la fertilización orgánica aporta menos emisiones de N₂O al medio ambiente. Estos autores indicaron que la fertilización nitrogenada podría contribuir hasta en un 50 % a la emisión de N₂O, lo cual se corrobora aquí, ya que los caficultores utilizan mayoritariamente la urea como fuente de nitrógeno para fertilizar sus cafetales y, en muchos casos, sin considerar un análisis previo del suelo, afectando la sostenibilidad ambiental de estos ecosistemas y contribuyendo a la emisión de gases de efecto invernadero y al cambio climático. Asimismo, Martinson *et al.* (2013)

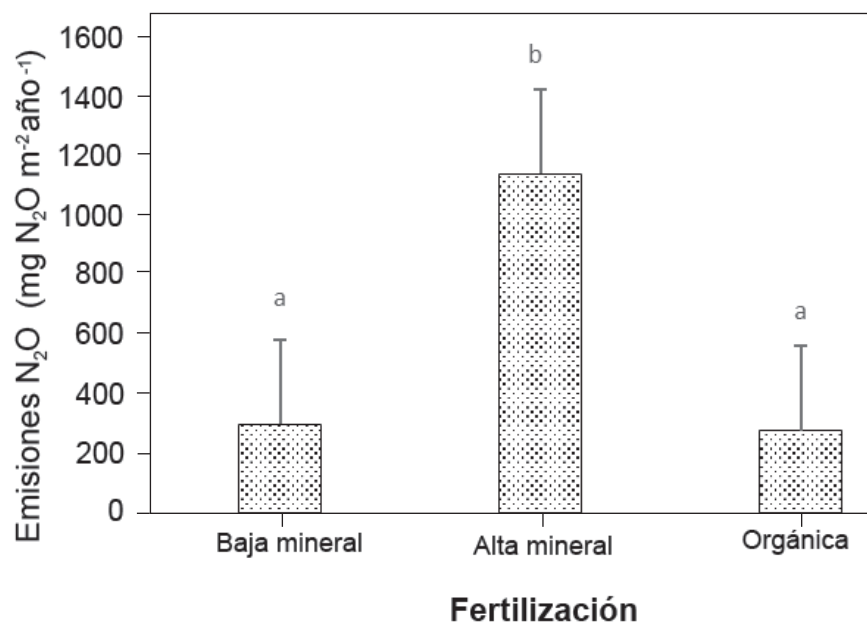


Figura 7. Emisiones de N₂O en cafetales de fertilización mineral (dosis altas y bajas), y fertilización orgánica.

informaron que la adición de nitrógeno genera un aumento de las emisiones de N₂O. Verchot *et al.* (2006) informaron que una fertilización nitrogenada elevada en los cultivos de café puede emitir hasta 7 kg de N₂O ha⁻¹ y⁻¹. Si elevamos estos datos de emisión de N₂O a la escala de una hectárea, los resultados para los cafetales con altas dosis de fertilización mineral alcanzarían los 11 kg ha⁻¹ y⁻¹ de emisión de N₂O, lo que demuestra que cuanto más fertilizante se utiliza, más emisiones de gases se producen. Por otra parte, los agricultores de áreas vecinas al presente estudio utilizan altas dosis de fertilizantes nitrogenados como la urea porque, según ellos, estas cantidades elevadas dan lugar a mayores rendimientos en sus parcelas de café. Sin embargo, según Tully *et al.* (2013), la forma y cantidad de N que se aplica pueden influir diferencialmente en una mayor lixiviación de los fertilizantes minerales y, como se observa en estos resultados, en las mayores emisiones de N₂O al medio ambiente.

CONCLUSIONES

Se observaron cambios en el estado nutricional del suelo a lo largo de un gradiente andino en cafetales del sur de Ecuador. Esto se debe a la alta susceptibilidad de estos suelos a la erosión, principalmente por sus fuertes pendientes que favorecen la acumulación de nutrientes en las tierras bajas. Una tasa elevada de fertilización mineral mejora rápidamente la productividad de los cultivos de café; sin embargo, el impacto ambiental es mayor debido a las elevadas emisiones de N₂O. Cuando se utiliza la fertilización orgánica, la asimilación de nutrientes es más lenta, pero se reducen las

emisiones de N_2O al medio ambiente. Por lo tanto, la fertilización orgánica sería más sostenible desde el punto de vista medioambiental.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a los caficultores locales por su activa participación en el proyecto, así como a los directivos de la Federación Regional de Asociaciones de Pequeños Caficultores Ecológicos del Sur del Ecuador (FAPECAFES). También damos las gracias al Ing. Mauricio Muñoz, Gerente del Proyecto SWISSCONTACT, por su apoyo técnico y a la *Universidad Técnica Particular de Loja* (UTPL) por el respaldo dado a esta investigación y a la publicación del trabajo.

REFERENCIAS

- Akhtar MS, Oki Y, Nakashima Y, Adachi T, Nishigaki M. 2016. Phosphorus stress-induced differential growth, and phosphorus acquisition and use efficiency by spring wheat cultivars. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 47 (1): 15–27. <https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1232089>
- Arteaga-Marín J, Mejía-Veintimilla D, Ochoa-Cueva P. 2022. Estimación de la producción de sedimentos por prácticas de manejo de suelos en una cuenca transfronteriza. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 38: 1–12. <https://doi.org/10.20937/rica.54315>
- Bahr E, Hamer U, Chamba-Zaragocin D, Makeschin F. 2013. Different fertilizer types affected nitrogen and carbon cycling in eroded and colluvial soils of Southern Ecuador. *Agricultural Sciences* 4 (12): 19–32. <https://doi.org/10.4236/as.2013.412a002>
- Benavides-Muñoz H, Arias-Zari J, Fries A, Sánchez-Paladines J, Gallegos-Reina A, Hernández-Ocampo R, Ochoa-Cueva P. 2020. *Management of hydrological systems*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA. 144 p.
- Bray RH, Kurtz LT. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59 (1): 39–45. <https://doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>
- Burneo-Valdivieso JI, Capa-Mora ED, Jiménez-Álvarez LS, Ochoa-Cueva P. 2017. Caficultura, un espacio de encuentro entre la academia y el sector productivo. +E: *Revista de Extensión Universitaria* (7): 290–295.
- Campos-Janegitz M, Helene Martins AR, Rosolem CA. 2017. Cover crops and soil phosphorus availability. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 48 (10): 1240–1246. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1341918>
- Capa-Mora ED, Pérez-Esteban J, Masaguer A. 2015. Unsustainability of recommended fertilization rates for coffee monoculture due to high N_2O emissions. *Agronomy for Sustainable Development* 35 (4): 1551–1559. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0316-z>
- Cheng K, Pan G, Smith P, Luo T, Li L, Zheng J, Zhang X, Han X, Yan M. 2011. Carbon footprint of China's crop production—An estimation using agro-statistics data over 1993–2007. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 142 (3–4): 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.05.012>
- De Bauw P, Van Asten P, Jassogne L, Merckx R. 2016. Soil fertility gradients and production constraints for coffee and banana on volcanic mountain slopes in the East African Rift: a case study of Mt. Elgon. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 231: 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.036>
- Hamer U, Potthast K, Burneo JI, Makeschin F. 2013. Nutrient stocks and phosphorus fractions in mountain soils of Southern Ecuador after conversion of forest to pasture. *Biogeochemistry* 112 (1–3): 495–510. <https://doi.org/10.1007/s10533-012-9742-z>
- Howell DM, Das Gupta S, Pinno BD, MacKenzie MD. 2016. Reclaimed soils, fertilizer, and bioavailable nutrients: determining similarity with natural benchmarks over time. *Canadian Journal of Soil Science* 97 (2): 149–158. <https://doi.org/10.1139/cjss-2016-0069>
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2021. *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua - ESPAC*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Quito, Ecuador. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/> (Retrieved: March 2022).

- Jiménez LS, Mezquida ET, Benito-Capa M, Rubio-Sánchez A. 2007. Cambio en las propiedades del suelo por transformación de áreas boscosas en pastizales en Zamora-Chinchipec (Ecuador). Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales 22: 65–70.
- Koehler B, Corre MD, Veldkamp E, Wullaert H, Wright SJ. 2009. Immediate and long-term nitrogen oxide emissions from tropical forest soils exposed to elevated nitrogen input. *Global Change Biology* 15 (8): 2049–2066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01826.x>
- Loftfield N, Flessa H, Augustin J, Beese F. 1997. Automated gas chromatographic system for rapid analysis of the atmospheric trace gases methane, carbon dioxide, and nitrous oxide. *Journal of Environmental Quality* 26 (2): 560–564. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600020030x>
- López-Báez W, Castro-Mendoza I, Salinas-Cruz E, Reynoso-Santos R, López-Martínez J. 2016. Propiedades de los suelos cafetaleros en la Reserva de la Biósfera El Triunfo, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7 (3): 607–618.
- 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.
- Martinson GO, Corre MD, Veldkamp E. 2013. Responses of nitrous oxide fluxes and soil nitrogen cycling to nutrient additions in montane forests along an elevation gradient in southern Ecuador. *Biogeochemistry* 112 (1–3): 625–636. <https://doi.org/10.1007/s10533-012-9753-9>
- Morales-Ramos V, Escamilla-Prado E, Ruiz-Carbajal RA, Pérez-Sato JA, Velázquez-Morales JA, Servín-Juárez R. 2020. On the soil-bean-cup relationships in *Coffea arabica* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100 (15): 5434–5441. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10594>
- Noponen MRA, Edwards-Jones G, Hagggar JP, Soto G, Attarzadeh N, Healey JR. 2012. Greenhouse gas emissions in coffee grown with differing input levels under conventional and organic management. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 151: 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.01.019>
- Ochoa PA, Chamba YM, Arteaga JG, Capa-Mora ED. 2017. Estimation of suitable areas for coffee growth using a GIS approach and multicriteria evaluation in regions with scarce data. *Applied Engineering in Agriculture* 33 (6): 841–848. <https://doi.org/10.13031/aea.12354>
- Olaniyan FT, Alori ET, Adekiya AO, Ayorinde BB, Daramola FY, Osemwegie OO, Babalola, OO. 2022. The use of soil microbial potassium solubilizers in potassium nutrient availability in soil and its dynamics. *Annals of Microbiology* 72: 45. <https://doi.org/10.1186/s13213-022-01701-8>
- Pastor-Mogollón J, Martínez A. 2009. Variación de la actividad biológica del suelo en un transecto altitudinal de la sierra de San Luis, estado Falcón. *Agronomía Tropical* 59 (4): 469–479.
- Ponce-Vaca LA, Orellana-Suarez KD, Acuña-Velásquez IR, Alfonso-Alemán JL, Fuentes-Figueroa T. 2018. Situación de la caficultura ecuatoriana: perspectivas. *Revista Estudios del Desarrollo Social: Cuba y América Latina* 6 (1): 307–325.
- Quichimbo P, Jiménez L, Veintimilla D, Tischer A, Günter S, Mosandl R, Hamer U. 2017. Forest site classification in the Southern Andean region of Ecuador: a case study of pine plantations to collect a base of soil attributes. *Forest* 8 (12): 473. <https://doi.org/10.3390/f8120473>
- Soil Survey Staff. 2011. Soil Survey Laboratory Information Manual. Soil Survey Investigations Report No. 45, Version 2.0. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Lincoln, NE, USA. <https://www.nrcs.usda.gov/sites/default/files/2022-10/SSIR45.pdf> (Recuperado: marzo 2022)
- Tully KL, Wood SA, Lawrence D. 2013. Fertilizer type and species composition affect leachate nutrient concentrations in coffee agroecosystems. *Agroforestry Systems* 87 (5): 1083–1100. <https://doi.org/10.1007/s10457-013-9622-0>
- Valarezo-Torres GE, Carrión-Paladines HV, Capa-Mora ED, Jiménez-Álvarez LS. 2021. Soil quality/health indicators in a disturbed ecosystem in southern Ecuador. *Soil Science Annual* 72 (2): 135991. <https://doi.org/10.37501/soilsa/135991>
- Vélez-Mora DP, Gusmán E, Espinosa CI, Quintana-Ascencio PF. 2022. Changes in climate, grazing pressure and nutrient inputs affect the structural integrity and functioning of Andean

- shrublands. *Plant Ecology and Diversity* 15 (5–6): 309–327. <https://doi.org/10.1080/17550874.2022.2122753>
- Venegas-Sánchez S, Orellana-Bueno D, Pérez-Jara P. 2018. La realidad ecuatoriana en la producción de café. *Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento* 2 (2): 72–91.
- Verchot LV, Hutabarat L, Hairiah K, van Noordwijk M. 2006. Nitrogen availability and soil N₂O emissions following conversion of forests to coffee in southern Sumatra. *Global Biogeochemical Cycles* 20 (4). <https://doi.org/10.1029/2005GB002469>
- Wilcke W, Valladarez H, Stoyan R, Yasin S, Valarezo C, Zech W. 2003. Soil properties on a chronosequence of landslides in montane rain forest, Ecuador. *Catena* 53 (1): 79–95. [https://doi.org/10.1016/S0341-8162\(02\)00196-0](https://doi.org/10.1016/S0341-8162(02)00196-0)
- Zebarth BJ, Forge TA, Goyer C, Brin LD. 2015. Effect of soil acidification on nitrification in soil. *Canadian Journal of Soil Science* 95 (4): 359–363. <https://doi.org/10.4141/cjss-2015-040>

Agrociencia



MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NATIVE MAIZE POPULATIONS OF THE RATÓN RACE FROM COAHUILA, MEXICO

Delia Margarita **Olvera-Aguilar**¹, Froylán **Rincón-Sánchez**^{1*}, Norma Angélica **Ruiz-Torres**¹,
Juan Manuel **Martínez-Reyna**¹, César Daniel **Petroli-Leguiza**²

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

² International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). Carretera Mexico-Veracruz km 45, El Batán, Texcoco, State of Mexico, Mexico. C. P. 56237.

* Author for correspondence: frincon@uaaan.edu.mx

ABSTRACT

Because of its wide distribution and adaptation, the maize Ratón race (*Zea mays* L.) is an important component of the diversity in the state of Coahuila, Mexico. The objective of the present research was to perform a morphological characterization of 83 native populations of the Ratón race and identify a subset that will represent diversity. Populations were evaluated in replicated experiments at two different locations with two planting dates per location. Twenty-six quantitative characters of the plant, tassel, ear and grain were recorded, and 14 additional characters (indices) were calculated as relationships among characters. Phenotypic diversity was examined by principal component and cluster analyses. Differences ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.05$) among environments were found for 28 characters and ($p \leq 0.01$) among populations for all characters, due to variation in environments and diversity among populations, respectively. Also, differences were found ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.05$) in 38 of the 40 characters in the populations \times environments interaction, as a differential response of the populations in the environments. Based on the repeatability index ($r > 1.0$), 10 characters and nine indices less influenced by the environment were selected for classification. The first two components explained 53.3 % of the total variation and it was established that the vegetative, ear and tassel characters were the most important in describing the variation; this allowed to identify a pattern of diversity associated with the area of adaptation of populations in low - intermediate - transition areas, which reveals that maize variation is closely related to altitude, and temperature and humidity gradients. Based on the dendrogram, a representative subset of the diversity of the Ratón race in Coahuila was obtained, made up of 13 of 83 populations (15.7 %).

Keywords: *Zea mays* L., repeatability index, genetic diversity, representative subset of diversity.

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) has been considered a crop of great importance because it is one of the main sources of food, raw material for fodder, and industry. In Mexico, 59 maize races have been described according to the similarity of their morphological characteristics (Sánchez *et al.*, 2000).

Citation: Olvera-Aguilar DM, Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA, Martínez-Reyna JM, Petroli-Leguiza CD. 2023. Morphological characterization of native maize populations of the Ratón race from Coahuila, Mexico.

Agrociencia 57(5): 953-980.
doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2834

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: July 01, 2022.
Approved: March 23, 2023.

Published in Agrociencia:
July 06, 2023.

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



In this country, much of the maize diversity is found in the form of native populations in farmers' fields, in a wide range of environments, from sea level to altitudes above 2900 m, and from humid tropical environments to semi-desert conditions (Ruiz-Corral *et al.*, 2008). The diversity observed in maize race traits is the result of farmer-directed selection aimed at meeting their consumption, socioeconomic, and production needs, in addition to adaptation to specific environmental conditions (Rincón-Sánchez and Ruiz-Torres, 2018).

The measurement and analysis of morphoagronomic traits of native maize populations are very useful to know the phenotypic variation among and within races and among populations, and at the same time, to evaluate their stability in the environments (Flores-Pérez *et al.*, 2015; Govindaraj *et al.*, 2015). Diversity studies in populations considered as variants of a race are of great relevance for defining conservation and use strategies, as well as for the identification of alleles that contribute to improve productivity within regions (Rocandio-Rodríguez *et al.*, 2014; Rincón-Sánchez and Ruiz-Torres, 2018). According to passport data, the diversity of native maize in the state of Coahuila is represented by seven races: Celaya, Cónico Norteño, Elotes Cónicos, Olotillo, Ratón, Tuxpeño, and Tuxpeño Norteño.

In terms of frequency, the populations identified as belonging to the Ratón race stand out (35.2 %), in relation to Cónico Norteño (26.3 %), Tuxpeño Norteño (19.0 %), and Tuxpeño (10.3 %), distributed in the different agro-climatic conditions, mainly in rainfed or unirrigated areas. These are recognized for attributes such as drought tolerance, yield stability and earliness (Rincón-Sánchez *et al.*, 2010; Rincón-Sánchez and Ruiz-Torres, 2015). Sánchez (2011) classifies the Ratón race within the early tropical maize, which is distributed in northeastern Mexico, at altitudes between 100 and 1300 m; they are short cycle plants with great adaptability and low sensitivity to photoperiod. Available information indicates that the Ratón race is distributed in the states of Tamaulipas, Nuevo Leon and Coahuila, and representative populations of this race have been reported in Chihuahua, Veracruz, San Luis Potosi, Durango, and Zacatecas (CONABIO, 2011). The present research is part of the analysis of the diversity of native maize in the state of Coahuila, Mexico.

In this context, the objectives of this research were to study the diversity of native populations of the Ratón race of Coahuila, based on morphological traits, and to define a representative subset of populations that concentrates the diversity of the race. This study was carried out under the assumption that morphological characterization will allow understanding the diversity between and within populations, and that, based on their interrelationships, it will allow defining a subset that represents the diversity of the Ratón race in Coahuila.

MATERIALS AND METHODS

The genetic material consisted of 83 native populations of the maize Ratón race (R), collected in the state of Coahuila, Mexico (Rincón-Sánchez *et al.*, 2010), and in later collecting works (unpublished), 70.0 % of which are creamy white kernels and the

rest, mainly yellow variants. In 35.0 % of the populations, variants of other races such as Celaya (RxC) (1), Cónico Norteño (RxCN) (4), Elotes Cónicos (RxEC) (1), Olotillo (RxO) (2), Tuxpeño (RxT) (14), and Tuxpeño Norteño (RxTN) (7) were found.

Populations were grouped according to the altitude of the collection site into low (B) (< 1000 m), intermediate (I) (1001 - 1800 m), and transition (T) (> 1800 m) areas, with 29, 50, and 4, respectively. The agronomic evaluation was conducted at two different locations under irrigation conditions: General Cepeda, Coahuila in 2020 (25° 26' N; 101° 27' W, altitude 1450 m, mean annual temperature of 18.4 °C, and mean annual precipitation of 279.9 mm), and at El Mezquite, Galeana, Nuevo León in 2021 (25° 18' N; 101° 16' W, altitude 1890 m, mean annual temperature of 15.5 °C, and mean annual precipitation of 416.4 mm).

The experimental material was established under an incomplete block design with α -lattice arrangement, in two sowing dates per location, with two replications in furrows of 4 m long at a distance between plants of 0.19 m, and between furrows of 0.85 m. The combination of locations \times sowing dates was considered as environments. The phenological and agronomic data obtained as average per plot were male and female flowering (FM, FF) (d), floral asynchrony (ASI) (d), prolificacy (ears plant⁻¹), and grain yield (Mg ha⁻¹).

The morphological characterization was carried out with average values of plants per plot using some of the descriptors for maize (IBPGR, 1991). Three representative plants from each plot were measured regarding: plant height (APTA) and ear (AMAZ) (cm), length (LHOJA) and width of leaf (AHOJA) (cm) of ear, number of leaves above ear (HAMAZ) (cm), leaf area (AF) (cm²) of ear, peduncle tassel length (LPED) (cm), length of branched part (LRAM), length of central rachis (LRC) (cm), total tassel length (LESP) (cm), and number of primary spikelets (NESP). The indices: APTA/AMAZ (APTAMAZ), AMAZ/APTA (AMAZPTA), LRAM/NESP (LRAMESP) (cm·num⁻¹), LRAM/LESP (LRAMESP), LPED/LESP (LPEDESP), and LRC/LESP (LRCLESP) were also determined.

Ear and grain data were obtained from three representative and complete ears from each plot: length (LMAZ), ear diameter (DMAZ), and cob diameter (DOLO) (cm), number of rows (NHIL), grains per row (GHIL), ear weight (PMAZ) (g), ear surface (SUPMAZ) (cm³), and shelling percentage (DESG). The following indices were computed: DMAZ/LMAZ (DLMAZ), DOLO/DMAZ (DOLOMAZ).

From 10 consecutive kernels from the center of each ear, average values of kernel length (LG), kernel width (AG), kernel thickness (EG) (cm), and kernel volume (VG) (cm³) were obtained. Additionally, the weight of 100 seeds (P100S) (g) expressed at 12 % moisture was obtained. The following indices were obtained: AG/LG (ALGRA), EG/LG (ELGRA), and EG/AG (EAGRA). The ear and grain characters and the relationship between them (indices) are described in IBPGR (1991) and Sánchez *et al.* (1993).

Analysis of variance was performed using the PROC GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., 2018), where the environments, populations, and the populations \times environments interaction were considered as fixed effects, all other effects in the model as random.

For the selection of characters used in the classification, the repeatability criterion (r) was used: $r = \sigma_p^2 / \sigma_A^2 + \sigma_{p \times A}^2$ where σ_p^2 , σ_A^2 and $\sigma_{p \times A}^2$ are the estimators of the variance components of populations, environments, and the populations \times environments interaction, respectively.

For the classification analysis, it was considered as a decision rule to accept those characters whose r value was greater than one ($r > 1.0$) (Sánchez *et al.*, 1993). The estimation of variance components was performed with the PROC MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., 2018).

The averages of 19 selected characters were standardized by subtracting the mean and dividing by the standard deviation before the calculation of the association among populations. Maize diversity was explored by principal component analysis (ACP) and cluster analysis, both performed with R software (R Core Team, 2021). From the ACP results, a biplot was constructed using the first two principal components. For the second analysis, a distance coefficient (dissimilarity) was calculated, defined by the complement of Pearson's correlation coefficient between pairs of populations ($d_{ij} = 1 - r$). With the resulting matrix, a hierarchical cluster analysis was performed and a dendrogram was generated using the hclust function of the Factoextra package of the R software (Kassambara and Mundt, 2020) through the unweighted paired groups method using arithmetic averages (UPGMA).

Based on the dendrogram, a modified stratified and directional sampling was performed (Rincón-Sánchez and Ruiz-Torres, 2018). This process was initiated by discriminating populations with the lowest values of distance between pairs of populations within groups, thus obtaining an initial representative subset of the total populations. For the selection of populations, in each routine images of ears obtained from each experimental unit were used to corroborate the presence of other races, so that those populations absent of combinations with other races were identified. Subsequently, a new dendrogram was obtained to discriminate populations within those retained in the previous step.

RESULTS AND DISCUSSION

Among evaluation environments (locations \times sowing dates) a differentiated performance was found ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$) in 28 of the 40 characters studied, except in ASI, APTA, AF, LRAM, LRAM/NESP, LRAM/LESP, LPED/LESP, LRC/LESP, HIL, DOLO, EG/AG, and AG/LG (Table 1), as a result of differences in environmental conditions, sowing dates, and altitude of the study localities. Among populations, differences ($p \leq 0.01$) were found in all characters, as a result of variation within the racial group. In the case of the populations \times environments interaction, differences ($p \leq 0.01$ and 0.05) were found in 38 of the 40 characters studied, except in ASI and LRAM/NESP, as a result of the differential response of the populations in the tested environments.

The variation among the populations evaluated is attributable in part to the fact that they come from three different areas of adaptation, at altitudes from 245 to 1834 m:

Table 1. Variance component estimators for populations, environments, and populations × environments interaction, and estimated repeatability coefficients in native populations of the Ratón maize race.

| Characters | σ_p^2 | σ_a^2 | $\sigma_{p \times a}^2$ | r |
|---|--------------|--------------|-------------------------|--------------------|
| Male flowering (FM) (d) | 33.6787 | 294.7400 | 1.9672 | 0.114 |
| Female flowering (FF) (d) | 38.4565 | 287.1000 | 2.2689 | 0.133 |
| Floral asynchrony (ASI) (d) | 0.2920 | 0.0582 | 0.1465 | 1.427 [†] |
| Prolificacy (PRO) | 0.0011 | 0.0029 | 0.0009 | 0.294 |
| Grain yield (REND) (Mg ha ⁻¹) | 0.2953 | 0.5987 | 0.3504 | 0.311 |
| Plant height (APTA) (cm) | 370.6300 | 24.2907 | 88.7929 | 3.277 [†] |
| Ear Height (AMAZ) (cm) | 348.0100 | 241.1400 | 57.1591 | 1.167 [†] |
| AMAZ/APTA (AMAZPTA) | 0.0017 | 0.0047 | 0.0004 | 0.326 |
| APTA/AMAZ (APTAMAZ) | 0.0189 | 0.0472 | 0.0087 | 0.338 |
| Leaf length (LHOJA) of ear (cm) | 21.1419 | 20.7257 | 11.3506 | 0.659 |
| Leaf width (AHOJA) of ear (cm) | 0.1765 | 0.1916 | 0.0465 | 0.741 |
| Area of the leaf (AF) of the ear (cm ²) | 2410.9300 | 463.0300 | 1104.0100 | 1.539 [†] |
| Number of leaves above the ear (HAMAZ) | 0.0778 | 0.0851 | 0.0201 | 0.740 |
| Number of primary spikelets (NESP) | 4.0172 | 1.2366 | 0.8620 | 1.914 [†] |
| Peduncle tassel length (LPED) (cm) | 2.9131 | 1.4392 | 0.5837 | 1.440 [†] |
| Length of branched part (LRAM) (cm) | 1.6472 | 0.0033 | 0.6249 | 2.622 [†] |
| Central rachis length (LRC) (cm) | 2.1734 | 0.8665 | 0.8594 | 1.259 [†] |
| Total tassel length (LESP) (cm) | 7.4522 | 5.0227 | 3.9007 | 0.835 |
| LRAM/NESP (LRAMESP) (cm-num ⁻¹) | 0.0063 | 0.0068 | 0.0021 | 0.707 |
| LPED/LESP (LPEDESP) | 0.0003 | 0.0001 | 0.0001 | 1.763 [†] |
| LRAM/LESP (LRCLESP) | 0.0005 | 0.0000 | 0.0001 | 4.036 [†] |
| LRC/LESP (LRCLESP). | 0.0002 | 0.0000 | 0.0001 | 2.452 [†] |
| Number of rows (HIL) | 0.8147 | 0.0458 | 0.1348 | 4.512 [†] |
| Number of grains per row (GHIL) | 2.5521 | 5.5517 | 0.9913 | 0.390 |
| Ear weight (PMAZ) (g) | 113.1000 | 1020.4800 | 200.4300 | 0.093 |
| Ear length (LMAZ) (cm) | 0.2521 | 1.2822 | 0.4481 | 0.146 |
| Ear diameter (DMAZ) (cm) | 0.0362 | 0.0465 | 0.0133 | 0.605 |
| Cob diameter (DOLO) (cm) | 0.0391 | 0.0007 | 0.0056 | 6.134 [†] |
| Ear surface (SUPMAZ) (cm ²) | 83.7371 | 638.0300 | 166.2000 | 0.104 |
| DMAZ/LMAZ (DLMAZ) | 0.0004 | 0.0001 | 0.0002 | 1.509 [†] |
| DOLO/DMAZ (DOLOMAZ) | 0.0008 | 0.0005 | 0.0001 | 1.447 [†] |
| Shelling percentage (DESG) | 0.0006 | 0.0003 | 0.0001 | 1.317 [†] |
| Grain length (LG) (cm) | 0.0018 | 0.0060 | 0.0011 | 0.256 |
| Grain width (AG) (cm) | 0.0014 | 0.0024 | 0.0006 | 0.481 |
| Grain thickness (EG) (cm) | 0.0002 | 0.0004 | 0.0001 | 0.347 |
| Grain volume (VG) (cm ³) | 0.0007 | 0.0047 | 0.0006 | 0.142 |
| AG/LG (ALGRA) | 0.0018 | 0.0001 | 0.0003 | 4.151 [†] |
| EG/LG (ELGRA) | 0.0003 | 0.0001 | 0.0002 | 1.164 [†] |
| EG/AG (EAGRA) | 0.0005 | 0.0000 | 0.0003 | 1.761 [†] |
| Weight of 100 seeds (P100S) (g) | 3.1457 | 22.3264 | 3.1457 | 0.257 [†] |

[†] = Characters selected for having r > 1; σ_p^2 , σ_a^2 and $\sigma_{p \times a}^2$ = variance components in populations, environments, and the populations × environments interaction, respectively; r = repeatability = $r = \sigma_p^2 / (\sigma_p^2 + \sigma_a^2 + \sigma_{p \times a}^2)$.

Low (34.9 %), Intermediate (60.2 %), and Transition-High (4.8 %). Ruiz-Corral *et al.* (2008) reported a range of adaptations of the Ratón race that varies from 84 to 1300 m, while Sánchez (2011) mentions that it is distributed at altitudes between 100 and 1300 m. On the other hand, 35.0 % of these populations show genetic infiltration from other races, mainly Tuxpeño, Tuxpeño Norteño, and Cónico Norteño, as a consequence of seed exchange among farmers and interbreeding by open pollination. In addition, genetic variation is also attributable to natural and artificial selection processes through multiple generations, practiced by farmers for traits of interest (Rincón-Sánchez *et al.*, 2010; Martínez-Sánchez *et al.*, 2017).

Repeatability analysis

The genotype × environment interaction is a determining factor in the numerical classification of germplasm, therefore, among other criteria, repeatability indices (r) have been used to identify those traits that are less affected by the environment (Sánchez *et al.*, 1993). These authors point out that vegetative characters are the most affected by environmental factors and their interaction, compared to ear and tassel characters, which are considered more useful in the classification of maize populations and races. Based on the criterion of repeatability greater than one ($r > 1.0$) and the above elements, 19 characters (11 characters and eight indices) were chosen and used in the classification analyses (Table 1).

The repeatability index greater than one identifies those traits where the proportion of the variance of the populations is greater than the sum of the variance components due to the environments and the populations × environments interaction, that is, traits that are little influenced by the environment, and therefore, useful for the classification of populations of maize races (Sánchez *et al.*, 1993). Rocandio-Rodríguez *et al.* (2014) and Flores-Hernández *et al.* (2022) in studies of high valley maize identified tassel characters (LESP, LRC) and row number similar to those selected in the present work, however, these authors also selected kernel characters (length, width, and thickness) as useful, but in this research, they had repeatability values lower than 0.5.

It is also important to mention that repeatability differs, depending on the nature of the trait, the genetic properties of the population, and the environmental conditions in which the individuals develop (Falconer and Mackay, 1996).

Principal component analysis

The first three principal components (CP) explain 66.9 % of the total variation of the 19 characters identified (Table 2).

The characteristic vectors associated with each principal component are proportional to the correlation coefficient between the original characters and that principal component. Those original characters that had characteristic vectors equal to or greater than 0.5 were considered of greater relevance in explaining the variation among the populations under study, identifying 17 of the 19 characters in the three CPs.

The value of 0.5 was considered in each CP since they are independent. Most of these characters have been reported in other studies of diversity of native maize populations

Table 2. Values and characteristic vectors associated with the first three principal components of the analysis of the characters for morphological description in native populations of the maize Ratón race.

| Characters | Characteristic vectors | | |
|---|------------------------|---------|--------|
| | CP1 | CP2 | CP3 |
| Floral asynchrony (ASI) (d) | 0.536* | 0.314 | -0.133 |
| Plant height (APTA) (cm) | 0.609* | 0.678* | 0.148 |
| Plant height (AMAZ) (cm) | 0.691* | 0.615* | 0.152 |
| Leaf area (AF) (cm ²) | 0.774* | 0.263 | 0.262 |
| Number of primary spikelets (NESP) | 0.776* | 0.325 | -0.242 |
| Peduncle tassel length (LPED) (cm) | -0.540* | 0.552* | -0.039 |
| Length of branched part (LRAM) (cm) | 0.842* | 0.267 | -0.225 |
| Central rachis length (LRC) (cm) | -0.315 | 0.397 | 0.569* |
| LRAM/LESP (LRAMESP) (cm·num ⁻¹) | 0.911* | -0.005 | -0.303 |
| LPED/LESP (LPEDESP) | -0.723* | 0.224 | -0.241 |
| LRC/LESP (LRCLESP) | -0.371 | -0.248 | 0.670* |
| Number of rows (HIL) | -0.016 | 0.412 | 0.704* |
| Cob diameter (DOLO) (cm) | 0.550* | -0.520* | 0.545* |
| DMAZ/LMAZ (DLMAZ) (cm) | 0.203 | -0.415 | 0.502* |
| DOLO/DMAZ (DOLOMAZ) (cm) | 0.504* | -0.700* | 0.269 |
| Shelling percentage (DESG) (%) | -0.786* | 0.187 | -0.239 |
| EG/AG (EAGRA) | -0.217 | 0.407 | 0.398 |
| EG/LG (ELGRA) | 0.055 | -0.405 | 0.073 |
| AG/LG (ALGRA) | 0.249 | -0.810* | -0.288 |
| Characteristic values | 6.254 | 3.878 | 2.585 |
| Explained variance (%) | 32.914 | 20.411 | 13.605 |

*= Characters with the highest association with the respective principal component; CP1, CP2, and CP3 = Principal components 1, 2 and 3, respectively.

(González-Martínez *et al.*, 2018; Rangel-Lucio *et al.*, 2021) and highlighted as important to assess the diversity present among populations at the local level.

In this study, the first two CP were used, which explain 53.3 % of the accumulated variation in the 19 original characters and are the ones that explain the greatest variation. The populations x characters interaction (Figure 1) explains the relationship of the characters with the populations, and their characteristics.

Populations located in the vector direction of a character indicate the close relationship among them (Yan, 2014). The length of the vectors from the origin indicates the variation associated with the character, and the angle between them approaches the correlation coefficient, and therefore, the association between characters: an angle less than 30° indicates a very close relationship, while an independent relationship will be given by an angle close to 90°; an angle of 180° will be representing a negative association (Yan, 2014).

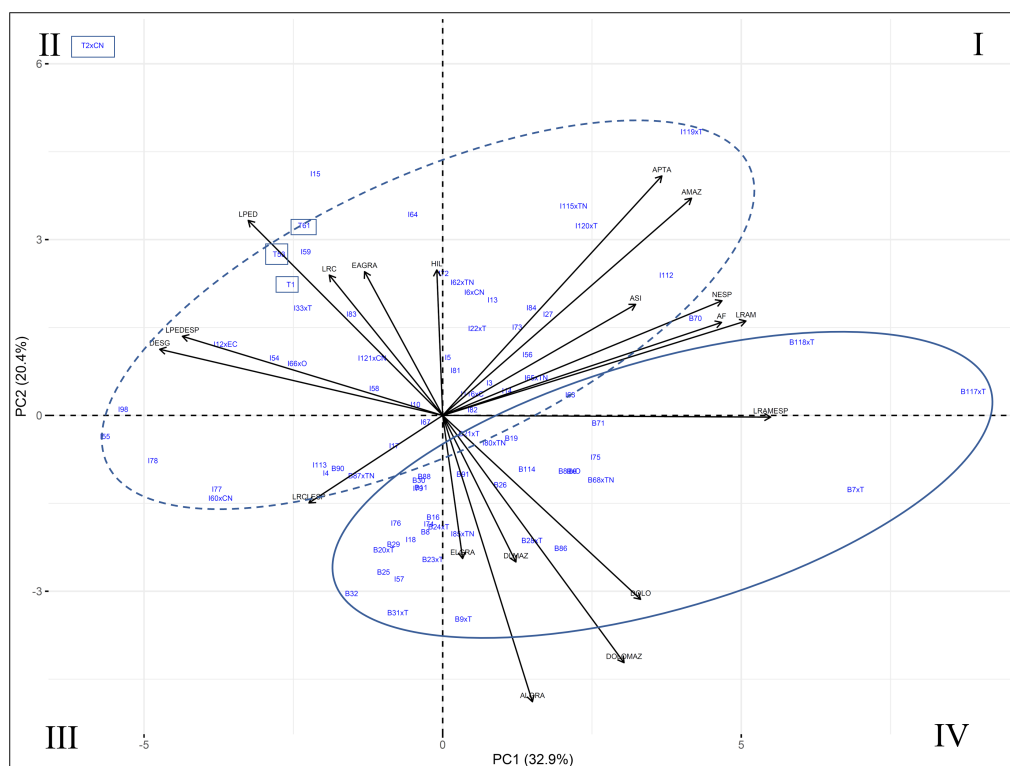


Figure 1. Graphical dispersion of the interaction between populations and characters, based on the first two principal components (CP1, CP2). In the populations, the first character indicates the area of provenance: B=Low, I=Intermediate, and T=Transition; followed by the entry number, and at the end, the combination with another race (“x”): C=Cónico, CN=Cónico Norteño, EC=Elotes Cónicos, O= Olotillo, T=Tuxpeño, and TN=Tuxpeño Norteño; Ellipse solid line = populations from low adaptation areas (< 1000 m); Ellipse dotted line = populations from intermediate adaptation areas (1000 to 1800 m); Rectangles = populations from transitional adaptation areas (> 1800 m).

From the dispersion analysis (Figure 1), it was possible to identify a continuum of variation, basically related to the pattern of the area of origin and adaptation of the populations under study (low - intermediate - transition areas). Similar results were reported by Cabrera-Toledo *et al.* (2019) who also mention that the degree of adaptation to the localities is manifested in the similarity of the populations, associated with different collecting altitudes.

In the direction from intermediate areas to the transition area (> 1000 m) (second quadrant), populations are characterized by higher values peduncle tassel length LPED and DESG, and lower values in DOLO compared to populations in low areas (< 1000 m) (fourth quadrant). Populations with positive values in APTA and AMAZ, AF of ear leaf, LRAM, and NESP of tassel are located in the first quadrant, while those with negative values are located in the opposite direction (third quadrant).

In the group indicated as low areas (Figure 1), populations of the Ratón race were identified in combination with the Tuxpeño and Tuxpeño Norteño races; while in the intermediate areas, in addition to these two races, the combination of the Ratón race with the Celaya, Cónico Norteño, Olotillo, and Elotes Cónicos race was identified. Rincón-Sánchez *et al.* (2010) point out that the combination among races contributes to explain the phenotypic variation among populations and the diversity of maize in the region, originated in part by the exchange of seeds among farmers, genetic recombination through open pollination in later generations, and adaptation to specific environments.

Cluster analysis

The dendrogram (Figure 2) corresponded in general to the pattern observed (Figure 1), where two large groups were also identified, at a distance of 1.1: Group 1, made up of populations from the low adaptation area (41 populations), and Group 2, mainly from the intermediate adaptation area (42 populations).

At a distance of 0.9 units, four subgroups of populations are distinguished, two of them (AB1 and AB2) to Group 1 and two (AI1 and AI2) to Group 2. In the latter, in subgroup AI1, the four populations identified with the transitional adaptation area (> 1800 m) are included. The average values of the characters under study for the four subgroups obtained from the dendrogram analysis are presented (Table 3).

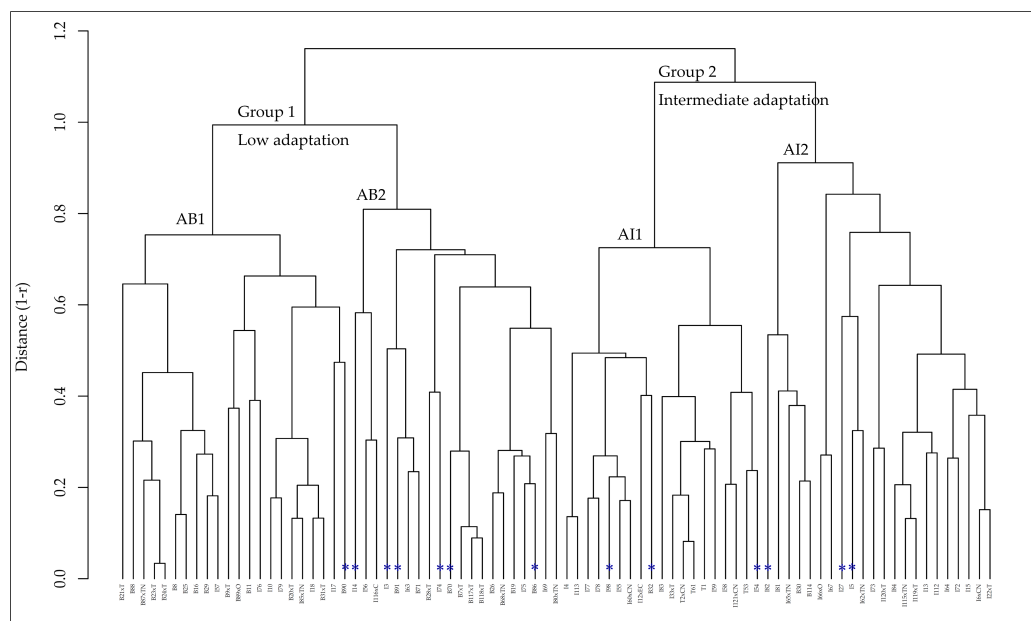


Figure 2. Dendrogram of 83 native populations of the Ratón race of Coahuila, using the correlation complement as distance $(1 - r)$ and the pairwise grouping method based on arithmetic averages (UPGMA); * = Populations of the representative subset of diversity.

Table 3. Averages of the characters evaluated in four groups identified in 83 populations of maize of the Ratón race in Coahuila, México.

| Characters | Groups [†] | | | | Media | DMSH Tukey |
|-------------------------------------|---------------------|----------|----------|----------|--------|---------------|
| | AB1 | AB2 | AI1 | AI2 | | |
| Number of populations | 22 | 20 | 19 | 22 | | |
| Floral asynchrony (ASI) (d) | 1.22 b [¶] | 1.94 a | 1.44 b | 1.82 a | 1.61 | 0.366 |
| Plant height (APTA) (cm) | 187.58 d | 208.31 b | 191.65 c | 213.47 a | 200.25 | 3.796 |
| Plant height (AMAZ) (cm) | 105.48 b | 125.37 a | 104.39 b | 126.69 a | 115.48 | 3.479 |
| Leaf area (AF) (cm ²) | 544.03 b | 589.87 a | 495.51 c | 559.73 b | 547.29 | 16.659 |
| Number of primary spikelets (NESP) | 13.19 b | 16.30 a | 12.73 b | 16.24 a | 14.61 | 0.723 |
| Peduncle tassel length (LPED) (cm) | 20.08 c | 19.86 c | 23.28 a | 21.52 b | 21.18 | 0.655 |
| Length of branched part (LRAM) (cm) | 11.57 b | 13.52 a | 11.04 c | 13.48 a | 12.41 | 0.461 |
| Central rachis length (LRC) (cm) | 27.13 b | 26.69 b | 28.08 a | 26.89 b | 27.20 | 0.668 |
| LRAM/Tassel length (LESP) (cm) | 0.20 b | 0.23 a | 0.18 c | 0.22 a | 0.20 | 0.007 |
| LPED/LESP (LPEDESP) (cm) | 0.34 b | 0.33 c | 0.37 a | 0.35 b | 0.35 | 0.008 |
| LRC/LESP (LRCLESP) (cm) | 0.46 a | 0.44 b | 0.45 b | 0.44 c | 0.45 | 0.009 |
| Number of rows (HIL) | 13.08 a | 13.09 a | 13.36 a | 13.34 a | 13.21 | 0.317 |
| Cob diameter (DOLO) (cm) | 2.69 a | 2.66 a | 2.37 c | 2.45 b | 2.54 | 0.051 |
| DMAZ/LMAZ (DLMAZ) (cm) | 0.34 a | 0.31 b | 0.30 c | 0.31 b | 0.32 | 0.008 |
| DOLO/DMAZ (DOLOMAZ) (cm) | 0.60 b | 0.61 a | 0.56 c | 0.56 c | 0.58 | 0.009 |
| Shelling percentage (DESG) | 0.81 c | 0.80 d | 0.83 a | 0.82 b | 0.82 | 0.006 |
| EG/AG (EAGRA) (cm) | 0.42 c | 0.45 c | 0.46 a | 0.44 b | 0.44 | 0.010 |
| EG/LG (ELGRA) (cm) | 0.33 b | 0.35 a | 0.35 a | 0.32 c | 0.34 | 0.009 |
| AG/LG (ALGRA) (cm) | 0.79 a | 0.79 a | 0.75 b | 0.74 c | 0.77 | 0.014 |

[†] AB1, AB2 = Adaptation to low areas (< 1000 m); AI1, AI2 = Adaptation to intermediate areas (1001 to 1800 m); [¶]Values with the same letter in the row are statistically equal (Tukey $\alpha=0.05$).

The subgroups of low adaptation areas (< 1000 m) were characterized by higher values of DOLO, DLMAZ, DOLOMAZ, ELGRA, and ALGRA. In the case of the subgroups of intermediate areas (AI1 and AI2), they presented populations with higher average values of LPED, LRC, and DESG, and the relationships EAGRA and LPEDESP. That is, these characters distinguish the populations in relation to the pattern associated with the area of adaptation (Figure 1). Differences among subgroups within population groups (low vs. intermediate) are observed with the averages of the characters ASI, AMAZ, NESP, and LRAM, which can be verified with higher values (first quadrant) and vice versa. Populations from altitudes below 1000 m stand out for having higher AF values. These differences, in addition to the intrinsic characteristics of the populations under study and their area of adaptation, are influenced by genetic infiltration, mainly of the Tuxpeño and Tuxpeño Norteño races in the low adaptation area, and in the case of intermediate areas, in addition to these races, the Celaya, Olotillo, Cónico Norteño and Elotes Cónicos races are also involved (Figure 1).

Representative subset

According to the sampling procedure applied from the dendrogram, a subset formed by 13 of the 83 maize populations (15.7 %) was defined, which represents the diversity of the native populations of maize of the Ratón race present in Coahuila. The subset was defined by 8 of 50 (16.0 %) and 5 of 29 (17.0 %) populations from intermediate and low areas, respectively, representing a proportional sampling of the variation (Figure 2).

The populations identified as transition area (> 1800 m) (T2xCN, T61, T1, and T63), located in the dendrogram in subgroup AI1, were not selected for the subset due to the presence of variation associated with the Cónico Norteño race. In a previous study with ear data, Rincón-Sánchez and Ruiz-Torres (2018) applied this methodology and defined a subset of 18 out of 77 populations of native maize (23.4 %), where at least one population of the least represented races was included, which allowed defining a subset that concentrates the types of native maize at the regional level.

The means of some of the morphological characteristics used in the classification of importance in the subset are presented (Table 4).

Table 4. Means of morphological characters of the representative subset of 13 populations of the Ratón race of Coahuila.

| Characters | Representative subset populations [†] | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | I3 | I5 | I14 | I27 | B32 | I54 | B70 | I74 | I82 | B86 | B90 | B91 | I98 |
| Adaptation area | I | I | I | I | B | I | B | I | I | B | B | B | I |
| Grain type | Sd | Sd | Sd | Sd | Sc | Sd | Sd | Sd | Sd | Sd | Sd | Sd | Sd |
| Grain color | BC | BC | BC | BC | BC | BC | BC | BC | BC | AC | BC | BC | BC |
| Male flowering (d) | 85.9 | 84.1 | 83.5 | 88.9 | 69.8 | 76.0 | 94.0 | 75.8 | 80.6 | 79.6 | 84.3 | 84.1 | 75.4 |
| Female flowering (d) | 88.6 | 85.5 | 84.5 | 90.4 | 72.1 | 76.6 | 98.0 | 76.8 | 82.6 | 81.0 | 86.8 | 85.6 | 76.3 |
| Grain yield (Mg ha ⁻¹) | 5.9 | 6.2 | 6.0 | 6.1 | 4.5 | 6.1 | 5.1 | 5.1 | 5.7 | 5.7 | 4.4 | 3.9 | 5.0 |
| Plant height (cm) | 198.9 | 218.2 | 213.9 | 226.8 | 166.5 | 190.8 | 226.8 | 170.5 | 193.3 | 191.4 | 182.9 | 190.9 | 154.8 |
| Leaf length (cm) | 91.4 | 89.2 | 94.7 | 95.9 | 79.3 | 87.8 | 92.8 | 80.9 | 82.4 | 90.7 | 79.8 | 85.3 | 74.2 |
| Leaf width (cm) | 8.7 | 8.0 | 7.9 | 8.7 | 7.3 | 8.1 | 9.3 | 8.1 | 8.3 | 8.3 | 8.7 | 8.0 | 7.3 |
| Number of leaves above the ear (cm) | 5.0 | 5.5 | 5.5 | 5.0 | 4.3 | 4.9 | 5.3 | 4.9 | 4.8 | 4.8 | 4.9 | 4.9 | 3.8 |
| Number of primary spikelets | 16.2 | 15.2 | 16.2 | 16.2 | 14.2 | 14.9 | 19.3 | 15.8 | 13.7 | 15.4 | 12.3 | 15.8 | 11.3 |
| Tassel length (cm) | 61.5 | 58.7 | 61.0 | 65.0 | 60.8 | 64.1 | 56.5 | 55.8 | 58.4 | 58.7 | 55.1 | 57.4 | 59.2 |
| Number of rows | 12.3 | 13.6 | 14.0 | 14.0 | 12.7 | 12.7 | 13.5 | 14.1 | 13.9 | 12.9 | 13.0 | 12.1 | 13.9 |
| Number of grains per row | 30.9 | 29.5 | 30.1 | 28.7 | 23.9 | 32.0 | 29.4 | 31.7 | 31.3 | 29.4 | 29.9 | 32.2 | 28.9 |
| Ear length (cm) | 14.8 | 14.5 | 14.1 | 13.9 | 12.2 | 14.2 | 13.3 | 14.0 | 13.7 | 13.9 | 13.7 | 14.1 | 13.7 |
| Ear diameter (cm) | 4.2 | 4.4 | 4.4 | 4.4 | 4.5 | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.5 | 4.3 | 4.0 | 3.8 |
| Shelling (%) | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| Grain length (cm) | 1.1 | 1.2 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 1.0 | 1.1 |
| Grain width (cm) | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.8 |
| Grain thickness (cm) | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |

[†] I: Intermediate adaptation; B: low adaptation; Sd: semi-dent; Sc: semi-flint; BC: creamy white; AC: light yellow.

The average results of the representative subset indicate that its vegetative cycle varies from 70 to 94 days, with grain yield ranging from 3.95 to 6.16 t ha⁻¹. Similar results have been reported by Espinosa-Tamayo *et al.* (2019), who pointed out that populations of the Ratón race of Coahuila are early-cycle, with wide adaptation and good yield potential. According to the CONABIO database (CONABIO, 2011), Ratón race populations have a plant height of 238 cm (144–334), growing season of 73 d (55–94), 12 rows (10–16), and 17 to 43 kernels per row; cob length and diameter of 8 to 21 and 3 to 5.6 cm, respectively; kernel dimensions of 1.12, 0.83, and 0.35 cm for length, width, and thickness, respectively. In this study, plant height ranged from 154 to 227 cm, with 4–5 leaves above the ear; length between 70–90 cm, and width between 7–9 cm of average leaf; tassel had lengths between 50 to 60 cm and 11 to 16 primary spikelets.

Ears are distinguished by having an average of 12 rows, 23 to 32 kernels per row, ear length of 12.2 to 14.8 cm, ear diameters of 4–4.5 cm, and a shelling percentage of 0.80 %. And kernel dimensions of 1.1, 0.9, and 0.4 cm for length, width, and thickness, respectively.

The type of grain is semi-dent; dent, with presence of semi-flint; the color is predominantly creamy white, with presence of yellow. The description of the populations of the representative group generally coincides with other studies of diversity of populations of the Ratón race, such as CONABIO (CONABIO, 2011), Rincón-Sánchez and Ruiz-Torres (2015) in populations of Coahuila, and González-Martínez *et al.* (2020) in Tamaulipas.

CONCLUSIONS

The diversity of the Ratón race populations was structured to the adaptation area of low - intermediate - transition areas due to tassel characters (peduncle length, central rachis length), ear characters (cob diameter and ear-grain ratio) and relationships in grain dimensions (length, width, and thickness), and within adaptation areas to plant characters (plant and ear height, and leaf area of the ear leaf) and tassel characters (primary spikelets and length of branched part). A representative subset of the diversity of maize of the Ratón race in Coahuila was defined, consisting of 13 populations (15.7 % of the total evaluated).

REFERENCES

- Cabrera-Toledo JM, Carballo-Carballo A, Mejía-Contreras JA, García-De los Santos G, Vaquera-Huerta H. 2019. Caracterización de poblaciones sobresalientes de maíz de la raza Zapalote Chico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42(3): 269–279.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2011. Proyecto global de maíces (PGM). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/proyectoMaices> (Retrieved: March 2023).
- Espinosa-Tamayo LC, Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA, Martínez-Reyna JM, Benavides-Mendoza A. 2019. Respuesta ambiental de poblaciones nativas de maíz del sureste de Coahuila, México. *Nova Scientia* 11 (23): 108–125. <https://doi.org/10.21640/ns.v11i23.1931>

- Falconer DS, Mackay TF. 1996. Introduction to Quantitative Genetics (Fourth Edition). Addison Wesley Longman: Harlow, UK. 448 p.
- Flores-Hernández LA, Castillo-González F, Nieto-Sotelo J, Vázquez-Carrillo MG, Livera-Muñoz M, Benítez-Riquelme I, Ramírez-Hernández A. 2022. Diversidad agro-morfológica del maíz cacahuacintle de los valles altos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 45 (1): 13–22. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.1.13>
- Flores-Pérez L, López PA, Gil-Muñoz A, Santacruz-Varela A, Chávez-Servia JL. 2015. Variación intra-racial de maíces nativos del altiplano de Puebla, México. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Uncuyo* 47 (1): 1–17.
- González-Martínez J, Rocandio-Rodríguez M, Chacón-Hernández JC, Vanoye-Eligio V, Moreno-Ramírez YR. 2018. Distribución y diversidad de maíces nativos (*Zea mays* L.) en el altiplano de Tamaulipas, México. *Agroproductividad* 11 (1): 124–130.
- González-Martínez J, Rocandio-Rodríguez M, Contreras-Toledo AR, Joaquín-Cancino S, Vanoye-Eligio V, Chacón-Hernández JC, Hernández-Bautista A. 2020. Diversidad morfológica y agronómica de maíces nativos del altiplano de Tamaulipas, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 43 (4): 361–361. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4.361>
- Govindaraj M, Vetriventhan M, Srinivasan M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics Research International* 2015: 431487. <http://doi.org/10.1155/2015/431487>
- IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) 1991. Descriptors for maize. International Maize and Wheat Improvement Center. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 100 p.
- Kassambara A, Mundt F. 2020. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra> (Retrieved: March 2023).
- Martínez-Sánchez J, Espinosa-Paz N, Cadena-Iñiguez P. 2017. Caracterización morfológica de poblaciones de maíz nativo (*Zea mays* L.) en Chiapas, México. *Agroproductividad* 10 (9): 26–33.
- R Core Team 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rangel-Lucio JA, Santacruz-Varela A, Córdova-Téllez L, García-Rodríguez JG, Cervantes-Ortiz F, Vaquera-Huerta H, Cuenca-Salgado JA. 2021. Adaptación y selección de maíces nativos en la región del bajío de México por su caracterización morfológica. *Revista Fitotecnia Mexicana* 44 (2): 241–241. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.241>
- Rincón-Sánchez F, Castillo-González F, Ruiz-Torres NA. 2010. Diversidad y distribución de los maíces nativos en Coahuila, México. *Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C.: Chapingo, México*. 123 p.
- Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA. 2015. Maíces Nativos en el Estado de Coahuila, México. *Claridades Agropecuarias Edición Especial* 2015: 40–44.
- Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA. 2018. Assessing maize diversity and defining a representative subset by means of selected morphological ear traits. *Plant Genetic Resources* 16 (6): 488–497. <https://doi.org/10.1017/S1479262118000047>
- Rocandio-Rodríguez M, Santacruz-Varela A, Córdova-Téllez L, López-Sánchez H, Castillo-González F, Lobato-Ortiz R, García-Zavala JJ, Ortega-Paczka R. 2014. Caracterización morfológica y agronómica de siete razas de maíz de los valles altos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37 (4): 351–361.
- Ruiz-Corral JA, Durán-Puga N, Sánchez-González J de J, Ron-Parra J, González-Eguiarte DR, Holland JB, Medina-García G. 2008. Climatic adaptation and ecological descriptors of 42 Mexican maize races. *Crop Science* 48 (4): 1502–1512. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0518>
- Sánchez GJJ. 2011. Diversidad del Maíz y el Teocintle. Informe preparado para el proyecto: “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. https://www.biodiversidad.gob.mx/media/1/genes/files/Jesus_Sanchez_2011.pdf (Retrieved: March 2023).

- Sánchez JJ, Goodman MM, Rawlings JO. 1993. Appropriate characters for racial classification in maize. *Economic Botany* 47 (1): 44–59.
- Sanchez GJJ, Goodman MM, Stuber CW. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54: 43–59. <https://doi.org/10.1007/BF02866599>
- SAS Institute Inc. 2018. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. Cary, NC. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Yan W. 2014. *Crop variety trials: Data Management and analysis*. John Wiley & Sons: Madison, WI, USA. 360 p.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE POBLACIONES NATIVAS DE MAÍZ DE LA RAZA RATÓN DE COAHUILA, MÉXICO

Delia Margarita **Olvera-Aguilar**¹, Froylán **Rincón-Sánchez**^{1*}, Norma Angélica **Ruiz-Torres**¹,
Juan Manuel **Martínez-Reyna**¹, César Daniel **Petroli-Leguiza**²

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

² Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Carretera México-Veracruz km 45, El Batán, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56237.

* Autor para correspondencia: frincon@uaaan.edu.mx

RESUMEN

Por sus amplia distribución y adaptación, la raza Ratón de maíz (*Zea mays* L.) es un componente importante de la diversidad en el estado de Coahuila, México. El objetivo de la investigación fue realizar una caracterización morfológica de 83 poblaciones nativas de la raza Ratón e identificar un subconjunto que representará la diversidad. Las poblaciones se evaluaron en experimentos repetidos en dos localidades diferentes con dos fechas de siembra por localidad. Se registraron 26 caracteres cuantitativos de la planta, espiga, mazorca y grano y se calcularon 14 adicionales (índices), como relaciones entre caracteres. La diversidad fenotípica se analizó a través del análisis de componentes principales y de conglomerados. Se encontraron diferencias ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.05$) entre ambientes en 28 caracteres y ($p \leq 0.01$) entre poblaciones para todos los caracteres, debido a la variación de ambientes y la diversidad entre poblaciones, respectivamente. También, se encontraron diferencias ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.05$), en 38 de los 40 caracteres en la interacción poblaciones \times ambientes, como respuesta diferencial de las poblaciones en los ambientes. Con base en el índice de repetibilidad ($r > 1.0$), para la clasificación se seleccionaron 10 caracteres y nueve índices menos influenciados por el ambiente. Los dos primeros componentes explicaron el 53.3 % de la variación total y se estableció que los caracteres vegetativos, de la mazorca y espiga fueron los más importantes para describir la variación, lo que permitió identificar un patrón de diversidad asociado al área de adaptación de las poblaciones de áreas bajas – intermedias – transición, lo que revela que, la variación del maíz está estrechamente relacionada con la altitud, y los gradientes de temperatura y humedad. Con base en el dendrograma se obtuvo un subconjunto representativo de la diversidad de la raza Ratón en Coahuila, constituido por 13 de 83 poblaciones (15.7 %).

Palabras clave: *Zea mays* L., índice de repetibilidad, diversidad genética, subconjunto representativo de diversidad.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) se ha considerado un cultivo de gran importancia por ser una de las principales fuentes de alimentación, materia prima para forraje e industria. En México se han descrito 59 razas de maíz de acuerdo con la similitud

Citation: Olvera-Aguilar DM, Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA, Martínez-Reyna JM, Petroli-Leguiza CD. 2023. Caracterización morfológica de poblaciones nativas de maíz de la raza Ratón de Coahuila, México.

Agrociencia 57(5): 953-980.
doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2834

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: July 01, 2022.
Approved: March 23, 2023.
Published in Agrociencia:
July 06, 2023.

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



de sus características morfológicas (Sánchez *et al.*, 2000). En el país, gran parte de la diversidad del maíz se encuentra en forma de poblaciones nativas en los campos de los agricultores, en una amplia gama de ambientes, desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a los 2900 m, y desde ambientes húmedos tropicales hasta condiciones semidesérticas (Ruiz-Corral *et al.*, 2008). La diversidad observada en los caracteres de las razas de maíz es el resultado de la selección dirigida por el agricultor con el objetivo de satisfacer sus necesidades de consumo, socioeconómicas y de producción, además de la adaptación a las condiciones ambientales específicas (Rincón-Sánchez y Ruiz-Torres, 2018). La medición y análisis de los caracteres morfo agronómicos de las poblaciones nativas de maíz, son acciones de gran utilidad para conocer la variación fenotípica existente entre razas, dentro de razas y entre poblaciones, y al mismo tiempo, evaluar su estabilidad en los ambientes (Flores-Pérez *et al.*, 2015; Govindaraj *et al.*, 2015). Los estudios de diversidad en poblaciones consideradas como variantes de una raza son de gran relevancia para definir estrategias de conservación y uso, así como para la identificación de alelos que contribuyan a mejorar la productividad dentro de regiones (Rocandio-Rodríguez *et al.*, 2014; Rincón-Sánchez y Ruiz-Torres, 2018). De acuerdo con datos de pasaporte, la diversidad de los maíces nativos en el estado de Coahuila está representada por siete razas: Celaya, Cónico Norteño, Elotes Cónicos, Olotillo, Ratón, Tuxpeño y Tuxpeño Norteño. Por su frecuencia, destacan las poblaciones identificadas como pertenecientes a la raza Ratón (35.2 %), en relación con Cónico Norteño (26.3 %), Tuxpeño Norteño (19.0 %) y Tuxpeño (10.3 %), distribuida en las diferentes condiciones agroclimáticas, principalmente en áreas de temporal o secano, a la que se le atribuyen atributos como tolerancia a la sequía, estabilidad en rendimiento y precocidad (Rincón-Sánchez *et al.*, 2010; Rincón-Sánchez y Ruiz-Torres, 2015). Sánchez (2011), clasifica a la raza Ratón dentro de los maíces tropicales precoces, la cual se distribuye en el noreste de México en altitudes entre los 100 y 1300 m; son plantas de ciclo corto con gran adaptabilidad y baja sensibilidad al fotoperíodo. La información disponible indica que, la raza Ratón se distribuye en los estados de Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila, y se han reportado poblaciones representativas de esta raza en Chihuahua, Veracruz, San Luis Potosí, Durango y Zacatecas (CONABIO, 2011). La presente investigación forma parte del análisis de la diversidad de los maíces nativos del estado de Coahuila, México.

Bajo este contexto, la presente investigación tuvo como objetivos realizar un estudio de diversidad de poblaciones nativas de la raza Ratón de Coahuila con base en caracteres morfológicos, y definir un subconjunto representativo de poblaciones que concentre la diversidad de la raza. El estudio se realizó bajo el supuesto de que, la caracterización morfológica permitirá entender la diversidad entre y dentro de poblaciones y que, a partir de las interrelaciones, permite definir un subconjunto que represente a la diversidad de la raza Ratón en Coahuila.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material genético consistió en 83 poblaciones nativas de maíz de la raza Ratón (R), recolectadas en el estado de Coahuila, México (Rincón-Sánchez *et al.*, 2010), otras, en

colectas posteriores (no publicadas), de las cuales, el 70.0 % son de grano blanco cremoso y el resto, variantes de color amarillo, principalmente. En el 35.0 % de las poblaciones se encontró presencia de variantes de otras razas como Celaya (RxC) (1), Cónico Norteño (RxCN) (4), Elotes Cónicos (RxEC) (1), Olotillo (RxO) (2), Tuxpeño (RxT) (14), y Tuxpeño Norteño (RxTN) (7). Las poblaciones se agruparon de acuerdo con la altitud del sitio de colecta en áreas bajas (B) (< 1000 m), intermedias (I) (1001 – 1800 m) y transición (T) (> 1800 m), con 29, 50 y 4, respectivamente.

La evaluación agronómica se realizó en dos localidades diferentes bajo condiciones de riego: General Cepeda, Coahuila en 2020 (25° 26' LN; 101° 27' LO, altitud 1450 m, temperatura media anual de 18.4 °C y precipitación media anual de 279.9 mm), y en El Mezquite, Galeana, Nuevo León en 2021 (25° 18' LN; 101° 16' LO, altitud 1890 m, temperatura media anual de 15.5 °C y precipitación media anual de 416.4 mm).

El material experimental se estableció bajo un diseño de bloques incompletos con arreglo α -latice, en dos fechas de siembra por localidad, con dos repeticiones, en surcos de 4 m de largo a una distancia entre plantas de 0.19 m, y entre surcos de 0.85 m. La combinación de localidades \times fechas de siembra se consideró como ambientes.

Los datos fenológicos y agronómicos obtenidos como promedio por parcela fueron: floración masculina y femenina (FM, FF) (d), asincronía floral (ASI) (d), prolificidad (mazorcas planta⁻¹) y rendimiento de grano (Mg ha⁻¹). La caracterización morfológica se realizó con valores promedio de plantas por parcela utilizando algunos de los descriptores para maíz (IBPGR, 1991). A tres plantas representativas de cada parcela se determinó: Altura de planta (APTA) y mazorca (AMAZ) (cm), longitud (LHOJA) y ancho de la hoja (AHOJA) (cm) de la mazorca, número de hojas arriba de mazorca (HAMAZ) (cm), área de la hoja (AF) (cm²) de la mazorca, longitud de pedúnculo de la espiga (LPED) (cm), longitud de parte ramificada (LRAM), longitud de raquis central (LRC) (cm), longitud total de espiga (LESP) (cm) y número de espiguillas primarias (NESP). También se determinaron los índices: APTA/AMAZ (APTAMAZ), AMAZ/APTA (AMAZPTA), LRAM/NESP (LRAMESP) (cm·núm⁻¹), LRAM/LESP (LRAMESP), LPED/LESP (LPEDESP) y LRC/LESP (LRCLESP).

Los datos de la mazorca y el grano fueron obtenidos de tres mazorcas representativas y completas de cada parcela: longitud (LMAZ), diámetro de mazorca (DMAZ), y diámetro de olote (DOLO) (cm), número de hileras (NHIL), granos por hilera (GHIL), peso de la mazorca (PMAZ) (g), superficie de la mazorca (SUPMAZ) (cm³), porcentaje de desgrane (DESG). Se computaron los índices: DMAZ/LMAZ (DLMAZ), DOLO/DMAZ (DOLOMAZ).

A partir de 10 granos consecutivos del centro de cada mazorca, se obtuvieron valores promedio de longitud de grano (LG), ancho de grano (AG), espesor de grano (EG) (cm) y volumen de grano (VG) (cm³). Adicionalmente, se obtuvo el peso de 100 semillas (P100S) (g) expresado al 12 % de humedad. Se obtuvieron los índices: AG/LG (ALGRA), EG/LG (ELGRA), y EG/AG (EAGRA). Los caracteres de la mazorca y grano, y la relación entre ellos (índices) se describen en IBPGR (1991) y Sánchez *et al.* (1993). Se realizó un análisis de varianza mediante el procedimiento PROC GLM de SAS (SAS

Institute Inc., 2018), donde se probaron los efectos de ambientes, poblaciones y la interacción poblaciones \times ambientes como efectos fijos; el resto de los efectos en el modelo como aleatorios.

Para la selección de caracteres usadas en la clasificación, se utilizó el criterio de repetibilidad (r): $r = \sigma_p^2 / \sigma_A^2 + \sigma_{p \times A}^2$ donde σ_p^2 , σ_A^2 y $\sigma_{p \times A}^2$ son los estimadores de los componentes de varianza de poblaciones, ambientes y la interacción poblaciones \times ambientes, respectivamente. Para el análisis de clasificación, se consideró como regla de decisión aceptar aquellos caracteres cuyo valor de r fuera mayor a uno ($r > 1.0$) (Sánchez *et al.*, 1993). La estimación de los componentes de varianza se realizó con el procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS Institute Inc., 2018).

Los promedios de 19 caracteres seleccionados se estandarizaron restando la media y dividiendo por la desviación estándar antes del cálculo de la asociación entre las poblaciones. La diversidad del maíz se exploró mediante análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados, ambos realizados con el software R (R Core Team, 2021). A partir de los resultados del ACP se construyó un gráfico biplot utilizando los dos primeros componentes principales. Para el segundo análisis, se calculó un coeficiente de distancia (disimilitud), definido por el complemento del coeficiente de correlación de Pearson entre pares de poblaciones ($d_{ij} = 1 - r$). Con la matriz resultante se realizó un análisis de conglomerados jerárquico y se generó un dendrograma usando la función hclust del paquete Factoextra del software R (Kassambara y Mundt, 2020), a través del método de grupos pares no ponderados utilizando promedios aritméticos (UPGMA).

Con base en el dendrograma se realizó un muestreo estratificado y direccional modificado (Rincón-Sánchez y Ruiz-Torres, 2018). Este proceso se inició discriminando poblaciones con los valores más bajos de distancia entre pares de poblaciones dentro de grupos, obteniéndose así un subconjunto inicial representativo del total de poblaciones. Para la selección de poblaciones, en cada rutina, se apoyó de imágenes de mazorcas obtenidas de cada unidad experimental, donde se corroboró la presencia de otras razas, por lo que se identificaron aquellas poblaciones ausentes de combinaciones con otras razas. Posteriormente se obtuvo un nuevo dendrograma para discriminar poblaciones dentro de las retenidas en el paso previo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre ambientes de evaluación (localidades \times fechas de siembra) se encontró un comportamiento diferenciado ($p \leq 0.01$ y $p \leq 0.05$) en 28 de los 40 caracteres estudiados, excepto en ASI, APTA, AF, LRAM, LRAM/NESP, LRAM/LESP, LPED/LESP, LRC/LESP, HIL, DOLO, EG/AG y AG/LG (Cuadro 1), como resultado de las diferencias en las condiciones ambientales, las fechas de siembra y altitud de las localidades de estudio. Entre poblaciones se encontraron diferencias ($p \leq 0.01$) en todos los caracteres, producto de la variación dentro del grupo racial. En el caso de la interacción poblaciones \times ambientes, se encontraron diferencias ($p \leq 0.01$ y 0.05) en 38 de los 40 caracteres estudiados, excepto en ASI y LRAM/NESP, como resultado de la respuesta diferencial de las poblaciones en los ambientes de prueba.

Cuadro 1. Estimadores de los componentes de varianza para poblaciones, ambientes, e interacción poblaciones × ambientes y estimación de los coeficientes de repetibilidad en poblaciones nativas de la raza de maíz Ratón.

| Caracteres | σ_p^2 | σ_a^2 | σ_{pa}^2 | r |
|---|--------------|--------------|-----------------|--------------------|
| Floración masculina (FM) (d) | 33.6787 | 294.7400 | 1.9672 | 0.114 |
| Floración femenina (FF) (d) | 38.4565 | 287.1000 | 2.2689 | 0.133 |
| Asincronía floral (ASI) (d) | 0.2920 | 0.0582 | 0.1465 | 1.427 [†] |
| Prolificidad (PRO) | 0.0011 | 0.0029 | 0.0009 | 0.294 |
| Rendimiento de grano (REND) (Mg ha ⁻¹) | 0.2953 | 0.5987 | 0.3504 | 0.311 |
| Altura de planta (APTA) (cm) | 370.6300 | 24.2907 | 88.7929 | 3.277 [†] |
| Altura de mazorca (AMAZ) (cm) | 348.0100 | 241.1400 | 57.1591 | 1.167 [†] |
| AMAZ/APTA (AMAZPTA) | 0.0017 | 0.0047 | 0.0004 | 0.326 |
| APTA/AMAZ (APTAMAZ) | 0.0189 | 0.0472 | 0.0087 | 0.338 |
| Longitud de la hoja (LHOJA) de la mazorca (cm) | 21.1419 | 20.7257 | 11.3506 | 0.659 |
| Ancho de la hoja (AHOJA) de la mazorca (cm) | 0.1765 | 0.1916 | 0.0465 | 0.741 |
| Área de la hoja (AF) de la mazorca (cm ²) | 2410.9300 | 463.0300 | 1104.0100 | 1.539 [†] |
| Número de hojas arriba de la mazorca (HAMAZ) | 0.0778 | 0.0851 | 0.0201 | 0.740 |
| Número de espiguillas primarias (NESP) | 4.0172 | 1.2366 | 0.8620 | 1.914 [†] |
| Longitud de pedúnculo (LPED) (cm) | 2.9131 | 1.4392 | 0.5837 | 1.440 [†] |
| Longitud parte ramificada (LRAM) (cm) | 1.6472 | 0.0033 | 0.6249 | 2.622 [†] |
| Longitud de raquis central (LRC) (cm) | 2.1734 | 0.8665 | 0.8594 | 1.259 [†] |
| Longitud de espiga (LESP) (cm) | 7.4522 | 5.0227 | 3.9007 | 0.835 |
| LRAM/NESP (LRAMESP) (cm·núm ⁻¹) | 0.0063 | 0.0068 | 0.0021 | 0.707 |
| LPED/LESP (LPEDESP) | 0.0003 | 0.0001 | 0.0001 | 1.763 [†] |
| LRAM/LESP (LRCLESP) | 0.0005 | 0.0000 | 0.0001 | 4.036 [†] |
| LRC/LESP (LRCLESP) | 0.0002 | 0.0000 | 0.0001 | 2.452 [†] |
| Número de hileras (HIL) | 0.8147 | 0.0458 | 0.1348 | 4.512 [†] |
| Número de granos por hilera (GHIL) | 2.5521 | 5.5517 | 0.9913 | 0.390 |
| Peso de la mazorca (PMAZ) (g) | 113.1000 | 1020.4800 | 200.4300 | 0.093 |
| Longitud de mazorca (LMAZ) (cm) | 0.2521 | 1.2822 | 0.4481 | 0.146 |
| Diámetro de mazorca (DMAZ) (cm) | 0.0362 | 0.0465 | 0.0133 | 0.605 |
| Diámetro de olote (DOLO) (cm) | 0.0391 | 0.0007 | 0.0056 | 6.134 [†] |
| Superficie de la mazorca (SUPMAZ) (cm ²) | 83.7371 | 638.0300 | 166.2000 | 0.104 |
| DMAZ/LMAZ (DLMAZ) | 0.0004 | 0.0001 | 0.0002 | 1.509 [†] |
| DOLO/DMAZ (DLOMAZ) | 0.0008 | 0.0005 | 0.0001 | 1.447 [†] |
| Porcentaje de desgrane (DESG) | 0.0006 | 0.0003 | 0.0001 | 1.317 [†] |
| Longitud de grano (LG) (cm) | 0.0018 | 0.0060 | 0.0011 | 0.256 |
| Ancho de grano (AG) (cm) | 0.0014 | 0.0024 | 0.0006 | 0.481 |
| Espesor de grano (EG) (cm) | 0.0002 | 0.0004 | 0.0001 | 0.347 |
| Volumen del grano (VG) (cm ³) | 0.0007 | 0.0047 | 0.0006 | 0.142 |
| AG/LG (ALGRA) | 0.0018 | 0.0001 | 0.0003 | 4.151 [†] |
| EG/LG (ELGRA) | 0.0003 | 0.0001 | 0.0002 | 1.164 [†] |
| EG/AG (EAGRA) | 0.0005 | 0.0000 | 0.0003 | 1.761 [†] |
| Peso de 100 semillas (P100S) (g) | 3.1457 | 22.3264 | 3.1457 | 0.257 [†] |

[†] = Caracteres seleccionadas por tener r > 1; σ_p^2 , σ_a^2 y σ_{pa}^2 = componentes de varianza en poblaciones, ambientes y la interacción poblaciones × ambientes, respectivamente; r = repetibilidad = $r = \sigma_p^2 / (\sigma_p^2 + \sigma_a^2 + \sigma_{pa}^2)$.

La variación entre las poblaciones evaluadas es atribuible, en parte, a que provienen de tres áreas de adaptación diferentes, en altitudes de los 245 a 1834 m: Bajas (34.9 %), Intermedias (60.2 %) y Transición-Altura (4.8 %). Ruiz-Corral *et al.* (2008), señalan una amplitud de adaptación de la raza Ratón que varía de los 84 a 1300 m, en tanto que, Sánchez (2011), menciona que ésta, se distribuye en altitudes entre los 100 y 1300 m. Por otro lado, el 35.0 % de estas muestran infiltración génica de otras razas, principalmente Tuxpeño, Tuxpeño Norteño y Cónico Norteño, como consecuencia del intercambio de semillas entre agricultores y al entrecruzamiento por la polinización libre. Además, la variación genética también es atribuible a los procesos de selección natural y la artificial a través de múltiples generaciones, practicada por los agricultores para caracteres de interés (Rincón-Sánchez *et al.*, 2010; Martínez-Sánchez *et al.*, 2017).

Análisis de repetibilidad

La interacción genotipo \times ambiente es determinante en la clasificación numérica de germoplasma por lo que, entre otros criterios, se han utilizado los índices de repetibilidad (r) para identificar aquellos caracteres que sean menos afectados por el ambiente (Sánchez *et al.*, 1993). Estos autores señalan que los caracteres vegetativos son los más afectados por factores ambientales y su interacción, en comparación con los caracteres de mazorca y espiga, que son considerados más útiles en la clasificación de poblaciones y razas de maíz. Con base en el criterio de repetibilidad superior a uno ($r > 1.0$) y los elementos anteriores, se eligieron 19 caracteres (11 caracteres y ocho índices), los cuales se utilizaron en los análisis de clasificación (Cuadro 1).

El índice de repetibilidad superior a uno identifica aquellos caracteres donde la proporción de la varianza de las poblaciones es superior a la suma de los componentes de las varianzas debida a los ambientes y la interacción poblaciones \times ambientes, es decir, caracteres poco influenciados por el ambiente, y por lo tanto, útiles para la clasificación de poblaciones de razas de maíz (Sánchez *et al.*, 1993). Rocandio-Rodríguez *et al.* (2014) y Flores-Hernández *et al.* (2022) en estudios de maíces de valles altos identificaron caracteres de la espiga (LESP, LRC) y número de hileras similares a los seleccionados en el presente trabajo, sin embargo, estos autores también seleccionaron caracteres del grano (largo ancho y espesor) como útiles, pero en esta investigación tuvieron valores de repetibilidad inferiores a 0.5. También es importante mencionar que la repetibilidad difiere, según la naturaleza del carácter, las propiedades genéticas de la población y las condiciones ambientales en que se desarrollan los individuos (Falconer y Mackay 1996).

Análisis de componentes principales

Los primeros tres componentes principales (CP) explican el 66.9 % de la variación total de los 19 caracteres identificados (Cuadro 2).

Los vectores característicos asociados a cada componente principal son proporcionales al coeficiente de correlación entre los caracteres originales y dicho componente principal. Aquellos caracteres originales que tuvieron vectores característicos iguales

Cuadro 2. Valores y vectores característicos asociados a los tres primeros componentes principales del análisis de los caracteres para la descripción morfológica en poblaciones nativas de la raza de maíz Ratón.

| Caracteres | Vectores característicos | | |
|---|--------------------------|---------|--------|
| | CP1 | CP2 | CP3 |
| Asincronía floral (ASI) (d) | 0.536* | 0.314 | -0.133 |
| Altura de planta (APTA) (cm) | 0.609* | 0.678* | 0.148 |
| Altura de mazorca (AMAZ) (cm) | 0.691* | 0.615* | 0.152 |
| Área de la hoja (AF) (cm ²) | 0.774* | 0.263 | 0.262 |
| Número de espiguillas primarias (NESP) | 0.776* | 0.325 | -0.242 |
| Longitud de pedúnculo (LPED) (cm) | -0.540* | 0.552* | -0.039 |
| Longitud parte ramificada (LRAM) (cm) | 0.842* | 0.267 | -0.225 |
| Longitud de raquis central (LRC) (cm) | -0.315 | 0.397 | 0.569* |
| LRAM/LESP (LRAMESP) (cm·núm ⁻¹) | 0.911* | -0.005 | -0.303 |
| LPED/LESP (LPEDESP) | -0.723* | 0.224 | -0.241 |
| LRC/LESP (LRCLESP) | -0.371 | -0.248 | 0.670* |
| Número de hileras (HIL) | -0.016 | 0.412 | 0.704* |
| Diámetro de olote (DOLO) (cm) | 0.550* | -0.520* | 0.545* |
| DMAZ/LMAZ (DLMAZ) (cm) | 0.203 | -0.415 | 0.502* |
| DOLO/DMAZ (DOLOMAZ) (cm) | 0.504* | -0.700* | 0.269 |
| Porcentaje de desgrane (DESG) (%) | -0.786* | 0.187 | -0.239 |
| EG/AG (EAGRA) | -0.217 | 0.407 | 0.398 |
| EG/LG (ELGRA) | 0.055 | -0.405 | 0.073 |
| AG/LG (ALGRA) | 0.249 | -0.810* | -0.288 |
| Valores característicos | 6.254 | 3.878 | 2.585 |
| Varianza explicada (%) | 32.914 | 20.411 | 13.605 |

*= Caracteres con mayor asociación con el componente principal, respectivo; CP1, CP2 y CP3 = Componentes principales 1, 2 y 3 respectivamente.

o superiores a 0.5, se consideraron como de mayor relevancia para explicar la variación entre las poblaciones en estudio, identificándose 17 de los 19 caracteres en los tres CP. El valor de 0.5 se consideró en cada CP debido a que, estos son independientes. La mayoría de estos caracteres han sido reportados en otros estudios de diversidad de poblaciones nativas de maíz (González-Martínez *et al.*, 2018; Rangel-Lucio *et al.*, 2021) y los destacan como importantes para valorar la diversidad presente entre poblaciones a nivel local. En este estudio se usaron los dos primeros CP, los cuales explican el 53.3 % de la variación acumulada en los 19 caracteres originales, y estos son los que explican la mayor variación. La interacción poblaciones x caracteres (Figura 1) explica la relación de los caracteres con las poblaciones y sus características particulares. Las poblaciones localizadas en el sentido del vector de un carácter indica la relación estrecha entre ellos (Yan, 2014). La longitud de los vectores a partir del origen indica la variación asociada al carácter, y el ángulo entre ellos se aproxima al coeficiente de correlación, y por lo tanto, la asociación entre caracteres: un ángulo menor a 30° indica

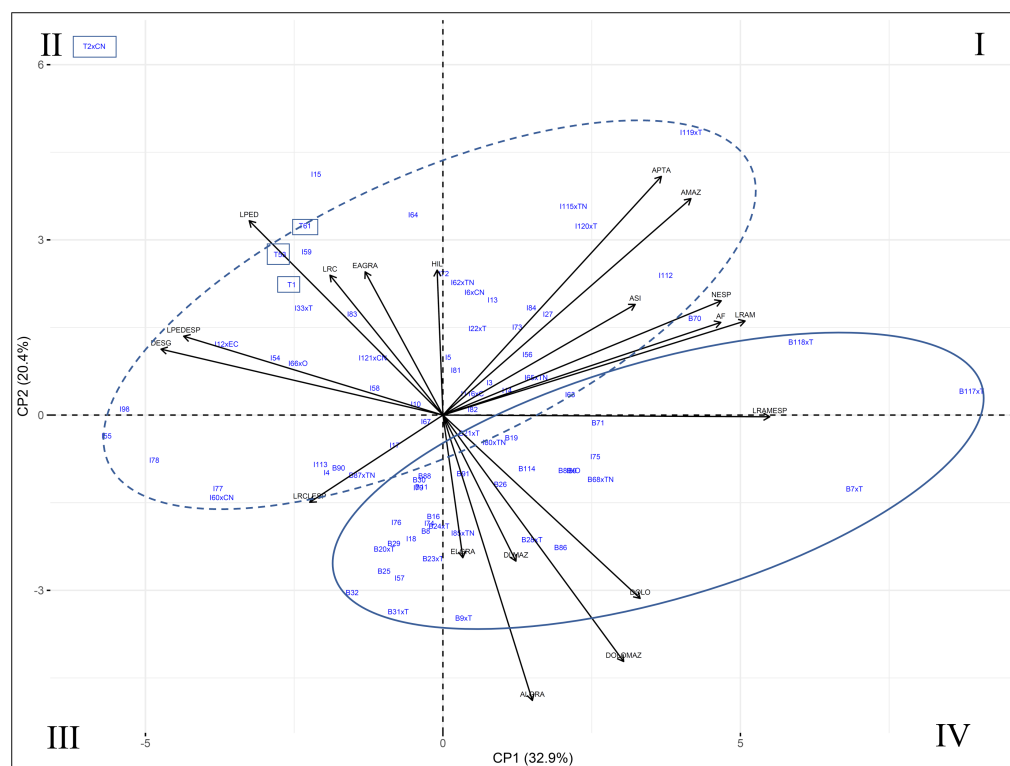


Figura 1. Dispersión gráfica de la interacción entre poblaciones y caracteres, con base en los dos primeros componentes principales (CP1, CP2). En las poblaciones, el primer carácter indica el área de procedencia: B=Bajos, I=Intermedios, y T=Transición; seguido del número de entrada, y al final, la combinación con otra raza ("x"): C=Cónico, CN=Cónico Norteño, EC=Elotes Cónicos, O= Olotillo, T=Tuxpeño y TN=Tuxpeño Norteño; Elipse línea continua = poblaciones de áreas de adaptación bajas (< 1000 m); Elipse línea punteada = poblaciones de áreas de adaptación intermedias (1000 a 1800 m); Rectángulos = poblaciones de áreas de adaptación de transición (> 1800 m).

una relación muy estrecha, en tanto que una relación independiente estará dada por un ángulo cercano a 90°; un ángulo de 180° estará representando una asociación negativa (Yan, 2014). A partir del análisis de dispersión (Figura 1), se logró identificar un continuo de variación, básicamente, relacionado al patrón del área de procedencia y adaptación de las poblaciones en estudio (áreas bajas – intermedias - transición). Resultados similares fueron reportados por Cabrera-Toledo *et al.* (2019) quienes también mencionan que el grado de adaptación a las localidades se manifiesta en la similitud de las poblaciones, asociadas estas, a diferente altitud de colecta.

En la dirección de áreas intermedias al área de transición (> 1000 m) (segundo cuadrante), las poblaciones se caracterizan por tener valores superiores de LPED de la espiga y DESG, y valores inferiores en DOLO en comparación con las poblaciones de áreas bajas (< 1000 m) (cuarto cuadrante). Las poblaciones con valores positivos en

APTA y AMAZ, AF de la hoja de la mazorca, LRAM y NESP de la espiga se localizan en el primer cuadrante; en tanto que, aquellas con valores negativos, en el sentido opuesto (tercer cuadrante).

En el grupo señalado como de áreas bajas (Figura 1), se identifican poblaciones de la raza Ratón en combinación con las razas Tuxpeño y Tuxpeño Norteño; en tanto que, en las áreas intermedias, además de estas dos razas, se identificó la combinación de la raza Ratón con las razas Celaya, Cónico Norteño, Olotillo, y Elotes Cónicos. Al respecto, Rincón-Sánchez *et al.* (2010) apuntan que la combinación entre razas contribuye a explicar la variación fenotípica entre poblaciones y la diversidad del maíz en la región, originada en parte por el intercambio de semillas entre agricultores, la recombinación genética a través de la polinización libre en generaciones posteriores, y la adaptación a ambientes específicos.

Análisis de conglomerados

El dendrograma (Figura 2) correspondió, en lo general, al patrón observado (Figura 1); en él, también se identificaron dos grandes grupos a una distancia de 1.1: El Grupo 1 conformado por las poblaciones provenientes del área de adaptación baja (41 poblaciones), y el Grupo 2 del área de adaptación intermedia, principalmente (42 poblaciones).

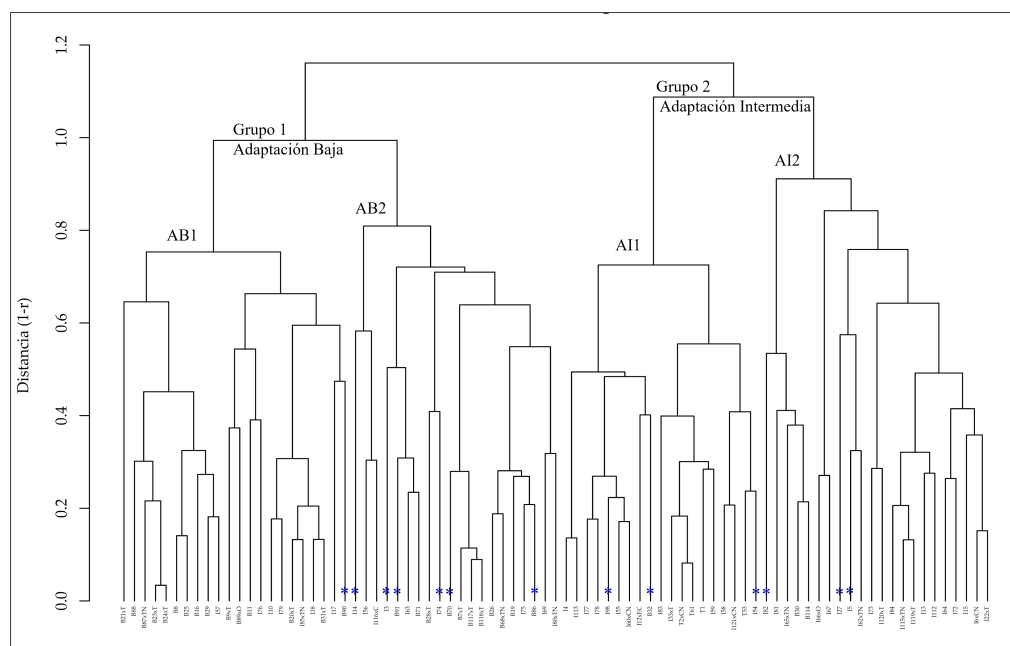


Figura 2. Dendrograma de 83 poblaciones nativas de la raza Ratón de Coahuila, utilizando el complemento de correlación como distancia ($1 - r$) y el método de agrupamiento por pares con base a promedios aritméticos (UPGMA); * = Poblaciones del subconjunto representativo de la diversidad.

El corte a una distancia de 0.9 unidades se distinguen cuatro subgrupos de poblaciones, dos de ellos (AB1 y AB2) al Grupo 1 y dos (AI1 y AI2) al Grupo 2. En éste, en el subgrupo AI1, se incluyen las cuatro poblaciones identificadas con el área de adaptación de transición (> 1800 m). Se presentan los valores promedio de los caracteres en estudio de los cuatro subgrupos obtenidos a partir del análisis (Cuadro 3). Los subgrupos de áreas de adaptación bajas (< 1000 m), se caracterizan por mostrar, en general, valores superiores de DOLO, y de las relaciones DLMAZ, DOLOMAZ, ELGRA y ALGRA. En el caso de los subgrupos de áreas intermedias (AI1 y AI2) presentaron poblaciones con valores promedio superiores en LPED, LRC y DESG, y las relaciones EAGRA y LPEDESP. Es decir, estos caracteres distinguen a las poblaciones en relación con el patrón asociado al área de adaptación (Figura 1). Las diferencias entre subgrupos dentro de los grupos de poblaciones (bajos vs intermedios) se observan con los promedios de los caracteres ASI, AMAZ, NESP y LRAM, los cuales se pueden verificar con valores superiores de estos (primer cuadrante) y viceversa. Las poblaciones procedentes de altitudes inferiores a los 1000 m destacan por tener valores superiores en AF. Estas diferencias, además de las características intrínsecas a las poblaciones en estudio y a su área de adaptación, están influenciadas por la infiltración génica, principalmente de las razas Tuxpeño y Tuxpeño Norteño en el área de adaptación bajas, y en el caso

Cuadro 3. Promedios de los caracteres evaluados en cuatro grupos identificados en 83 poblaciones de maíz de la raza Ratón en Coahuila, México.

| Caracteres | Grupos [†] | | | | Media | DMSH Tukey |
|---|---------------------|----------|----------|----------|--------|---------------|
| | AB1 | AB2 | AI1 | AI2 | | |
| Número de poblaciones | 22 | 20 | 19 | 22 | | |
| Asincronía floral (ASI) (d) | 1.22 b [¶] | 1.94 a | 1.44 b | 1.82 a | 1.61 | 0.366 |
| Altura de planta (APTA) (cm) | 187.58 d | 208.31 b | 191.65 c | 213.47 a | 200.25 | 3.796 |
| Altura de mazorca (AMAZ) (cm) | 105.48 b | 125.37 a | 104.39 b | 126.69 a | 115.48 | 3.479 |
| Área de la hoja (AF) (cm ²) | 544.03 b | 589.87 a | 495.51 c | 559.73 b | 547.29 | 16.659 |
| Número de espiguillas primarias (NESP) | 13.19 b | 16.30 a | 12.73 b | 16.24 a | 14.61 | 0.723 |
| Longitud de pedúnculo (LPED) (cm) | 20.08 c | 19.86 c | 23.28 a | 21.52 b | 21.18 | 0.655 |
| Longitud parte ramificada (LRAM) (cm) | 11.57 b | 13.52 a | 11.04 c | 13.48 a | 12.41 | 0.461 |
| Longitud de raquis central (LRC) (cm) | 27.13 b | 26.69 b | 28.08 a | 26.89 b | 27.20 | 0.668 |
| LRAM/Longitud de espiga (LESP) (cm) | 0.20 b | 0.23 a | 0.18 c | 0.22 a | 0.20 | 0.007 |
| LPED/LESP (LPEDESP) (cm) | 0.34 b | 0.33 c | 0.37 a | 0.35 b | 0.35 | 0.008 |
| LRC/LESP (LRCLESP) (cm) | 0.46 a | 0.44 b | 0.45 b | 0.44 c | 0.45 | 0.009 |
| Número de hileras (HIL) | 13.08 a | 13.09 a | 13.36 a | 13.34 a | 13.21 | 0.317 |
| Diámetro de olote (DOLO) (cm) | 2.69 a | 2.66 a | 2.37 c | 2.45 b | 2.54 | 0.051 |
| DMAZ/LMAZ (DLMAZ) (cm) | 0.34 a | 0.31 b | 0.30 c | 0.31 b | 0.32 | 0.008 |
| DOLO/DMAZ (DOLOMAZ) (cm) | 0.60 b | 0.61 a | 0.56 c | 0.56 c | 0.58 | 0.009 |
| Porcentaje de desgrane (DESG) | 0.81 c | 0.80 d | 0.83 a | 0.82 b | 0.82 | 0.006 |
| EG/AG (EAGRA) (cm) | 0.42 c | 0.45 c | 0.46 a | 0.44 b | 0.44 | 0.010 |
| EG/LG (ELGRA) (cm) | 0.33 b | 0.35 a | 0.35 a | 0.32 c | 0.34 | 0.009 |
| AG/LG (ALGRA) (cm) | 0.79 a | 0.79 a | 0.75 b | 0.74 c | 0.77 | 0.014 |

[†] AB1, AB2 = Adaptación a áreas bajas (< 1000 m); AI1, AI2 = Adaptación a áreas intermedias (1001 a 1800 m); [‡] Valores con la misma letra en la hilera, son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

de áreas intermedias, además de estas razas, intervienen también, las razas Celaya, Olotillo, Cónico Norteño y Elotes Cónicos (Figura 1).

Subconjunto representativo

De acuerdo con el procedimiento de muestreo aplicado a partir del dendrograma, se definió un subconjunto formado por 13 de las 83 poblaciones de maíz (15.7 %), el cual representa la diversidad de las poblaciones nativas de maíz de la raza Ratón presente en Coahuila. El subconjunto quedó definido por 8 de 50 (16.0 %) y 5 de 29 (17.0 %) poblaciones de áreas intermedias y bajas, respectivamente, lo que representa un muestreo proporcional de la variación (Figura 2).

Las poblaciones identificadas como área de transición (> 1800 m) (T2xCN, T61, T1 y T63) localizadas en el dendrograma en el subgrupo AI1, no se seleccionaron para el subconjunto debido a la presencia de variación asociada a la raza Cónico Norteño. En un estudio previo con datos de la mazorca, Rincón-Sánchez y Ruiz-Torres (2018) aplicaron esta metodología y definieron un subconjunto de 18 de 77 poblaciones de maíces nativos (23.4 %), donde se incluyó en este, al menos una población de las razas menos representados, lo que permitió definir un subconjunto que concentra los tipos de maíces nativos a nivel regional. Se presentan los promedios de algunas de las características morfológicas usadas en la clasificación de importancia en el subconjunto (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedios de los caracteres morfológicos del subconjunto representativo de 13 poblaciones de la raza Ratón de Coahuila.

| Characters | Representative subset populations [†] | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | I3 | I5 | I14 | I27 | B32 | I54 | B70 | I74 | I82 | B86 | B90 | B91 | I98 |
| Área de adaptación | I | I | I | I | B | I | B | I | I | B | B | B | I |
| Tipo de grano | Sd | Sd | Sd | Sd | Sc | Sd | Sd | Sd | Sd | Sd | Sd | Sd | Sd |
| Color grano | BC | BC | BC | BC | BC | BC | BC | BC | BC | AC | BC | BC | BC |
| Floración masculina (d) | 85.9 | 84.1 | 83.5 | 88.9 | 69.8 | 76.0 | 94.0 | 75.8 | 80.6 | 79.6 | 84.3 | 84.1 | 75.4 |
| Floración femenina (d) | 88.6 | 85.5 | 84.5 | 90.4 | 72.1 | 76.6 | 98.0 | 76.8 | 82.6 | 81.0 | 86.8 | 85.6 | 76.3 |
| Rendimiento de grano (Mg ha ⁻¹) | 5.9 | 6.2 | 6.0 | 6.1 | 4.5 | 6.1 | 5.1 | 5.1 | 5.7 | 5.7 | 4.4 | 3.9 | 5.0 |
| Altura planta (cm) | 198.9 | 218.2 | 213.9 | 226.8 | 166.5 | 190.8 | 226.8 | 170.5 | 193.3 | 191.4 | 182.9 | 190.9 | 154.8 |
| Longitud hoja (cm) | 91.4 | 89.2 | 94.7 | 95.9 | 79.3 | 87.8 | 92.8 | 80.9 | 82.4 | 90.7 | 79.8 | 85.3 | 74.2 |
| Ancho hoja (cm) | 8.7 | 8.0 | 7.9 | 8.7 | 7.3 | 8.1 | 9.3 | 8.1 | 8.3 | 8.3 | 8.7 | 8.0 | 7.3 |
| Hojas arriba mazorca (cm) | 5.0 | 5.5 | 5.5 | 5.0 | 4.3 | 4.9 | 5.3 | 4.9 | 4.8 | 4.8 | 4.9 | 4.9 | 3.8 |
| Número de espiguillas primarias | 16.2 | 15.2 | 16.2 | 16.2 | 14.2 | 14.9 | 19.3 | 15.8 | 13.7 | 15.4 | 12.3 | 15.8 | 11.3 |
| Longitud de espiga (cm) | 61.5 | 58.7 | 61.0 | 65.0 | 60.8 | 64.1 | 56.5 | 55.8 | 58.4 | 58.7 | 55.1 | 57.4 | 59.2 |
| Número de hileras | 12.3 | 13.6 | 14.0 | 14.0 | 12.7 | 12.7 | 13.5 | 14.1 | 13.9 | 12.9 | 13.0 | 12.1 | 13.9 |
| Número de granos por hilera | 30.9 | 29.5 | 30.1 | 28.7 | 23.9 | 32.0 | 29.4 | 31.7 | 31.3 | 29.4 | 29.9 | 32.2 | 28.9 |
| Longitud mazorca (cm) | 14.8 | 14.5 | 14.1 | 13.9 | 12.2 | 14.2 | 13.3 | 14.0 | 13.7 | 13.9 | 13.7 | 14.1 | 13.7 |
| Diámetro mazorca (cm) | 4.2 | 4.4 | 4.4 | 4.4 | 4.5 | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.5 | 4.3 | 4.0 | 3.8 |
| Desgrane (%) | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| Longitud grano (cm) | 1.1 | 1.2 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 1.0 | 1.1 |
| Ancho grano (cm) | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.8 |
| Espesor grano (cm) | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |

[†]I: Adaptación intermedia; B: adaptación baja; Sd: semi-dentado; Sc: semi-cristalino; BC: blanco cremoso; AC: amarillo claro.

Los resultados promedio del subconjunto representativo indican que su ciclo vegetativo varía de 70 a 94 días, con rendimiento de grano que oscila entre 3.95 y 6.16 t ha⁻¹. Resultados similares han sido reportados por Espinosa-Tamayo *et al.* (2019), donde se señala que las poblaciones de la raza Ratón de Coahuila son de ciclo precoz, con amplia adaptación y buen potencial de rendimiento.

De acuerdo con la base de datos de CONABIO (CONABIO, 2011), las poblaciones de la raza Ratón tienen una altura de planta de 238 cm (144–334), periodo vegetativo de 73 d (55–94), número de hileras de 12 (10–16) y de 17 a 43 granos por hilera; longitud y diámetro de mazorca de 8 a 21 y de 3 a 5.6 cm, respectivamente; las dimensiones del grano de 1.12, 0.83 y 0.35 cm para largo, ancho y espesor, respectivamente.

En este estudio, la altura de planta varía de 154 a 227 cm, con 4–5 hojas arriba de la mazorca; longitud entre 70–90 cm y ancho entre 7–9 cm de hoja promedio; las espigas tienen longitudes entre 50 a 60 cm y de 11 a 16 espiguillas primarias.

Las mazorcas se distinguen por tener en promedio 12 hileras, de 23 a 32 granos por hilera, longitud de mazorca de 12.2 a 14.8 cm, diámetros de mazorca de 4–4.5 cm y un porcentaje de desgrane de 0.80 %. Las dimensiones del grano de 1.1, 0.9 y 0.4 cm para largo, ancho y espesor, respectivamente. El tipo de grano es semi-dentado, dentado, con presencia de semi-cristalino; el color predomina el blanco cremoso, con presencia de amarillo. La descripción de las poblaciones del grupo representativo coincide, en general, con otros estudios de diversidad de poblaciones de la raza Ratón, como CONABIO (CONABIO, 2011), Rincón-Sánchez y Ruiz-Torres (2015) en poblaciones de Coahuila y González-Martínez *et al.* (2020) en Tamaulipas.

CONCLUSIONES

La diversidad de las poblaciones de la raza Ratón estuvo estructurada al área de adaptación de áreas bajas – intermedias – transición por caracteres de la espiga (longitud de pedúnculo, longitud del eje central), de la mazorca (diámetro de olote y proporción grano mazorca) y relaciones en las dimensiones del grano (largo, ancho y espesor), y dentro de áreas de adaptación, a caracteres de la planta (altura de planta y mazorca, y área foliar de la hoja de mazorca) y de espiga (espigas primarias y longitud de parte ramificada). Se definió un subconjunto representativo de la diversidad del maíz de la raza Ratón en Coahuila, constituido por 13 poblaciones (15.7 % del total evaluado).

REFERENCIAS

- Cabrera-Toledo JM, Carballo-Carballo A, Mejía-Contreras JA, García-De los Santos G, Vaquera-Huerta H. 2019. Caracterización de poblaciones sobresalientes de maíz de la raza Zapalote Chico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42(3): 269–279.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2011. Proyecto global de maíces (PGM). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/proyectoMaices> (Recuperado: marzo 2023).
- Espinosa-Tamayo LC, Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA, Martínez-Reyna JM, Benavides-Mendoza A. 2019. Respuesta ambiental de poblaciones nativas de maíz del sureste de Coahuila, México. *Nova Scientia* 11 (23): 108–125. <https://doi.org/10.21640/ns.v11i23.1931>

- Falconer DS, Mackay TF. 1996. Introduction to Quantitative Genetics (Fourth Edition). Addison Wesley Longman: Harlow, UK. 448 p.
- Flores-Hernández LA, Castillo-González F, Nieto-Sotelo J, Vázquez-Carrillo MG, Livera-Muñoz M, Benítez-Riquelme I, Ramírez-Hernández A. 2022. Diversidad agro-morfológica del maíz cacahuacintle de los valles altos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 45 (1): 13–22. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.1.13>
- Flores-Pérez L, López PA, Gil-Muñoz A, Santacruz-Varela A, Chávez-Servia JL. 2015. Variación intra-racial de maíces nativos del altiplano de Puebla, México. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Uncuyo* 47 (1): 1–17.
- González-Martínez J, Rocandio-Rodríguez M, Chacón-Hernández JC, Vanoye-Eligio V, Moreno-Ramírez YR. 2018. Distribución y diversidad de maíces nativos (*Zea mays* L.) en el altiplano de Tamaulipas, México. *Agroproductividad* 11 (1): 124–130.
- González-Martínez J, Rocandio-Rodríguez M, Contreras-Toledo AR, Joaquín-Cancino S, Vanoye-Eligio V, Chacón-Hernández JC, Hernández-Bautista A. 2020. Diversidad morfológica y agronómica de maíces nativos del altiplano de Tamaulipas, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 43 (4): 361–361. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4.361>
- Govindaraj M, Vetriventhan M, Srinivasan M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics Research International* 2015: 431487. <http://doi.org/10.1155/2015/431487>
- IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) 1991. Descriptors for maize. International Maize and Wheat Improvement Center. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 100 p.
- Kassambara A, Mundt F. 2020. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra> (Recuperado: marzo 2023).
- Martínez-Sánchez J, Espinosa-Paz N, Cadena-Iñiguez P. 2017. Caracterización morfológica de poblaciones de maíz nativo (*Zea mays* L.) en Chiapas, México. *Agroproductividad* 10 (9): 26–33.
- R Core Team 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rangel-Lucio JA, Santacruz-Varela A, Córdova-Téllez L, García-Rodríguez JG, Cervantes-Ortiz F, Vaquera-Huerta H, Cuenca-Salgado JA. 2021. Adaptación y selección de maíces nativos en la región del bajío de México por su caracterización morfológica. *Revista Fitotecnia Mexicana* 44 (2): 241–241. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.241>
- Rincón-Sánchez F, Castillo-González F, Ruiz-Torres NA. 2010. Diversidad y distribución de los maíces nativos en Coahuila, México. *Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C.: Chapingo, México*. 123 p.
- Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA. 2015. Maíces Nativos en el Estado de Coahuila, México. *Claridades Agropecuarias Edición Especial* 2015: 40–44.
- Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA. 2018. Assessing maize diversity and defining a representative subset by means of selected morphological ear traits. *Plant Genetic Resources* 16 (6): 488–497. <https://doi.org/10.1017/S1479262118000047>
- Rocandio-Rodríguez M, Santacruz-Varela A, Córdova-Téllez L, López-Sánchez H, Castillo-González F, Lobato-Ortiz R, García-Zavala JJ, Ortega-Paczka R. 2014. Caracterización morfológica y agronómica de siete razas de maíz de los valles altos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37 (4): 351–361.
- Ruiz-Corral JA, Durán-Puga N, Sánchez-González J de J, Ron-Parra J, González-Eguiarte DR, Holland JB, Medina-García G. 2008. Climatic adaptation and ecological descriptors of 42 Mexican maize races. *Crop Science* 48 (4): 1502–1512. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0518>
- Sánchez GJJ. 2011. Diversidad del Maíz y el Teocintle. Informe preparado para el proyecto: “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. https://www.biodiversidad.gob.mx/media/1/genes/files/Jesus_Sanchez_2011.pdf (Recuperado: marzo 2023).

- Sánchez JJ, Goodman MM, Rawlings JO. 1993. Appropriate characters for racial classification in maize. *Economic Botany* 47 (1): 44–59.
- Sanchez GJJ, Goodman MM, Stuber CW. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54: 43–59. <https://doi.org/10.1007/BF02866599>
- SAS Institute Inc. 2018. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. Cary, NC. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Yan W. 2014. *Crop variety trials: Data Management and analysis*. John Wiley & Sons: Madison, WI, USA. 360 p.

Agrociencia



AN EXPLORATORY STUDY OF ORCHIDACEAE SPECIES FRUITS IN THE CENTRAL ZONE OF VERACRUZ STATE, MEXICO

Obdulia Baltazar-Bernal^{1*}, Víctor Manuel De-la-Cruz-Martínez², Arturo Hernández-García¹, Jesús Zavala-Ruiz³

¹ Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, Mexico. C. P. 94953.

² Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Zona Córdoba-Orizaba. Carretera Peñuela-Amatlán de los Reyes km 1, Amatlán de los Reyes, Veracruz, Mexico. C. P. 94952.

³ Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Departamento de Economía. Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco No. 186, Col. Leyes de Reforma 1a. Sección, Alcaldía Iztapalapa, Mexico City, Mexico. C. P. 09310.

* Author for correspondence: obduliabb@colpos.mx

ABSTRACT

The knowledge on Orchidaceae family fruits becomes useful in new studies, by helping to identify species that are not in flowering period and providing material for *in vitro* germination of orchid seeds. The hypothesis was that the number of orchid specimens with naturally pollinated fruits, from the central zone of the state of Veracruz, Mexico, would be more than the number of specimens that do not developed fruit naturally. The objectives of this work were: to record the flowering and fruiting periods, to characterize the orchid fruits pollinated naturally or manually. The fruit collection sites were located within the municipalities of Amatlán de los Reyes, Fortín and Tlaltetela. The work was performed between January 2019 and April 2022 (39 months). Ripe orchid fruits were collected. Morphometry was measured by recording weight (g), length (cm) and diameter of the central region (cm), complemented with a photographic record. The greatest fruit diversity of these orchids was observed and collected during the month of March. Forty-two species and their fruits were recorded, which were grouped into 8 subtribes and 32 genera. The genera with the highest number of species were: *Epidendrum*, *Prosthechea* and *Oncidium*, each with three species. Three species bloomed for 11 months: *Platystele stenostachya*, *Specklinia digitale* and *S. tribuloides*. The minor and major fruiting periods correspond to *Specklinia digitale* and *Trichocentrum stramineum*, respectively. Given the fact that in all three sites studied the greatest number of species and fruits is associated with natural pollination (27 species, 113 fruits), which exceeds the number of manually pollinated species (15 species, 51 fruits), it is possible to suggest that the largest contingent inhabits environments still compatible with the natural process of their reproduction in these sites.

Keywords: Orchid capsules, orchid flowering, fruit morphometry, natural pollination of orchids, hand pollination of orchids.

Citation: Baltazar-Bernal O, De-la-Cruz-Martínez VM, Hernández-García A, Zavala-Ruiz J. 2023. An exploratory study of orchidaceae species fruits in the central zone of Veracruz state, Mexico. *Agrociencia* 57(5): 981-1007. doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2860

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: August 23, 2022.

Approved: April 13, 2023.

Published in Agrociencia:

June 16, 2023.

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



INTRODUCTION

The Orchidaceae family is one of the richest and most diverse plant groups worldwide, second only to the Asteraceae family (Chase *et al.*, 2015), with an estimated 24,500 species (Dressler, 2005). The fruit formed by species within this family is a dehiscent capsule that presents longitudinal openings when ripe, it expels 1,000 to 4,000,000 seeds (Hágsater *et al.*, 2015). The Mexican orchidoflora has been extensively studied, recording 1,315 species (Solano-Gómez *et al.*, 2019), a number that may increase (Hágsater *et al.*, 2015). Mexico has one of the highest orchid endemism percentages (56.2 %) (Espejo-Serna, 2012), and it is higher than 41.7 % in Colombia and 42.6 % in Ecuador (Castillo-Pérez *et al.*, 2018). In Mexico, the flora of the state of Veracruz is one of the best explored and documented (Krömer *et al.*, 2020), with 432 orchid species reported (Castañeda-Zárate *et al.*, 2012; Krömer *et al.*, 2021) and three endemic species (Gómez-Pompa *et al.*, 2010). However, human activities have a high impact on the diversity of orchids and other epiphytic plants. For example, epiphyte populations in ecosystems where there is human intervention are reported to be reduced by more than half compared to conserved environments (Krömer *et al.*, 2021). As a complement, in other studies that evaluate orchid richness in coffee agroecosystems (Espejo-Serna *et al.*, 2005; Solís-Montero *et al.*, 2005; García-Franco and Toledo-Aceves, 2017), urban environment (Baltazar-Bernal *et al.*, 2020) or in home gardens (Hernández-Alcázar *et al.*, 2017), a decrease in natural pollination (Espejo-Serna *et al.*, 2005) and capsule development (Rasmussen and Johansen, 2006) is reported.

Damon and Roblero (2007) addressed the flowering period, natural pollination and fruiting period of some orchids in Chiapas. Mayer *et al.* (2011) studied the fruit development of *Oncidium flexuosum*. Sims, and Dirks-Mulder *et al.* (2019) focused on the anatomy and molecular characterization of hand-pollinated *Erycina pusilla* and *Epipactis helleborine*. However, studies on fruits in relation to their seed qualities for propagation purposes are scarce (Arditti and Ghani, 2000), and studies on ecosystems health are even scarcer. The study by Cetzal-Ix *et al.* (2014) on the diversity of orchid fruits in fragments of mesophyll forest and high evergreen forest in the municipality of Cuetzalan del Progreso, Puebla, Mexico, is considered to be the pioneer in evaluating the health of an ecosystem, by estimating its equilibrium using flowering, fruits and their morphometry as variables, in addition to providing guidance on some measures for its conservation.

This scarcity of scientific data makes it necessary to expand the knowledge on fruits of more Mexican orchid species, which would allow the identification of species when they are not in the flowering stage. By knowing the flowering and fruiting periods, the optimum time to harvest the fruits could be identified, for their specific use in conservation and utilization programs. Therefore, the hypothesis of this study was that the number of orchid specimens with naturally pollinated fruit in the central zone of the state of Veracruz, Mexico, would be more than the number of specimens that would not form fruit naturally, but rather assisted. The objectives of this work were: to record the flowering stage, natural pollination and fruiting stage in the central zone

of the state of Veracruz and to characterize the fruits of orchids pollinated in a natural and assisted way.

MATERIALS AND METHODS

The methodology of this contribution is in accordance with the scope of an exploratory study, to generate practical information to know the orchid fruits in the region, for conservation purposes.

The methodology of this study consisted of the following activities: 1) selection of three nearby and accessible sites to carry out the field data collection. For each site, 2) an inventory was made of the species of orchids with fruit obtained naturally or manually, which were identified at the species level at the flowering stage, according to García-Cruz *et al.* (2003). Then, for each of the species found, it was recorded: 3) flowering period. The species that flowered and that had a record of two previous flowering periods without fruiting were considered as candidates for assisted pollination, so cross-pollination was carried out manually, 4) pollination type was recorded: natural or assisted, for the species that developed fruits, 5) fruiting period was recorded and photographs were taken, 6) mature fruits were collected and, 7) a morphometry survey was performed, considering three variables: a) weight and its main dimensions; b) length and c) maximum width of each of the fruits; finally 8) a photographic record of the collected fruits was created.

Site of study

Field observations were carried out in two anthropized sites and in a mesophyll forest in the center of the state of Veracruz, Mexico (Figure 1). These sites were chosen under the criteria of accessibility to fruit collection and the purpose of obtaining the

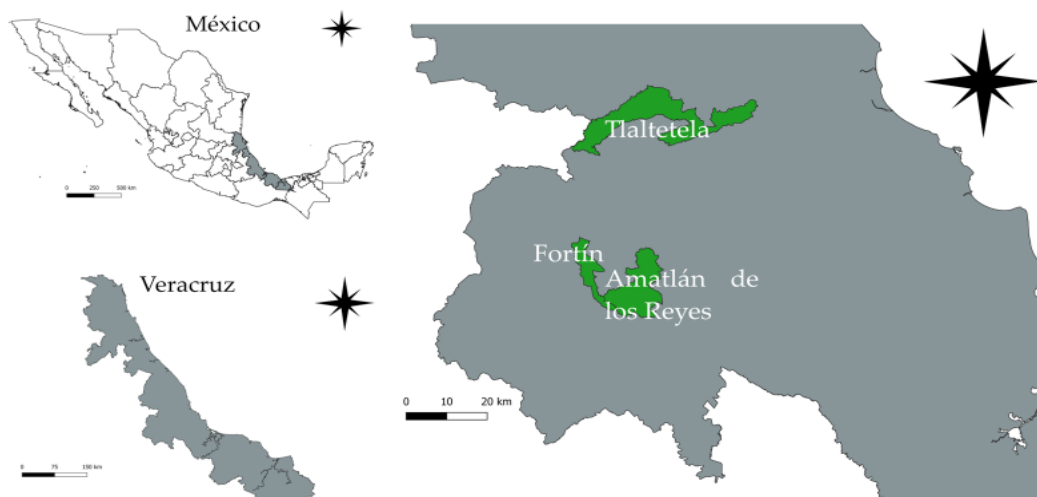


Figure 1. Location of the municipalities of Amatlán de los Reyes, Fortín and Tlaltetela, Veracruz, Mexico. The map was generated with QGIS®.

greatest number of fruits. Site one consists of gardens and an orchid garden with an approximate area of 2 ha, within a total urbanized rural area of 57 ha of gardens, laboratories, offices, roads and other facilities, in addition to experimental crop lands, of the Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, in the municipality of Amatlán de los Reyes, at coordinates 18° 51' 21" N and 96° 51' 35" W, at an altitude of 647 m above sea level. The climate of site one is warm humid with abundant summer rainfall (INEGI, 2008), an average annual temperature of 20°C (INEGI, 2007) and an average total annual precipitation of 1,900 mm (INEGI, 2006). The original vegetation of site one is tropical lowland rainforest and mesophyll forest, completely disturbed. In site one, 25 orchid species were identified, grouped in 19 genera (Baltazar-Bernal *et al.*, 2020) and, of these, ten species were born in the site on trunks and branches of *Pouteria sapota*, *Dioon edule* and *Thuja occidentalis* and the rest of the species were introduced and placed in *Mangifera indica*, *Citrus x limon*, *Persea schiedeana* and *Cedrela odorata* forophytes, more than 25 years ago. The most important species *Specklinia digitale* (Luer.) Solano & Soto Arenas. Chase (A), *Stanhopea oculata* (G. Lodd.) Lindl. (A) and *Vanilla planifolia* Andrews (Pr), classified in some risk category, according to Mexican Official Standard 059 (SEMARNAT, 2010/2019).

Site two is a private collection of an estimated area of 0.25 ha, in a suburban area, in Fortín de las Flores, at the coordinates 18° 53' 56.5" N and 96° 59' 53.6" W, at an altitude of 1,400 m. The climate of site two is semi-warm and humid, with abundant rainfall in summer (INEGI, 2008), an average annual temperature between 18°C (INEGI, 2007) and an average total annual precipitation of 2,000 mm (INEGI, 2006). The original vegetation of site two is tropical evergreen forest with *Bursera simaruba*, today converted into a suburban area, with remnants of native tree species and, mostly, introduced species of the genera *Citrus* and *Thuja*, mainly. Site two is home to 70 wild species, grouped into 30 genera.

Site three is a fragment of mountain mesophyll forest of about 400 ha, adjacent to coffee plantations, in Tlaltetela, at coordinates 19° 18' 55.6" N and 96° 53' 59.9" W, at an altitude of 960 m. The climate of site three is semi-warm sub-humid, with abundant summer rainfall (INEGI, 2008), a mean annual temperature of 18°C (INEGI, 2007) and a total annual precipitation of 1,800 mm (INEGI, 2006). The vegetation of site three is secondary arboreal vegetation of mountain mesophyll forest, with characteristic species such as *Platanus mexicana*, *Nephelea mexicana*, *Clethra mexicana*, *Liquidambar styraciflua*, *Inga vera*, *Ulmus* sp. and *Quercus* sp. (cf. Ellis and Martínez-Bello, 2010). At site three there were 50 species of orchids, from 28 different genera.

Data logging

In the three study sites, the flowering period, pollination and fruiting period of the species and their duration were determined between January 2019 and April 2022 (39 months). The duration of flowering was established with the opening of the first flower until the last flower wilted. The duration of the fruiting period, in naturally pollinated orchids, was considered from the wilting of the first pollinated flower until

the fruit was harvested and, for artificially pollinated species, manual pollination was carried out during the flowering period, with the criterion of having recorded two previous flowering periods without fruiting. Finally, the fruits were harvested when ripe, green-yellow in color and the remains of the flower could be removed easily and before dehiscence, which was developed in all cases. After collection, morphometric analysis was performed in the laboratory. The weight of each fruit was measured with a balance (ADAM Core® CQT 202, California, USA), and the length and width of its middle region with a digital vernier (Stainless hardened, Shanghai, China). Additionally, other features such as the presence of protuberances or spiniform warts were recorded. Finally, each fruit was photographed and an illustrated record of the identified species was created.

RESULTS AND DISCUSSION

Flowering

In the three study sites, 42 species of orchids were found flowering. The record of the flowering period of the different orchid species, indicates that most of them (24) flowered from January to April, 12 species started flowering in May and ended in August, and six species flowered from September to December (Table 1). Most species (39) have an annual flowering cycle with a flowering period between one and three months; in contrast, very few species flowered for up to 11 months, such as *Platystele*

Table 1. Pollination patterns studied, flowering and fruiting periods of orchid species in three sites: green areas of the Colegio de Postgraduados Campus Córdoba (1), private collection area of Fortín de las Flores (2); and mesophyll forest of Tlaltetela (3), Veracruz, Mexico.

| Species | Site | Pollination [†] | Flowering | Fruiting (Month) | Fruit harvest |
|---|---------|--------------------------|------------------|----------------------|---------------|
| <i>Acianthera circumplexa</i> (Lindl.) Pridgeon and M.W. Chase | 2 | Natural | February-March | March (1) | March |
| <i>Campylocentrum micranthum</i> (Lindl.) Rolfe | 2 | Natural | July-December | January-February (3) | February |
| <i>Catasetum integerrimum</i> Hook. | 1, 2, 3 | Natural | May-September | June-April (11) | April |
| <i>Comparettia falcata</i> Poepp. Y Endl. | 3 | Natural | July | August-January (6) | January |
| <i>Dichaea neglecta</i> Schltr. | 3 | Natural | July | August-January (6) | January |
| <i>Encyclia hanburyi</i> (Lindl.) Schltr. | 2 | Assisted | February-March | March-June (4) | June |
| <i>Encyclia parviflora</i> (Regel) Withner | 1, 3 | Assisted | April-June | May-October (6) | October |
| <i>Epidendrum melistagum</i> Hágsater. | 3 | Natural | July-September | August-March (8) | March |
| <i>Epidendrum parkinsonianum</i> | 2, 3 | Assisted | March-May | May-April (12) | April |
| <i>Epidendrum radicans</i> Pav. ex Lindl. | 1, 2, 3 | Assisted | January-April | February-April (3) | April |
| <i>Guarianthe aurantiaca</i> (Bateman ex Lindl.) Dressler and W.E. Higgins. | 2, 3 | Assisted | August | August-May (10) | May |
| <i>Gongora galeata</i> (Lindl.) Rchb.f. | 2, 3 | Natural | November-January | January-March (3) | March |
| <i>Ionopsis utricularioides</i> (Sw.) Lindl. | 2 | Natural | January | January-March (3) | March |

Table 1. Continue

| Species | Site | Pollination [†] | Flowering | Fruiting (Month) | Fruit harvest |
|---|---------|--------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| <i>Laelia albida</i> Bateman ex Lindl. | 2 | Assisted | October- November | November-March (5) | March |
| <i>Laelia anceps</i> Lindl. | 1, 2, 3 | Assisted | October- December | December-April (5) | April |
| <i>Leochilus oncidioides</i> Knowles and Westc. | 2 | Natural | November- May | January-June (6) | June |
| <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lindl. | 1, 2, 3 | Natural | April-May | May-January (10) | January- February |
| <i>Masdevallia floribunda</i> Lindl. | 2 | Natural | October-January | January-February (2) | January- February |
| <i>Maxillaria densa</i> Lindl. | 1, 3 | Natural | January-February | February-April (3) | March-April |
| <i>Maxillaria elatior</i> (Rchb. f.) Rchb. f. | 2, 3 | Assisted | October- November | October-September (12) | September |
| <i>Myrmecophila grandiflora</i> (Lindl.) Carnevali, Tapia-Muñoz y I. Ramírez. | 1, 3 | Assisted | April-May | May (1) | May |
| <i>Nidema bothii</i> (Lindl.) Schltr. | 2 | Assisted | February-March | March-July (5) | July |
| <i>Notylia barkeri</i> Lindl. | 1 | Natural | March-April | March-May (3) | May-June |
| <i>Oestlundia luteorosea</i> (A. Rich. and Galeotti) W.E. Higgins | 2 | Natural | April-May | April-June (3) | June-July |
| <i>Oncidium graminifolium</i> (Lindl.) Lindl. | 2 | Natural | June | June-July (13) | July |
| <i>Oncidium maculatum</i> (Lindl.) Lindl. | 2, 3 | Assisted | January-April | April-January (10) | January |
| <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl. | 1, 2, 3 | Natural | April-May | May-April (11) | March |
| <i>Ornithocephalus inflexus</i> Lindl. | 3 | Natural | June | June-July (2) | July-August |
| <i>Platystele stenostachya</i> (Rchb. f.) Garay. | 1, 3 | Natural | January-October | February-November (1) | February- November |
| <i>Prosthechea cochleata</i> (L.) W.E. Higgins | 2, 3 | Assisted | June-September | July-February (8) | February- May |
| <i>Prosthechea karwinskii</i> (Mart.) Soto Arenas y Salazar | 2 | Assisted | April | April- July (4) | July |
| <i>Prosthechea ochracea</i> (Lindl.) W.E. Higgins | 1, 3 | Natural | May-June | July-September (3) | September |
| <i>Restrepiella ophiocephala</i> (Lindl.) Garay and Dunst. | 2 | Natural | January-March | March-April (2) | April |
| <i>Rhyncholaelia glauca</i> (Lindl.) Schltr. | 1, 3 | Assisted | January-February | February-May (4) | May-June |
| <i>Rhynchostele maculata</i> (Lex.) Soto Arenas and Salazar. | 2 | Assisted | January-February | February-June (5) | June |
| <i>Sobralia macratha</i> Lindl. | 2, 3 | Natural | May | May-January (8) | January |
| <i>Specklinia digitale</i> (Luer) Pridgeon and M.W. Chase | 1, 3 | Natural | January- November | January-November (< 1) | January- November |
| <i>Specklinia tribuloides</i> (Sw.) Pridgeon and M.W. Chase | 1 | Natural | February-October | February-October (2.5) | February- October |
| <i>Stanhopea oculata</i> [Lodd.] Lindley 1832 | 3 | Natural | July-September | October-March (6) | March |

Table 1. Continue

| Species | Site | Pollination [†] | Flowering | Fruiting (Month) | Fruit harvest |
|---|------|--------------------------|------------------|--------------------|---------------|
| <i>Stelis purpurascens</i> A. Rich. and Galeotti. | 3 | Natural | January-February | February-April (2) | March-April |
| <i>Trichocentrum stramineum</i> (Bateman ex Lindl.) M.W. Chase y N.H. Williams. | 1, 3 | Natural | January-February | February-May (14) | May |
| <i>Trichosalpinx ciliaris</i> (Lindl.) Luer. | 1 | Natural | February-June | February-June (5) | June-October |

[†]Assisted pollination was carried out after two consecutive periods without fruiting.

stenostachya, *Specklinia digitale* and *S. tribuloides*. Cetzal-Ix *et al.* (2014) report flowering of *P. stenostachya* in October in the tropical rainforest, as possibly high temperatures limit the flowering period. However, *Campylocentrum micranthum*, *Epidendrum melistagum*, *Gongora galeata*, *Lycaste aromatica*, *Masdevallia floribunda*, *Nidema bothii*, *Notylia barkeri*, *Platystele stenostachya*, *Prosthechea cochleata*, *P. ochracea*, *Sobralia macratha* and *Stanhopea oculata*, which are also reported by Cuetzal-Ix *et al.* (2014), had similar flowering periods, being orchid species that develop in mesophyll forest and tropical forest. Of all the species studied, *Specklinia digitale* (Figure 2O), which is classified in the Threatened (A) category (SEMARNAT, 2010/2019) as well as, *Laelia albida* (Figure 3I), an orchid of great beauty with great ornamental potential, stand out.

Pollination types

Regarding pollination, it was found that, of the 42 different species that formed fruit, 27 (64 %) were naturally pollinated and 15 (36 %) were hand-pollinated (Table 1). This ratio is an indication that environmental conditions are compatible with the presence of natural pollinators. Bees of the tribe Euglossini (Williams *et al.*, 1981; Damon and Roblero, 2007) and the genus *Euglossa* have been documented to pollinate the orchids *Catasetum integerrimum*, *Notylia barkeri*, *Oestlundia luteorosea* and *Lycaste aromatica*, the latter of which have been recorded as pollinators of up to more than 600 orchid species (Santos-Murgas and Añino-Ramos, 2016). However, natural pollination in the anthropogenic environment analyzed suggests that, for these organisms, food sources are available in situ and/or relatively close by, thus allowing natural pollination of 27 of the species studied.

Fruiting

Although fruiting as a result of natural pollination is a positive indicator that the individual orchid has sufficient conditions for natural reproduction, it is not a guarantee that the individual orchid will be able to recover its populations. Orchid fruits are therefore valuable resources for mass propagation programs using *in vitro* culture techniques or with symbiotic assistance. Given that the ripening period for collection is relatively short, it is very important to determine its fruiting period, as

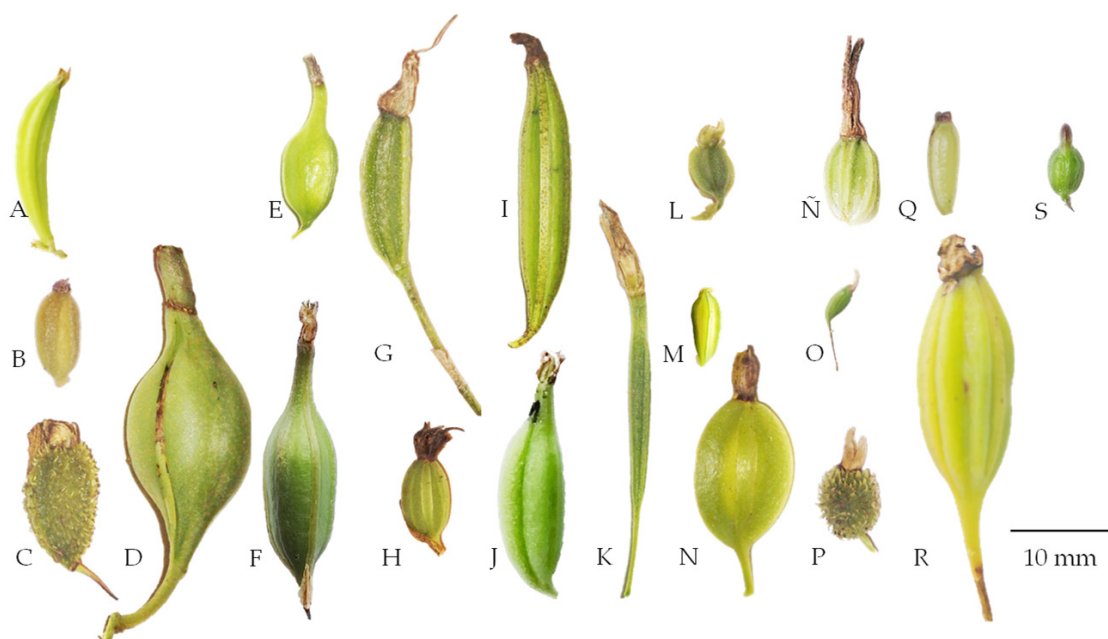


Figure 2. Fruits obtained from orchids at three sites† in central Veracruz state, Mexico, product of natural (Pn) or assisted (Pa) pollination. A: *Acianthera circumplexa* (Pn). B: *Campylocentrum micranthum* (Pn). C: *Dichaea neglecta* (Pn). D: *Epidendrum melistagum* (Pn). E: *Ionopsis utricularioides* (Pn). F: *Leochilus oncidioides* (Pn). G: *Masdevallia floribunda* (Pn). H: *Maxillaria densa* (Pn). I: *Nidema bothii* (Pn). J: *Notylia barkeri* (Pn). K: *Oestlundia luteorosea* (Pn). L: *Ornithocephalus inflexus* (Pn). M: *Platystele stenostachya* (Pn). N: *Prosthechea ochracea* (Pn). Ñ: *Restrepia ophioccephala* (Pn). O: *Specklinia digitale* (Pn). P: *Specklinia tribuloides* (Pn). Q: *Stelis purpurascens* (Pn). R: *Trichocentrum stramineum* (Pn). S: *Trichosalpinx ciliaris* (Pn). †Sites: (1) Jardines en Amatlán de Reyes; (2) Suburban area in Fortín de las Flores; and (3) Secondary arboreal vegetation of mesophyll forest in Tlaltetela.

it could facilitate the creation of germplasm banks of orchids that require priority conservation actions (Cuetzal-Ix *et al.*, 2014).

The fruits collected were from 42 orchid species, grouped into nine subtribes and 32 genera. Of the 42 fruits in total, 27 fruits (from an equal number of species, classified in 25 genera) were the product of natural pollination and 15 fruits (15 species, 11 genera) originated from assisted pollination (Table 1; Figures 2 and 3). Therefore, it is feasible to suggest that the most numerous group inhabits environments that are still compatible with the natural pollination process for their reproduction. The subtribes with the highest number of species from the fruits collected were: Laeliinae (15), followed by Oncidiinae (10) and Pleurothallidinae (8). The genera with the highest number of species were: *Epidendrum*, *Prosthechea* and *Oncidium* with three each and the rest with only two or one species (Table 2, Figures 2 and 3). Observations from this study showed that fruiting is concentrated in the greatest dry period, from January to June, and that most orchid fruiting periods occur in March. Two species require less



Figure 3. Orchid fruits at three sites[†] in central Veracruz state, Mexico, product of natural (Pn) or assisted (Pa) pollination. A: *Catasetum integerrimum* (Pn). B: *Comparettia falcata* (Pn). C: *Encyclia hanburyi* (Pa). D: *Encyclia parviflora* (Pa). E: *Epidendrum melistagum* (Pn). F: *Epidendrum parkinsonianum* (Pa). G: *Gongora galeata* (Pn). H: *Guarianthe aurantiaca* (Pa). I: *Laelia albida* (Pa). J: *Laelia anceps* (Pa). K: *Lycaste Aromatica* (Pn). L: *Maxillaria elatior* (Pa). M: *Myrmecophila grandiflora* (Pa). N: *Oncidium graminifolium* (Pn). Ñ: *Oncidium maculatum* (Pa). O: *Oncidium sphacelatum* (Pn). P: *Prosthechea cochleata* (Pa). Q: *Prosthechea karwinskii* (Pa). R: *Rhynchoaelia glauca* (Pa). S: *Rhynchostele maculata* (Pa). T: *Sobralia macrantha* (Pn). U: *Stanhopea oculata* (Pn).
[†]Sites: (1) Jardines en Amatlán de Reyes; (2) Suburban area in Fortín de las Flores; and (3) Secondary arboreal vegetation of mesophyll forest in Tlaltetela.

Table 2. Orchid species, number and morphometry of fruits obtained in three sites: garden areas of the Colegio de Postgraduados Campus Córdoba (1); private collection area of Fortín de las Flores (2); and mesophyll forest of Tlaltetela (3), Veracruz, Mexico.

| Subtribe [†] | Species | Number of fruits | Weight (g) / Length (cm) x Width (cm) | Shape |
|-----------------------|--|------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Angraecinae | <i>Campylocentrum micranthum</i> (Lindl.) Rolfe. | 10 | 0.10 / 0.85 x 0.4 | Oblong |
| Catasetiinae | <i>Catasetum integerrimum</i> Hook. | 6 | 70.20 / 12 x 5.2 | Ribbed oblong |
| | <i>Encyclia hanburyi</i> (Lindl.) Schltr. | 3 | 1.78 / 5.5 x 1.5 | Ribbed elliptical |
| | <i>Encyclia parviflora</i> (Regel) Withner. | 3 | 1.91 / 6.2 x 1.1 | Ribbed Obovate |
| | <i>Epidendrum melistagum</i> Hágsater. | 1 | 3.37 / 4.5 x 1.2 | Ribbed elliptical |
| | <i>Epidendrum parkinsonianum</i> Hook. | 2 | 4.05 / 12.5 x 2.3 | Ribbed oblong |
| | <i>Epidendrum radicans</i> Pav. ex Lindl. | 6 | 1.24 / 4.6 x 1.8 | Elíptical |
| | <i>Guarianthe aurantiaca</i> (Bateman ex Lindl.) Dressler and W.E. Higgins. | 3 | 1.70 / 3.2 x 1.3 | Elíptical |
| | <i>Laelia albida</i> Bateman ex Lindl. | 4 | 0.55 / 2.1 x 1 | Ribbed globose |
| | <i>Laelia anceps</i> Lindl. | 10 | 4.38 / 5.4 x 1.8 | Ribbed oblong |
| Laeliinae | <i>Myrmecophila grandiflora</i> (Lindl.) Carnevali, Tapia-Muñoz and I. Ramírez | 4 | 9.49 / 8.2 x 2.3 | Obovate |
| | <i>Nidema bothii</i> (Lindl.) Schltr. | 1 | 0.48 / 3.2 x 0.4 | Ribbed oblong |
| | <i>Oestlundia luteorosea</i> (A. Rich. and Galeotti) W.E. Higgins | 1 | 0.24 / 2.1 x 0.2 | Ribbed elongated |
| | <i>Prosthechea cochleata</i> (L.) W.E. Higgins | 2 | 2.78 / 4.1 x 1.8 | Ribbed obovada |
| | <i>Prosthechea karwinskii</i> (Mart.) Soto Arenas y Salazar | 1 | 3.56 / 10.4 x 1.2 | Elongated |
| | <i>Prosthechea ochracea</i> (Lindl.) W.E. Higgins | 4 | 0.28 / 1.7 x 1 | Globose |
| | <i>Rhynchoaelia glauca</i> (Lindl.) Schltr. | 4 | 12.25 / 12.3x2.3 | Elíptical |

Table 2. Continue

| Subtribe [†] | Species | Number of fruits | Weight (g) / Length (cm) x Width (cm) | Shape |
|-----------------------|--|------------------|---------------------------------------|----------------|
| Maxillariinae | <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lindl. | 4 | 12.08 / 5.5 x 2.2 | Ribbed globose |
| | <i>Maxillaria densa</i> Lindl. | 40 | 0.10 / 0.85 x 0.4 | Globose |
| | <i>Maxillaria elatior</i> (Rchb. f.) Rchb. f. | 2 | 1.68 / 3.8 x 1.1 | Ribbed oblong |
| | <i>Comparettia falcata</i> Poepp. and Endl. | 2 | 1.87 / 5.75 x 1.2 | Ribbed ovate |
| | <i>Ionopsis utricularioides</i> (Sw.) Lindl. | 1 | 0.22 / 1.8 x 0.5 | Ovate |
| | <i>Leochilus oncidioides</i> Knowles and Westc. | 3 | 0.95 / 2.2 x 0.7 | Oblong |
| Oncidiinae | <i>Notylia Barkeri</i> Lindl. | 2 | 0.48 / 1.6 x 0.5 | Ribbed ovate |
| | <i>Oncidium graminifolium</i> (Lindl.) Lindl. | 3 | 0.71 / 4 x 0.7 | Ribbed oblong |
| | <i>Oncidium maculatum</i> (Lindl.) Lindl. | 3 | 3.20 / 6.5 x 1.8 | Curved oblong |
| | <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl. | 15 | 5.82 / 5.2 x 1.6 | Oblong |
| | <i>Ornithocephalus inflexus</i> Lindl. | 1 | 0.003 / 1 x 0.3 | Ribbed globose |
| | <i>Rhynchostele maculata</i> (Lex.) Soto Arenas and Salazar. | 2 | 6.68 / 6.9 x 1.6 | Ovate |
| | <i>Trichocentrum stramineum</i> (Bateman ex Lindl.) M.W. Chase y N.H. Williams | 3 | 0.12 / 2.3 x 0.9 | Ribbed ovate |
| | <i>Sobralia macratha</i> Lindl. | 2 | 10.62 / 8.0 x 2.0 | Ribbed oblong |
| Stanhopeinae | <i>Gongora galeata</i> (Lindl.) Rchb.f. | 2 | 4.25 / 7.0 x 1.0 | Curved oblong |
| | <i>Stanhopea oculata</i> [Lodd.] Lindley 1832 | 1 | 15.00 / 11 x 2.0 | Ribbed oblong |
| | <i>Acianthera circumplexa</i> (Lindl.) Pridgeon and M.W. Chase | 1 | 0.34 / 1.6 x 0.3 | Curved oblong |
| | <i>Masdevallia floribunda</i> Lindl. | 1 | 0.24 / 1.5 x 0.5 | Oblong |
| | <i>Platystele stenostachya</i> (Rchb. f.) Garay. | 2 | 0.005 / 0.5 x 0.2 | Obovate |
| Pleurothallidinae | <i>Specklinia digitale</i> (Luer) Pridgeon and M.W. Chase | 2 | 0.017 / 0.3 x 0.1 | Oblong |
| | <i>Specklinia tribuloides</i> (Sw.) Pridgeon and M.W. Chase ^{††} | 1 | 0.11 / 1 x 0.5 | Spiny globose |
| | <i>Stelis purpurascens</i> A. Rich. and Galeotti. | 1 | 0.14 / 0.9 x 0.3 | Oblong |
| | <i>Restrepiella ophiocephala</i> (Lindl.) Garay and Dunst. | 2 | 0.11 / 1 x 0.5 | Ribbed oblong |
| | <i>Trichosalpinx ciliaris</i> (Lindl.) Luer. | 2 | 0.009 / 0.6 x 0.3 | Globose |
| Zygopetalinae | <i>Dichaea neglecta</i> Schltr. ^{††} | 1 | 0.10 / 1.2 x 0.8 | Spiny globose |

[†] Angulo and Balam (2021).

^{††} Fruit with presence of protuberances or spiniform warts.

than 28 days to mature, which contributes to the periods reported by Rasmussen and Johansen (2006) of 45 days to 20 months for cultivated orchid species.

Fruit morphometry

Fruit morphometry is the quantitative characterization, in this case, the measurement of the weight, dimensions and shape of the fruits that were harvested for this study (Table 2). In general, orchid fruits are light; however, there are contrasts. For example,

with respect to weight, the heaviest fruit recorded was of the species *Catasetum integerrimum* (70.2 g, Figure 3A), followed by the fruit of *Stanhopea oculata* (15.0 g, Figure 3U). In contrast, the lightest fruit was that of *Platystele stenostachya* species (5 mg, Figure 2M), followed by the fruit of *Trichosalpinx ciliaris* (9 mg, Figure 2S). Regarding fruit size, there are also contrasts. For example, the largest fruit size recorded was of *Epidendrum parkinsonianum* species (12.5 cm, Figure 3F), followed by *Rhyncholaelia glauca* fruit (12.35 cm, Figure 3R), *Catasetum integerrimum* capsule 12 x 5.2 cm (Figure 3A) and *Stanhopea oculata* fruit 11 x 2 cm (Figure 3), which coincides with the size reported by Cetzal-Ix *et al.* (2014). There are also very tiny orchid fruits, such as those of the species *Specklinia digitale*, measuring only 0.3 x 0.1 cm (Figure 2O) or those of *Platystele stenostachya* measuring 0.5 x 0.2 cm (Figure 2M), which coincide with those reported by Cetzal-Ix *et al.* (2014). In contrast, the widest fruits were of the species *Catasetum integerrimum* (4.2 cm, Figure 3A) and *Lycaste aromatica* (3.2 cm, Figure 3K) and the narrowest fruits were of the species *Specklinia digitale* (0.1 cm, Figure 2O) and *Platystele stenostachya* (0.2 cm, Figure 2M) (Table 2). Fruit shapes can vary (Figures 2 and 3) and only two of them showed spiniform protuberances or warts (Figures 2C and 2P).

The observations of this study confirm the conclusions of Cetzal-Ix *et al.* (2014), on the need for further research regarding orchid fruits. Although the results of this work support the idea that fruit morphometrics and their images could help in the identification of the orchids shown, as suggested by Reyes-López *et al.* (2014) and Rojas-García and Maldonado-Peralta (2021), when they are not in flowering season, it is necessary to expand the study of systematic botany of orchid species that includes the detailed description of the fruits.

CONCLUSIONS

In this exploratory study it was possible to identify fruits of 42 different orchid species (32 genera) in the central zone of the state of Veracruz, Mexico. The greatest diversity and number of species and fruits is associated with natural pollination (27 species, 113 fruits), which exceeds those pollinated by hand (15 species, 51 fruits). It is possible to suggest that, although they are in disturbed environments, their pollinators are still present. It was also possible to observe that there are more fruits in the dry season, around the beginning of spring. The orchids *Platystele stenostachya*, *Specklinia digitale* and *S. tribuloides* showed availability of fruits almost all year round, which can be used for symbiotic or asymbiotic reproduction. The morphometrics recorded and the photographic record of the material studied evidenced a variety, ranging from tiny (*Specklinia digitale*, 17 mg, 0.3 x 0.1 cm) to large (*Catasetum integerrimum*, 70.2 g, 12 x 5.2 cm) weights and sizes. The information generated in this study of orchid fruits is important as an identification tool when flowers are not present. Furthermore, it can be used in future studies on *in vitro* germination of wild orchids.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (National Council of Science and Technology) for the scholarship granted to one of the authors for his master's degree studies at the Colegio de Postgraduados.

REFERENCES

- Angulo DF, Balam NR. 2021. Clasificación de las Orquídeas: una breve reseña filogenética. *In* Las Orquídeas de Veracruz. Viccon Esquivel J, Castañeda Zárate M, Castro Cortés R, Cetzal-Ix W. (eds.); Universidad Veracruzana: Xalapa, Veracruz, México, pp: 77–88.
- Arditti J, Ghani AKA. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145 (3): 367–421. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>
- Baltazar-Bernal O, De la Cruz-Martínez VM, Zavala-Ruiz J. 2020. Las orquídeas del Campus Córdoba, su estudio y preservación. Texcoco, México: Colegio de Postgraduados.
- Castañeda-Zárate M, Viccon-Esquivel J, Ramos-Castro SE, Solano-Gómez R. 2012. New records of Orchidaceae for Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83 (1): 281–284.
- Castillo-Pérez LJ, Martínez-Soto D, Maldonado-Miranda JJ, Alonso-Castro, AJ, Carranza-Álvarez C. 2018. The endemic orchids of Mexico: A review. *Biología* 74 (1): 1–13. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, Van den Berg C, Schuiteman A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177 (2): 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- Cetzal-Ix W, Alvarez-Mora R, Basu SK, Cosme-Pérez J, Noguera-Savelli E. 2014. Orchid fruit diversity at Puebla Mexico: A new insight into the biodiversity of a fragmented ecosystem with need for conservation and potential for horticultural exploitations in future. *In*: Sustainable Horticultural Systems: Issues, technology and innovation Vol 2. Nandwani D. (ed.); Springer: Switzerland. pp. 207–220. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06904-3>
- Damon A, Roblero PS. 2007. A survey of pollination in remnant orchid populations in Soconusco Chiapas, Mexico. *Tropical Ecology* 48 (1): 1–14.
- Dirks-Mulder A, Ahmed I, uit het Broek M, Krol L, Menger N, Snier J, van Winzum A, de Wolf A, van't Wout M, Zeegers JJ, Butôt R, Heijungs R, van Heuven BJ, Kruizinga J, Langelaan R, Smets EF, Star W, Bemer M, Gravendeel B. 2019. Morphological and Molecular Characterization of Orchid Fruit Development. *Frontiers in Plant Science* 10: 137. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00137>
- Dressler RL. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26 (1-2): 155–158.
- Ellis EA, Martínez-Bello M. 2010. Vegetación y uso de suelo. *In* Atlas del Patrimonio Natural, Histórico y Cultural de Veracruz: I Patrimonio natural. Benítez G, Welsh-Rodríguez C. (eds.); Universidad Veracruzana: Xalapa, Veracruz, México, pp: 203–226.
- Espejo-Serna A, López-Ferrari AR, Jiménez Machorro R, Sánchez Saldaña L. 2005. Las orquídeas de los cafetales en México: una opción para el uso sostenible de ecosistemas tropicales. *Revista de Biología Tropical* 53 (1-2): 73–84.
- Espejo-Serna A. 2012. El endemismo en las Liliopsida mexicanas. *Acta Botánica Mexicana* 100: 195–257. <https://doi.org/10.21829/abm100.2012.36>
- García-Cruz J, Sánchez LM, Jiménez R, Solano R. 2003. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Orchidaceae, tribu Epidendreae. Herbario AMO, Fascículo, 119.
- García-Franco JG, Toledo-Aceves MT. 2017. Diversidad de orquídeas (Orchidaceae) en agroecosistemas cafetaleros. *Agroproductividad* 10 (6): 19–24.
- Gómez-Pompa A, Krömer T, Castro-Cortés R. 2010. Atlas de la Flora de Veracruz: Un patrimonio natural en peligro. Primera edición. Gobierno del Estado de Veracruz y Universidad Veracruzana. Xalapa, México.
- Hágsater E, Soto-Arenas MÁ, Salazar GA, Jiménez-Machorro R, López-Rosas MA, Dressler RL. 2015. Las orquídeas de México. Ciudad de México: Instituto Chinoín.

- Hernández-Alcázar JA, Farrera-Sarmiento O, Beutelspacher CR. 2017. Orquídeas en huertos familiares de Pantelhó, Chiapas, México. *Lacandonia* 11 (1): 11–18.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2006. Conjunto de datos vectoriales escala 1:1 000 000, Precipitación media anual, Estados Unidos Mexicanos [shapefile]. 1:1,000,000. Aguascalientes, México. Recuperado el 7 de mayo, 2022 de: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825267544>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2007. Conjunto de datos vectoriales escala 1:1 000 000. Temperatura media anual, Estados Unidos Mexicanos [shapefile]. 1:1,000,000. Aguascalientes, México. Recuperado el 7 de mayo, 2022 de: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825267551>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2008. Conjunto de datos vectoriales escala 1:1 000 000, Unidades climáticas, Estados Unidos Mexicanos [shapefile]. 1:1,000,000. Aguascalientes, México. Recuperado el 7 de mayo, 2022 de: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825267568>
- Krömer T, Espejo-Serna A, López-Ferrari AR, Acebey AR, García-Cruz J, Mathieu G. 2020. Las angiospermas epífitas del estado de Veracruz, México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 91: 1–110. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3415>
- Krömer T, Viccon-Esquivel J, Gómez-Díaz JA. 2021. Efectos antrópicos sobre la diversidad de epífitas vasculares y orquídeas en el centro de Veracruz. *In Las Orquídeas de Veracruz*. Viccon Esquivel J, Castañeda Zárate M, Castro Cortés R, Cetzal Ix W. (eds.); Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México, pp: 235–252.
- Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Appezzato-da-Glória B. 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206 (6): 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.0>
- Rasmussen FN, Johansen B. 2006. Carpology of orchids. *Selbyana* 27 (1): 44–53.
- Reyes-López D, Flores-Jiménez Á, Huerta-Lara M, Kelso-Bucio HA, Avendaño-Arrazate CH, Lobato-Ortiz R, Aragón-García A, López-Olguín JF. 2014. Variación morfométrica de fruto y semilla en cuatro especies del género *Vanilla*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 1 (3): 205–218.
- Rojas-García AR, Maldonado-Peralta MÁ. 2021. Cualidades morfológicas de frutos de tres especies de bromelia (Bromeliaceae). *Revista Fitotecnia Mexicana* 44 (4): 521–521.
- Santos-Murgas A, Añino-Ramos YJ. 2016. Contribución al conocimiento de la diversidad de abejas de las orquídeas (Apidae: Euglossini) de la Península de Azuero, Panamá. *Tecnociencia* 18: 45–58.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. México: Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre de 2010.
- Solano-Gómez R, Salazar GA, Huerta H, Hágsater E, Jiménez R. 2019. Diversity of Mexican Orchids: Synopsis of richness and distribution patterns. *In Proceedings of the 22th World Orchid Conference*. Pridgeon AM. (ed.); Asociación Ecuatoriana de Orquideología. Guayaquil, Ecuador. pp. 255–270.
- Solís-Montero L, Flores-Palacios A, Cruz-Angón A. 2005. Shade-coffee plantations as refuges for tropical wild orchids in central Veracruz, Mexico. *Conservation Biology* 19 (3): 908–916. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00482.x>
- Williams NH, Atwood JT, Dodson CH. 1981. Floral fragrance analysis in *Anguloa*, *Lycaste* and *Mendoncella* (Orchidaceae). *Selbyana* 5 (3-4): 291–295.

ESTUDIO EXPLORATORIO DE FRUTOS DE ESPECIES DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE EN LA ZONA CENTRO DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

Obdulia Baltazar-Bernal^{1*}, Víctor Manuel De-la-Cruz-Martínez², Arturo Hernández-García¹, Jesús Zavala-Ruiz³

¹ Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94953.

² Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Zona Córdoba-Orizaba. Carretera Peñuela-Amatlán de los Reyes km 1, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94952.

³ Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Departamento de Economía. Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco No. 186, Col. Leyes de Reforma 1a. Sección, Alcaldía Iztapalapa, Ciudad de México, México. C. P. 09310.

* Autor para correspondencia: obduliabb@colpos.mx

RESUMEN

El conocimiento de los frutos de la familia Orchidaceae se torna útil en nuevos estudios, al facilitar la identificación de especies que no se encuentren en periodo de floración y proporcionar material para la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. La hipótesis fue que el número de ejemplares de orquídeas con frutos polinizados de manera natural, de la zona centro del estado de Veracruz, México, serían más que el número de ejemplares que no formen fruto de manera natural, sino asistida. Los objetivos de este trabajo fueron: registrar los periodos de la floración y fructificación, caracterizar los frutos de orquídeas polinizados de manera natural o manual. Los sitios de colecta de frutos se ubicaron dentro de los municipios de Amatlán de los Reyes, Fortín y Tlaltetela. El trabajo se realizó entre enero de 2019 y abril de 2022 (39 meses). Se recolectaron frutos de orquídeas en estado maduro. Se realizó su morfometría mediante el registro de peso (g), longitud (cm) y diámetro de la región central (cm), complementándose con un registro fotográfico. La mayor diversidad de frutos de estas orquídeas se observó y recolectó durante el mes de marzo. Se registraron 42 especies y sus frutos, las cuales resultaron agrupadas en 8 subtribus y 32 géneros. Los géneros con mayor número de especies fueron: *Epidendrum*, *Prosthechea* y *Oncidium*, cada una con tres especies. Tres especies florecieron durante 11 meses: *Platystele stenostachya*, *Specklinia digitale* y *S. tribuloides*. Los periodos de fructificación menor y mayor, corresponden a *Specklinia digitale* y *Trichocentrum stramineum*, respectivamente. Dado que en los tres sitios estudiados la mayor cantidad de especies y de frutos se asocia a la polinización natural (27 especies, 113 frutos) que supera las especies polinizadas manualmente (15 especies 51 frutos), es posible sugerir que el contingente más numeroso habita ambientes aún compatibles con el proceso natural de su reproducción en esos sitios.

Palabras clave: Cápsulas de orquídea, floración de orquídeas, morfometría de frutos, polinización natural de orquídeas, polinización manual de orquídeas.

Citation: Baltazar-Bernal O, De-la-Cruz-Martínez VM, Hernández-García A, Zavala-Ruiz J. 2023. Estudio exploratorio de frutos de especies de la familia Orchidaceae en la zona centro del estado de Veracruz, México.

Agrociencia 57(5): 981-1007. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2860

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: August 23, 2022.

Approved: April 13, 2023.

Published in Agrociencia:
June 16, 2023.

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



INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es uno de los grupos vegetales más ricos y diversos a nivel mundial, únicamente superadas por la familia Asteraceae (Chase *et al.*, 2015), con un estimado de 24,500 especies (Dressler, 2005). El fruto que forman las especies dentro de esta familia es una cápsula dehiscente que al madurar presenta aberturas longitudinales, por donde expulsa de 1,000 a 4,000,000 de semillas (Hágsater *et al.*, 2015). La orquídeoflora mexicana ha sido ampliamente estudiada, registrando 1,315 especies (Solano-Gómez *et al.*, 2019), cifra que puede aumentar (Hágsater *et al.*, 2015). México posee el 56.2 % de endemismo de orquídeas (Espejo-Serna, 2012), uno de los más altos, superior al 41.7 % de Colombia y el 42.6 % de Ecuador (Castillo-Pérez *et al.*, 2018). En México, la flora del estado de Veracruz es una de las mejor exploradas y documentadas (Krömer *et al.*, 2020), reportándose 432 especies de orquídeas (Castañeda-Zárate *et al.*, 2012; Krömer *et al.*, 2021) y tres especies endémicas (Gómez-Pompa *et al.*, 2010). Sin embargo, en la actualidad, las actividades humanas tienen un alto impacto sobre la diversidad de orquídeas y otras plantas epífitas. Por ejemplo, las poblaciones de epífitas en ecosistemas donde existe intervención humana se reporta una reducción a más de la mitad, en comparación con los ambientes conservados (Krömer *et al.*, 2021). Complementariamente, en otros estudios que evalúan la riqueza de orquídeas en agroecosistemas cafetaleros (Espejo-Serna *et al.*, 2005; Solís-Montero *et al.*, 2005; García-Franco y Toledo-Aceves, 2017), en ambiente urbano (Baltazar-Bernal *et al.*, 2020) o en huertos familiares (Hernández-Alcázar *et al.*, 2017), donde se reporta una disminución en la polinización natural (Espejo-Serna *et al.*, 2005) y en el desarrollo de la cápsula (Rasmussen y Johansen, 2006).

Damon y Roblero (2007) abordaron el período de floración, la polinización natural y el periodo de fructificación de algunas orquídeas en Chiapas. Mayer *et al.* (2011) estudiaron el desarrollo del fruto de *Oncidium flexuosum*. Sims, y Dirks-Mulder *et al.* (2019) se enfocaron en la anatomía y la caracterización molecular de *Erycina pusilla* y *Epipactis helleborine*, polinizadas manualmente. Sin embargo, estudios sobre los frutos en relación con las cualidades de sus semillas con fines de propagación son escasos (Arditti and Ghani, 2000), y aún más los estudios sobre la salud de los ecosistemas. El estudio de Cetzal-Ix *et al.* (2014) sobre la diversidad de frutos de orquídeas en fragmentos de bosque mesófilo y selva alta perennifolia, en el municipio de Cuetzalan del Progreso, Puebla, México, es considerado el pionero en evaluar la salud de un ecosistema, al estimar su equilibrio utilizando como variables la floración, los frutos y su morfometría, además de orientar sobre algunas medidas para su conservación.

Esta escasez de datos científicos hace necesario ampliar el conocimiento sobre frutos de más especies de orquídeas mexicanas, lo que permitiría identificar las especies cuando no se encuentren en etapa de floración. Al conocer las épocas de floración y fructificación, se podría identificar el momento óptimo para recolectar los frutos, para su uso específico en programas de conservación y aprovechamiento. Por lo anterior, la hipótesis planteada de este estudio fue que el número de ejemplares de orquídeas con frutos polinizados de manera natural en la zona centro del estado de Veracruz, Méxi-

co, serían más que el número de ejemplares, que no formarían fruto de manera natural, sino asistida. Los objetivos de este trabajo fueron: registrar la etapa de floración, la polinización natural y la etapa de fructificación en la zona centro del estado de Veracruz y caracterizar los frutos de orquídeas polinizados de manera natural y asistida.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología de esta contribución es acorde con los alcances de un estudio exploratorio, para generar información práctica para conocer los frutos de orquídeas en la región, con fines de conservación.

La metodología de este estudio consistió en las siguientes actividades: 1) selección de tres sitios cercanos y accesibles para poder realizar el levantamiento de datos en campo. Para cada sitio, 2) se realizó el inventario de las especies de orquídeas de fruto obtenidos de forma natural o manual, las cuales se identificaron a nivel de especie en la etapa de floración, misma que se realizó de acuerdo con García-Cruz *et al.* (2003). Luego, para cada una de las especies encontradas, se registró: 3) el periodo de floración. Las especies que florecieron y que tenían registro de dos periodos previos de floración sin fructificación, se consideraron como candidatas a polinización asistida, por lo que se procedió a realizarse de manera manual la polinización cruzada, 4) se registró el tipo de polinización: natural o asistida, para las especies que desarrollaron frutos, 5) se registró el periodo de fructificación y se tomaron fotografías, 6) los frutos maduros se recolectaron y, 7) se realizó el levantamiento de la morfometría, considerando tres variables: a) el peso y sus dimensiones principales; b) la longitud y c) el ancho máximo de cada uno de los frutos; por último 8) se creó un registro fotográfico de los frutos recolectados.

Sitio de estudio

Las observaciones de campo se llevaron a cabo en dos sitios antropizados y en un bosque mesófilo del centro del estado de Veracruz, México (Figura 1). Estos sitios fueron elegidos bajo el criterio de accesibilidad a la colecta de frutos y a la finalidad de obtener el mayor número de ellos. El sitio uno está conformado por los jardines y un orquideario de una superficie aproximada de 2 ha, dentro de una superficie rural urbanizada total de 57 ha de jardines, laboratorios, oficinas, caminos y otras instalaciones, además de terrenos de cultivos experimentales, del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, en el municipio de Amatlán de los Reyes, en las coordenadas 18° 51' 21" N y 96° 51' 35" O, a 647 m de altitud. El clima del sitio uno es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (INEGI, 2008), una temperatura media anual de 20°C (INEGI, 2007) y una precipitación total anual media de 1,900 mm (INEGI, 2006). La vegetación original del sitio uno es selva baja tropical y bosque mesófilo, completamente perturbado. En el sitio uno se identificaron 25 especies de orquídeas, agrupadas en 19 géneros (Baltazar-Bernal *et al.*, 2020) y, de éstas, diez especies nacieron en el sitio en troncos y ramas de *Pouteria sapota*, *Dioon edule* y *Thuja occidentalis* y el resto de las especies fueron introducidas y colocadas en forófitos de *Mangifera indica*, *Citrus*



Figura 1. Localización de los municipios de Amatlán de los Reyes, Fortín y Tlaltetela, Veracruz, México. El mapa fue generado con QGIS®.

x limon, *Persea schiedeana* y *Cedrela odorata*, hace más de 25 años. Destacan las especies *Specklinia digitale* (Luer.) Solano & Soto Arenas. Chase (A), *Stanhopea oculata* (G. Lodd.) Lindl. (A) y *Vanilla planifolia* Andrews (Pr), clasificadas en alguna categoría de riesgo, según la Norma Oficial Mexicana 059 (SEMARNAT, 2010/2019).

El sitio dos es una colección particular de una superficie estimada de 0.25 ha, en un área suburbana, en Fortín de las Flores, en las coordenadas 18° 53' 56.5" N y 96° 59' 53.6" O, a una altitud de 1,400 m. El clima del sitio dos es semicálido húmedo, con abundantes lluvias en verano (INEGI, 2008), una temperatura media anual entre 18°C (INEGI, 2007) y una precipitación total anual media de 2,000 mm (INEGI, 2006). La vegetación original del sitio dos es bosque tropical perennifolio con *Bursera simaruba*, hoy convertida en un área suburbana, con remanentes de especies arbóreas nativas y, mayormente, especies introducidas de los géneros *Citrus* y *Thuja*, principalmente. El sitio dos alberga 70 especies silvestres, agrupadas en 30 géneros.

El sitio tres es un fragmento de bosque mesófilo de montaña de unas 400 ha, aledaño a cultivos de café, en Tlaltetela, en las coordenadas 19° 18' 55.6" N y 96° 53' 59.9" O, a una altitud de 960 m. El clima del sitio tres es semicálido subhúmedo, con abundantes lluvias en verano (INEGI, 2008), una temperatura media anual de 18°C (INEGI, 2007) y una precipitación total anual de 1,800 mm (INEGI, 2006). La vegetación del sitio tres es vegetación secundaria arbórea de bosque mesófilo de montaña, con especies características como *Platanus mexicana*, *Nephelea mexicana*, *Clethra mexicana*, *Liquidambar styraciflua*, *Inga vera*, *Ulmus* sp. y *Quercus* sp. (cf. Ellis y Martínez-Bello, 2010). En el sitio tres hay 50 especies de orquídeas, de 28 géneros distintos.

Registro de datos

En los tres sitios de estudio se determinaron el periodo de floración, la polinización y el periodo de fructificación de las especies y su duración, entre enero 2019 y abril de 2022 (39 meses). La duración de la floración se estableció con la apertura de la primera flor, hasta la marchitez de la última. La duración del periodo de fructificación, en las orquídeas polinizadas de manera natural, éste se consideró a partir de la marchitez de la primera flor polinizada y hasta que se cosechó el fruto y, para las especies polinizadas artificialmente, se realizó la polinización manual durante el periodo de floración, con el criterio de haber registrado dos periodos previos de floración sin fructificación. Por último, se recolectaron los frutos en estado maduro, color verde-amarillo y los restos de la flor se podían eliminar con facilidad y antes de la dehiscencia, desarrollados en todos los casos. Después de su recolección, se realizó el análisis morfométrico en laboratorio. De cada fruto se midió peso, con una balanza (ADAM Core® CQT 202, California, EUA), longitud y ancho de su región media con un vernier digital (Stainless hardened, Shanghai, China). Adicionalmente, se registraron otros rasgos como la presencia de protuberancias o verrugas espiniformes. Finalmente, cada fruto fue fotografiado, con lo que se creó un registro ilustrado de las especies identificadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Floración

En los tres sitios de estudio se encontraron 42 especies de orquídeas en floración. El registro del periodo de floración de las distintas especies de orquídeas indica que 24 de ellas, es decir, la mayoría floreció de enero a abril, 12 especies comenzaron a florecer en mayo y terminaron en agosto y seis especies florecieron de septiembre a diciembre (Cuadro 1). La mayoría de las especies (39) tienen un ciclo de floración anual con un periodo de floración entre uno y tres meses; en cambio, muy pocas especies florecieron

Cuadro 1. Modalidades de polinización estudiadas, periodos de floración y fructificación de las especies de orquídeas en tres sitios: áreas verdes del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba (1), área de Colección privada de Fortín de las Flores (2); y bosque mesófilo de Tlaltetela (3), Veracruz, México.

| Especie | Sitio | Polinización [†] | Floración | Fructificación (Mes) | Cosecha de fruto |
|--|---------|---------------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| <i>Acianthera circumplexa</i> (Lindl.) Pridgeon y M.W. Chase | 2 | Natural | Febrero-Marzo | Marzo (1) | Marzo |
| <i>Campylocentrum micranthum</i> (Lindl.) Rolfe | 2 | Natural | Julio-Diciembre | Enero-Febrero (3) | Febrero |
| <i>Catasetum integerrimum</i> Hook. | 1, 2, 3 | Natural | Mayo-Septiembre | Junio-Abril (11) | Abril |
| <i>Comparettia falcata</i> Poepp. Y Endl. | 2, 3 | Natural | Julio | Agosto-Enero (6) | Enero |
| <i>Dichaea neglecta</i> Schltr. | 3 | Natural | Julio | Agosto-Enero (6) | Enero |
| <i>Encyclia hanburyi</i> (Lindl.) Schltr. | 2 | Asistida | Febrero-Marzo | Marzo-Junio (4) | Junio |

Cuadro 1. Continúa

| Especie | Sitio | Polinización [†] | Floración | Fructificación (Mes) | Cosecha de fruto |
|---|---------|---------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| <i>Encyclia parviflora</i> (Regel) Withner | 1, 3 | Asistida | Abril-Junio | Mayo-Octubre (6) | Octubre |
| <i>Epidendrum melistagum</i> Hágsater. | 3 | Natural | Julio-Septiembre | Agosto-Marzo (8) | Marzo |
| <i>Epidendrum parkinsonianum</i> | 2, 3 | Asistida | Marzo-Mayo | Mayo-Abril (12) | Abril |
| <i>Epidendrum radicans</i> Pav. ex Lindl. | 1, 2, 3 | Asistida | Enero-Abril | Febrero-Abril (3) | Abril |
| <i>Guarianthe aurantiaca</i> (Bateman ex Lindl.) Dressler y W.E. Higgins. | 2, 3 | Asistida | Agosto | Agosto-Mayo (10) | Mayo |
| <i>Gongora galeata</i> (Lindl.) Rchb.f. | 2, 3 | Natural | Noviembre-Enero | Enero-Marzo (3) | Marzo |
| <i>Ionopsis utricularioides</i> (Sw.) Lindl. | 2 | Natural | Enero | Enero-Marzo (3) | Marzo |
| <i>Laelia albida</i> Bateman ex Lindl. | 2 | Asistida | Octubre-Noviembre | Noviembre-Marzo (5) | Marzo |
| <i>Laelia anceps</i> Lindl. | 1, 2, 3 | Asistida | Octubre-Diciembre | Diciembre-Abril (5) | Abril |
| <i>Leochilus oncidioides</i> Knowles y Westc. | 2 | Natural | Noviembre-Mayo | Enero-Junio (6) | Junio |
| <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lindl. | 1, 2, 3 | Natural | Abril-Mayo | Mayo-Enero (10) | Enero-Febrero |
| <i>Masdevallia floribunda</i> Lindl. | 2 | Natural | Octubre-Enero | Enero-Febrero (2) | Enero-Febrero |
| <i>Maxillaria densa</i> Lindl. | 1, 3 | Natural | Enero-Febrero | Febrero-Abril (3) | Marzo-Abril |
| <i>Maxillaria elatior</i> (Rchb. f.) Rchb. f. | 2, 3 | Asistida | Octubre-Noviembre | Octubre-Septiembre (12) | Septiembre |
| <i>Myrmecophila grandiflora</i> (Lindl.) Carnevali, Tapia-Muñoz y I. Ramírez. | 1, 3 | Asistida | Abril-Mayo | Mayo (1) | Mayo |
| <i>Nidema bothii</i> (Lindl.) Schltr. | 2 | Asistida | Febrero-Marzo | Marzo-Julio (5) | Julio |
| <i>Notylia barkeri</i> Lindl. | 1 | Natural | Marzo-Abril | Marzo-Mayo (3) | Mayo-Junio |
| <i>Oestlundia luteorosea</i> (A. Rich. y Galeotti) W.E. Higgins | 2 | Natural | Abril-Mayo | Abril-Junio (3) | Junio-Julio |
| <i>Oncidium graminifolium</i> (Lindl.) Lindl. | 2 | Natural | Junio | Junio-Julio (13) | Julio |
| <i>Oncidium maculatum</i> (Lindl.) Lindl. | 2, 3 | Asistida | Enero-Abril | Abril-Enero (10) | Enero |
| <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl. | 1, 2, 3 | Natural | Abril-Mayo | Mayo-Abril (11) | Marzo |
| <i>Ornithocephalus inflexus</i> Lindl. | 3 | Natural | Junio | Junio-Julio (2) | Julio-Agosto |
| <i>Platystele stenostachya</i> (Rchb. f.) Garay. | 1, 3 | Natural | Enero-Octubre | Febrero-Noviembre (1) | Febrero-Noviembre |
| <i>Prosthechea cochleata</i> (L.) W.E. Higgins | 2, 3 | Asistida | Junio-Septiembre | Julio-Febrero (8) | Febrero-Mayo |
| <i>Prosthechea karwinskii</i> (Mart.) Soto Arenas y Salazar | 2 | Asistida | Abril | Abril-Julio (4) | Julio |
| <i>Prosthechea ochracea</i> (Lindl.) W.E. Higgins | 1, 3 | Natural | Mayo-Julio | Julio-Septiembre (3) | Septiembre |
| <i>Restrepiella ophiocephala</i> (Lindl.) Garay y Dunst. | 2 | Natural | Enero-Marzo | Marzo-Abril (2) | Abril |

Cuadro 1. Continúa

| Especie | Sitio | Polinización [†] | Floración | Fructificación (Mes) | Cosecha de fruto |
|---|-------|---------------------------|------------------|----------------------|------------------|
| <i>Rhyncholelia glauca</i> (Lindl.) Schltr. | 1, 3 | Asistida | Enero-Febrero | Febrero-Mayo (4) | Mayo-Junio |
| <i>Rhyncholelia maculata</i> (Lex.) Soto Arenas y Salazar. | 2 | Asistida | Enero-Febrero | Febrero-Junio (5) | Junio |
| <i>Sobralia macratha</i> Lindl. | 2, 3 | Natural | Mayo | Mayo-Enero (8) | Enero |
| <i>Specklinia digitale</i> (Luer) Pridgeon y M.W. Chase | 1, 3 | Natural | Enero-Noviembre | Enero-Noviembre (<1) | Enero-Noviembre |
| <i>Specklinia tribuloides</i> (Sw.) Pridgeon y M.W. Chase | 1 | Natural | Febrero-October | Febrero-October (<1) | Febrero-October |
| <i>Stanhopea oculata</i> [Lodd.] Lindley 1832 | 3 | Natural | Julio-Septiembre | October-Marzo (6) | Marzo |
| <i>Stelis purpurascens</i> A. Rich. y Galeotti. | 3 | Natural | Enero-Febrero | Febrero-Abril (2) | Marzo-Abril |
| <i>Trichocentrum stramineum</i> (Bateman ex Lindl.) M.W. Chase y N.H. Williams. | 1, 3 | Natural | Enero-Febrero | Febrero-Mayo (14) | Mayo |
| <i>Trichosalpinx ciliaris</i> (Lindl.) Luer. | 1 | Natural | Febrero-Junio | Febrero-Junio (5) | Junio-October |

[†]La polinización asistida se realizó después de dos periodos consecutivos sin fructificación.

hasta por 11 meses, como *Platystele stenostachya*, *Specklinia digitale* y *S. tribuloides*. Cetzal-Ix *et al.* (2014) reportan la floración de *P. stenostachya* en octubre en el bosque tropical lluvioso, ya que posiblemente las temperaturas altas limitan el periodo de floración. Sin embargo, *Campylocentrum micranthum*, *Epidendrum melistagum*, *Gongora galeata*, *Lycaste aromatica*, *Masdevallia floribunda*, *Nidema bothii*, *Notylia barkeri*, *Platystele stenostachya*, *Prosthechea cochleata*, *P. ochracea*, *Sobralia macratha* y *Stanhopea oculata* que también las reporta Cetzal-Ix *et al.* (2014) tuvieron periodos de floración similares, por ser especies de orquídeas que se desarrollan en bosque mesófilo y bosque tropical.

De todas las especies estudiadas destacan *Specklinia digitale* (Figura 2O), que se encuentra clasificada en la categoría de Amenazada (A) (SEMARNAT, 2010/2019), así como *Laelia albida* (Figura 3I), una orquídea de gran belleza con gran potencial ornamental.

Modalidades de polinización

Respecto a la polinización, se encontró que, de las 42 diferentes especies que formaron fruto, 27 (64 %) resultaron con polinización natural y 15 (36 %) con polinización manual (Cuadro 1). Esta proporción es un indicio de que hay condiciones ambientales compatibles con la presencia de los polinizadores naturales. Se ha documentado que las abejas de la tribu Euglossini (Williams *et al.*, 1981; Damon and Roblero, 2007) y del género *Euglossa* polinizan las orquídeas *Catasetum integerrimum*, *Notylia barkeri*, *Oestlundia luteorosea* y *Lycaste aromatica*, estas últimas se han registrado como polini-

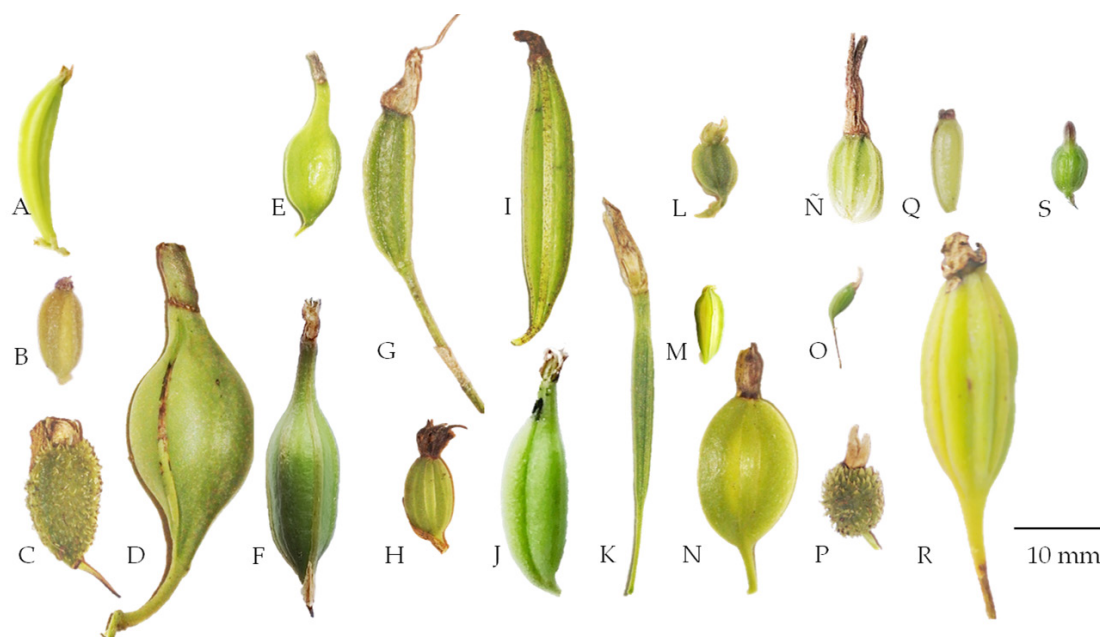


Figura 2. Frutos obtenidos de orquídeas en tres sitios⁴ del centro del estado de Veracruz, México, producto de polinización natural (Pn) o asistida (Pa). A: *Acianthera circumplexa* (Pn). B: *Campylocentrum micranthum* (Pn). C: *Dichaea neglecta* (Pn). D: *Epidendrum melistagum* (Pn). E: *Ionopsis utricularioides* (Pn). F: *Leochilus oncidioides* (Pn). G: *Masdevallia floribunda* (Pn). H: *Maxillaria densa* (Pn). I: *Nidema bothii* (Pn). J: *Notylia barkeri* (Pn). K: *Oestlundia luteorosea* (Pn). L: *Ornithocephalus inflexus* (Pn). M: *Platystele stenostachya* (Pn). N: *Prosthechea ochracea* (Pn). Ñ: *Restrepiella ophiocephala* (Pn). O: *Specklinia digitale* (Pn). P: *Specklinia tribuloides* (Pn). Q: *Stelis purpurascens* (Pn). R: *Trichocentrum stramineum* (Pn). S: *Trichosalpinx ciliaris* (Pn). ⁴Sitios: (1) Jardines en Amatlán de Reyes; (2) Área suburbana en Fortín de las Flores; y (3) Vegetación secundaria arbórea de Bosque mesófilo en Tlaltetela.

zadores de hasta más de 600 especies de orquídeas (Santos-Murgas y Añino-Ramos, 2016). Sin embargo, la polinización natural en el ambiente antrópico analizado sugiere que, para esos organismos, hay fuentes de alimento disponible *in situ* y/o en forma relativamente cercana, permitiendo así la polinización natural de 27 de las especies estudiadas.

Fructificación

Si bien, la fructificación producto de una polinización natural es un indicador positivo de que ese individuo de orquídea tiene las condiciones suficientes para su reproducción natural, no es garantía de que ese individuo sea capaz de recuperar sus poblaciones. Por ello, los frutos de orquídeas son recursos valiosos para realizar programas de reproducción masiva mediante técnicas de cultivo *in vitro* o con asistencia simbiótica. Dado que el periodo de maduración para la recolecta es relativamente corto, es muy importante determinar su periodo de fructificación, pues podría facilitar la creación de bancos de germoplasma de las orquídeas que requieren acciones prioritarias de conservación (Cetzal-Ix *et al.*, 2014).



Figura 3. Frutos de orquídeas en tres sitios[†] del centro del estado de Veracruz, México, producto de polinización natural (Pn) o asistida (Pa). A: *Catasetum integerrimum* (Pn). B: *Comparettia falcata* (Pn). C: *Encyclia hanburyi* (Pa). D: *Encyclia parviflora* (Pa). E: *Epidendrum melistagum* (Pn). F: *Epidendrum parkinsonianum* (Pa). G: *Gongora galeata* (Pn). H: *Guarlanthe aurantiaca* (Pa). I: *Laelia albida* (Pa). J: *Laelia anceps* (Pa). K: *Lycaste Aromatica* (Pn). L: *Maxillaria elatior* (Pa). M: *Myrmecophila grandiflora* (Pa). N: *Oncidium graminifolium* (Pn). Ñ: *Oncidium maculatum* (Pa). O: *Oncidium sphacelatum* (Pn). P: *Prosthechea cochleata* (Pa). Q: *Prosthechea karwinskii* (Pa). R: *Rhynchoaelia glauca* (Pa). S: *Rhynchostele maculata* (Pa). T: *Sobralia macrantha* (Pn). U: *Stanhopea oculata* (Pn). [†]Sitios: (1) Jardines en Amatlán de Reyes; (2) Área suburbana en Fortín de las Flores; y (3) Vegetación secundaria arbórea de Bosque mesófilo en Tlaltetela.

Los frutos recolectados fueron de 42 especies de orquídeas, agrupadas en nueve subtribus y 32 géneros. De los 42 frutos en total, 27 frutos (de igual número de especies, clasificadas en 25 géneros) fueron producto de polinización natural y 15 frutos (15 especies, 11 géneros) fueron originados por polinización asistida (Cuadro 1; Figuras 2 y 3). Por ello es factible sugerir que el grupo más numeroso habita en ambientes aún compatibles con el proceso de polinización natural para su reproducción. Las subtribus con mayor número de especies de los frutos recolectados fueron: Laeliinae (15), seguido de Oncidiinae (10) y Pleurothallidinae (8). Los géneros con mayor número de especies fueron: *Epidendrum*, *Prosthechea* y *Oncidium* con tres cada uno y el resto solo con dos o una especie (Cuadro 2, Figuras 2 y 3). Las observaciones de este estudio mostraron que la fructificación se concentra en el periodo de mayor estiaje, de enero a junio y que la mayoría de los periodos de fructificación de orquídeas coinciden en marzo. Tres especies requieren menos de 28 días para su maduración, dato que aporta a los periodos reportados por Rasmussen y Johansen (2006), de 45 días a 20 meses para especies de orquídeas cultivadas.

Morfometría de los frutos

La morfometría de los frutos es su caracterización cuantitativa, en este caso, la medición del peso, sus dimensiones y la forma de los frutos que fueron cosechados para

Cuadro 2. Especies de orquídeas, número y morfometría de los frutos obtenidos en tres sitios: áreas verdes del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba (1); área de Colección privada de Fortín de las Flores (2); y bosque mesófilo de Tlaltetela (3), Veracruz, México.

| Subtribu [†] | Especie | Número de frutos | Peso (g) / Largo (cm) x Ancho (cm) | Forma |
|-----------------------|--|------------------|------------------------------------|----------------------|
| Angraecinae | <i>Campylocentrum micranthum</i> (Lindl.) Rolfe. | 10 | 0.10 / 0.85 x 0.4 | Oblonga |
| Catasetiinae | <i>Catasetum integerrimum</i> Hook. | 6 | 70.20 / 12 x 5.2 | Oblonga acostillada |
| | <i>Encyclia hanburyi</i> (Lindl.) Schltr. | 3 | 1.78 / 5.5 x 1.5 | Elíptica acostillada |
| | <i>Encyclia parviflora</i> (Regel) Withner. | 3 | 1.91 / 6.2 x 1.1 | Obovada acostillada |
| | <i>Epidendrum melistagum</i> Hágsater. | 1 | 3.37 / 4.5 x 1.2 | Elíptica acostillada |
| | <i>Epidendrum parkinsonianum</i> Hook. | 2 | 4.05 / 12.5 x 2.3 | Oblonga acostillada |
| | <i>Epidendrum radicans</i> Pav. ex Lindl. | 6 | 1.24 / 4.6 x 1.8 | Elíptica |
| | <i>Guarianthe aurantiaca</i> (Bateman ex Lindl.) Dressler y W.E. Higgins. | 3 | 1.70 / 3.2 x 1.3 | Elíptica |
| | <i>Laelia albida</i> Bateman ex Lindl. | 4 | 0.55 / 2.1 x 1 | Globosa acostillada |
| | <i>Laelia anceps</i> Lindl. | 10 | 4.38 / 5.4 x 1.8 | Oblonga acostillada |
| Laeliinae | <i>Myrmecophila grandiflora</i> (Lindl.) Carnevali, Tapia-Muñoz y I. Ramírez | 4 | 9.49 / 8.2 x 2.3 | Obovada |
| | <i>Nidema bothii</i> (Lindl.) Schltr. | 1 | 0.48 / 3.2 x 0.4 | Oblonga acostillada |
| | <i>Oestlundia luteorosea</i> (A. Rich. y Galeotti) W.E. Higgins | 1 | 0.24 / 2.1 x 0.2 | Alargada acostillada |
| | <i>Prosthechea cochleata</i> (L.) W.E. Higgins | 2 | 2.78 / 4.1 x 1.8 | Obovada acostillada |
| | <i>Prosthechea karwinskii</i> (Mart.) Soto Arenas y Salazar | 1 | 3.56 / 10.4 x 1.2 | Alargada |
| | <i>Prosthechea ochracea</i> (Lindl.) W.E. Higgins | 4 | 0.28 / 1.7 x 1 | Globosa |
| | <i>Rhyncholaelia glauca</i> (Lindl.) Schltr. | 4 | 12.25 / 12.3x2.3 | Elíptica |
| Maxillariinae | <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lindl. | 4 | 12.08 / 5.5 x 2.2 | Globosa acostillada |
| | <i>Maxillaria densa</i> Lindl. | 40 | 0.10 / 0.85 x 0.4 | Globosa |
| | <i>Maxillaria elatior</i> (Rchb. f.) Rchb. f. | 2 | 1.68 / 3.8 x 1.1 | Oblonga acostillada |
| | <i>Comparettia falcata</i> Poepp. y Endl. | 2 | 1.87 / 5.75 x 1.2 | Ovada acostillada |
| | <i>Ionopsis utricularioides</i> (Sw.) Lindl. | 1 | 0.22 / 1.8 x 0.5 | Ovada |
| | <i>Leochilus oncidiioides</i> Knowles y Westc. | 3 | 0.95 / 2.2 x 0.7 | Oblonga |
| | <i>Notylia Barkeri</i> Lindl. | 2 | 0.48 / 1.6 x 0.5 | Ovada acostillada |
| | <i>Oncidium graminifolium</i> (Lindl.) Lindl. | 3 | 0.71 / 4 x 0.7 | Oblonga acostillada |
| Oncidiinae | <i>Oncidium maculatum</i> (Lindl.) Lindl. | 3 | 3.20 / 6.5 x 1.8 | Oblonga curvada |
| | <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl. | 15 | 5.82 / 5.2 x 1.6 | Oblonga |
| | <i>Ornithocephalus inflexus</i> Lindl. | 1 | 0.003 / 1 x 0.3 | Globosa acostillada |
| | <i>Rhynchostele maculata</i> (Lex.) Soto Arenas y Salazar. | 2 | 6.68 / 6.9 x 1.6 | Ovada |
| | <i>Trichocentrum stramineum</i> (Bateman ex Lindl.) M.W. Chase y N.H. Williams | 3 | 0.12 / 2.3 x 0.9 | Ovada acostillada |
| Sobraliinae | <i>Sobralia macratha</i> Lindl. | 2 | 10.62 / 8.0 x 2.0 | Oblonga acostillada |
| Stanhopeinae | <i>Gongora galeata</i> (Lindl.) Rchb.f. | 2 | 4.25 / 7.0 x 1.0 | Oblonga curvada |

Cuadro 2. Continúa

| Subtribu [†] | Especie | Número de frutos | Peso (g) / Largo (cm) x Ancho (cm) | Forma |
|-----------------------|---|------------------|------------------------------------|---------------------|
| Pleurothallidinae | <i>Stanhopea oculata</i> [Lodd.] Lindley 1832 | 1 | 15.00 / 11 x 2.0 | Oblonga acostillada |
| | <i>Acianthera circumplexa</i> (Lindl.) Pridgeon y M.W. Chase | 1 | 0.34 / 1.6 x 0.3 | Oblonga curvada |
| | <i>Masdevallia floribunda</i> Lindl. | 1 | 0.24 / 1.5 x 0.5 | Oblonga |
| | <i>Platystele stenostachya</i> (Rchb. f.) Garay. | 2 | 0.005 / 0.5 x 0.2 | Obovada |
| | <i>Specklinia digitale</i> (Luer) Pridgeon y M.W. Chase | 2 | 0.017 / 0.3 x 0.1 | Oblonga |
| | <i>Specklinia tribuloides</i> (Sw.) Pridgeon y M.W. Chase ^{††} | 1 | 0.11 / 1 x 0.5 | Globoso espinosa |
| | <i>Stelis purpurascens</i> A. Rich. y Galeotti. | 1 | 0.14 / 0.9 x 0.3 | Oblonga |
| | <i>Restrepiella ophiocephala</i> (Lindl.) Garay y Dunst. | 2 | 0.11 / 1 x 0.5 | Oblonga acostillada |
| | <i>Trichosalpinx ciliaris</i> (Lindl.) Luer. | 2 | 0.009 / 0.6 x 0.3 | Globosa |
| Zygopetalinae | <i>Dichaea neglecta</i> Schltr. ^{††} | 1 | 0.10 / 1.2 x 0.8 | Globosa espinosa |

[†]Angulo y Balam (2021)

^{††}Fruto con presencia de protuberancias o verrugas espiniformes.

este estudio (Cuadro 2). En general, los frutos de orquídeas son ligeros; sin embargo, hay contrastes. Por ejemplo, respecto al peso, el fruto más pesado registrado fue de la especie *Catasetum integerrimum* (70.2 g, Figura 3A), seguido del fruto de *Stanhopea oculata* (15.0 g, Figura 3U). En cambio, el fruto más liviano fue el de la especie *Platystele stenostachya* (5 mg, Figura 2M), seguido por el fruto de *Trichosalpinx ciliaris* (9 mg, Figura 2S).

Respecto al tamaño de los frutos, también hay contrastes. Por ejemplo, el fruto de mayor tamaño registrado fue de la especie *Epidendrum parkinsonianum* (12.5 cm, Figura 3F), seguido del fruto de *Rhyncholaelia glauca* (12.35 cm, Figura 3R), la cápsula de *Catasetum integerrimum* de 12 x 5.2 cm (Figura 3A) y el fruto de *Stanhopea oculata* de 11 x 2 cm (Figura 3), que coincide con el tamaño reportado por Cetzal-Ix *et al.* (2014). También hay frutos de orquídeas muy diminutos, como los de la especie *Specklinia digitale*, de tan sólo 0.3 x 0.1 cm (Figura 2O) o los de *Platystele stenostachya* de 0.5 x 0.2 cm (Figura 2M), que coinciden con lo reportado por Cetzal-Ix *et al.* (2014). En cambio, los frutos más anchos fueron de las especies *Catasetum integerrimum* (4.2 cm, Figura 3A) y *Lycaste aromatica* (3.2 cm, Figura 3K) y los frutos más angostos fueron de las especies *Specklinia digitale* (0.1 cm, Figura 2O) y *Platystele stenostachya* (0.2 cm, Figura 2M) (Cuadro 2). Respecto a las formas de los frutos, estas pueden variar (Figuras 2 y 3) y sólo dos de ellos presentaron protuberancias o verrugas espiniformes (Figuras 2C y 2P). Las observaciones de este estudio confirman las conclusiones de Cetzal-Ix *et al.* (2014), sobre la necesidad de realizar más investigación respecto a los frutos de orquídeas. Aunque los resultados de este trabajo apoyan la idea de que la morfometría de los

frutos y sus imágenes podrían ayudar a la identificación de las orquídeas mostradas, tal como lo sugirieron Reyes-López *et al.* (2014) y Rojas-García y Maldonado-Peralta (2021), cuando no se encuentren en época de floración, es necesario ampliar el estudio de botánica sistemática de las especies de orquídeas que incluya la descripción detallada de los frutos.

CONCLUSIONES

En este estudio exploratorio fue posible identificar frutos de 42 especies diferentes de orquídeas (32 géneros), en la zona centro del estado de Veracruz, México. La mayor diversidad y cantidad de especies y de frutos se asocia a la polinización natural (27 especies, 113 frutos), que supera las polinizadas manualmente (15 especies 51 frutos). Es posible sugerir que, aunque están en ambientes perturbados aún hay presencia de sus polinizadores. También fue posible observar que hay más frutos en la época de mayor estiaje, alrededor del inicio de la primavera. Las orquídeas *Platystele stenostachya*, *Specklinia digitale* y *S. tribuloides* presentaron disponibilidad de frutos casi todo el año, que puede ser utilizados para su reproducción simbiótica o asimbiótica. La morfometría registrada y el registro fotográfico del material estudiado evidenció una variedad, entre pesos y tamaños diminutos (*Specklinia digitale*, 17 mg, 0.3 x 0.1 cm) a grandes (*Catasetum integerrimum*, 70.2 g, 12 x 5.2 cm). La información generada en este estudio de frutos de orquídeas es importante como una herramienta de identificación cuando no hay presencia de flores. Además, ésta puede ser de utilizada en futuros estudios sobre germinación *in vitro* de orquídeas silvestres.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para los estudios de maestría en el Colegio de Postgraduados de uno de los autores.

REFERENCIAS

- Angulo DF, Balam NR. 2021. Clasificación de las Orquídeas: una breve reseña filogenética. *In* Las Orquídeas de Veracruz. Viccon Esquivel J, Castañeda Zárate M, Castro Cortés R, Cetzal-Ix W. (eds.); Universidad Veracruzana: Xalapa, Veracruz, México, pp: 77–88.
- Arditti J, Ghani AKA. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145 (3): 367–421. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>
- Baltazar-Bernal O, De la Cruz-Martínez VM, Zavala-Ruiz J. 2020. Las orquídeas del Campus Córdoba, su estudio y preservación. Texcoco, México: Colegio de Postgraduados.
- Castañeda-Zárate M, Viccon-Esquivel J, Ramos-Castro SE, Solano-Gómez R. 2012. New records of Orchidaceae for Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83 (1): 281–284.
- Castillo-Pérez LJ, Martínez-Soto D, Maldonado-Miranda JJ, Alonso-Castro, AJ, Carranza-Álvarez C. 2018. The endemic orchids of Mexico: A review. *Biologia* 74 (1): 1–13. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, Van den Berg C, Schuijteman A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177 (2): 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- Cetzal-Ix W, Alvarez-Mora R, Basu SK, Cosme-Pérez J, Noguera-Savelli E. 2014. Orchid fruit diversity at Puebla Mexico: A new insight into the biodiversity of a fragmented ecosystem

- with need for conservation and potential for horticultural exploitations in future. *In: Sustainable Horticultural Systems: Issues, technology and innovation Vol 2*. Nandwani D. (ed.); Springer: Switzerland. pp. 207–220. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06904-3>
- Damon A, Roblero PS. 2007. A survey of pollination in remnant orchid populations in Soconusco Chiapas, Mexico. *Tropical Ecology* 48 (1): 1–14.
- Dirks-Mulder A, Ahmed I, uit het Broek M, Krol L, Menger N, Snier J, van Winzum A, de Wolf A, van't Wout M, Zeegers JJ, Butôt R, Heijungs R, van Heuven BJ, Kruizinga J, Langelaan R, Smets EF, Star W, Bemer M, Gravendeel B. 2019. Morphological and Molecular Characterization of Orchid Fruit Development. *Frontiers in Plant Science* 10: 137. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00137>
- Dressler RL. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26 (1-2): 155–158.
- Ellis EA, Martínez-Bello M. 2010. Vegetación y uso de suelo. *In Atlas del Patrimonio Natural, Histórico y Cultural de Veracruz: I Patrimonio natural*. Benítez G, Welsh-Rodríguez C. (eds.); Universidad Veracruzana: Xalapa, Veracruz, México, pp: 203–226.
- Espejo-Serna A, López-Ferrari AR, Jiménez Machorro R, Sánchez Saldaña L. 2005. Las orquídeas de los cafetales en México: una opción para el uso sostenible de ecosistemas tropicales. *Revista de Biología Tropical* 53 (1-2): 73–84.
- Espejo-Serna A. 2012. El endemismo en las Liliopsida mexicanas. *Acta Botánica Mexicana* 100: 195–257. <https://doi.org/10.21829/abm100.2012.36>
- García-Cruz J, Sánchez LM, Jiménez R, Solano R. 2003. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Orchidaceae, tribu Epidendreae. *Herbario AMO, Fascículo*, 119.
- García-Franco JG, Toledo-Aceves MT. 2017. Diversidad de orquídeas (Orchidaceae) en agroecosistemas cafetaleros. *Agroproductividad* 10 (6): 19–24.
- Gómez-Pompa A, Krömer T, Castro-Cortés R. 2010. Atlas de la Flora de Veracruz: Un patrimonio natural en peligro. Primera edición. Gobierno del Estado de Veracruz y Universidad Veracruzana. Xalapa, México.
- Hágsater E, Soto-Arenas MÁ, Salazar GA, Jiménez-Machorro R, López-Rosas MA, Dressler RL. 2015. Las orquídeas de México. Ciudad de México: Instituto Chinoín.
- Hernández-Alcázar JA, Farrera-Sarmiento O, Beutelspacher CR. 2017. Orquídeas en huertos familiares de Pantelhó, Chiapas, México. *Lacandonia* 11 (1): 11–18.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2006. Conjunto de datos vectoriales escala 1:1 000 000, Precipitación media anual, Estados Unidos Mexicanos [shapefile]. 1:1,000,000. Aguascalientes, México. Recuperado el 7 de mayo, 2022 de: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825267544>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2007. Conjunto de datos vectoriales escala 1:1 000 000. Temperatura media anual, Estados Unidos Mexicanos [shapefile]. 1:1,000,000. Aguascalientes, México. Recuperado el 7 de mayo, 2022 de: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825267551>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2008. Conjunto de datos vectoriales escala 1:1 000 000, Unidades climáticas, Estados Unidos Mexicanos [shapefile]. 1:1,000,000. Aguascalientes, México. Recuperado el 7 de mayo, 2022 de: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825267568>
- Krömer T, Espejo-Serna A, López-Ferrari AR, Acebey AR, García-Cruz J, Mathieu G. 2020. Las angiospermas epífitas del estado de Veracruz, México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 91: 1–110. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3415>
- Krömer T, Viccon-Esquivel J, Gómez-Díaz JA. 2021. Efectos antrópicos sobre la diversidad de epífitas vasculares y orquídeas en el centro de Veracruz. *In Las Orquídeas de Veracruz*. Viccon Esquivel J, Castañeda Zárata M, Castro Cortés R, Cetzal Ix W. (eds.); Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México, pp: 235–252.
- Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Appezzato-da-Glória B. 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206 (6): 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.0>
- Rasmussen FN, Johansen B. 2006. Carpology of orchids. *Selbyana* 27 (1): 44–53.

- Reyes-López D, Flores-Jiménez Á, Huerta-Lara M, Kelso-Bucio HA, Avendaño-Arrazate CH, Lobato-Ortiz R, Aragón-García A, López-Olguín JF. 2014. Variación morfológica de fruto y semilla en cuatro especies del género *Vanilla*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 1 (3): 205–218.
- Rojas-García AR, Maldonado-Peralta MÁ. 2021. Cualidades morfológicas de frutos de tres especies de bromelia (Bromeliaceae). *Revista Fitotecnia Mexicana* 44 (4): 521–521.
- Santos-Murgas A, Añino-Ramos YJ. 2016. Contribución al conocimiento de la diversidad de abejas de las orquídeas (Apidae: Euglossini) de la Península de Azuero, Panamá. *Tecnociencia* 18: 45–58.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. México: Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre de 2010.
- Solano-Gómez R, Salazar GA, Huerta H, Hágsater E, Jiménez R. 2019. Diversity of Mexican Orchids: Synopsis of richness and distribution patterns. *In* Proceedings of the 22th World Orchid Conference. Pridgeon AM. (ed.); Asociación Ecuatoriana de Orquideología. Guayaquil, Ecuador. pp. 255–270.
- Solís-Montero L, Flores-Palacios A, Cruz-Angón A. 2005. Shade-coffee plantations as refuges for tropical wild orchids in central Veracruz, Mexico. *Conservation Biology* 19 (3): 908–916. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00482.x>
- Williams NH, Atwood JT, Dodson CH. 1981. Floral fragrance analysis in *Anguloa*, *Lycaste* and *Mendoncella* (Orchidaceae). *Selbyana* 5 (3-4): 291–295.

Agrociencia



HUMIC EXTRACT AS A BIOSTIMULANT IN CROPS SUBJECTED TO ABIOTIC STRESS

Reinier **Hernández-Campos**^{1*}, Celerino **Robles**², Sahylin **Muñiz-Becerá**³,
Sandra **Pérez-Álvarez**⁴, Octavio **Loera-Corral**⁵

¹ Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, Ciudad de México, México. C. P. 04510.

² Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca. Laboratorio de Suelos. Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. C. P. 71230.

³ Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), Grupo de Ingeniería de Procesos. Cto. Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México. C. P. 04510.

⁴ Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus Delicias. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Carretera Delicias-Rosales km 2.5, Delicias, Chihuahua, México. C. P. 33000.

⁵ Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc, Iztapalapa, Ciudad de México, México. C. P. 09340.

* Author for correspondence: reinierhc86@hotmail.com

ABSTRACT

Because abiotic stresses pose significant challenges to the growth and productivity of crops, the development of plants with greater survival and growth when exposed to unfavorable situations is an objective of several research groups. Biostimulants are substances or microorganisms that, when applied to crops through the foliar or root pathways, serve to enhance various processes related to growth and development. These processes include nutrient absorption, tolerance to environmental stress, and overall harvest quality. Interestingly, biostimulants can achieve these effects even when they possess a low concentration of nutrient elements in their composition. Among the main and most often used biostimulants are plant hormones, algae extract, mycorrhizal fungi, protein hydrolysates, and humic substances (humic and fulvic acids). This review sheds light on the biostimulant effects of applying humic substances to plants experiencing hydric stress conditions and low rainfed cultivation. Additionally, it aims to identify gaps in the current research and highlights areas that require further investigation. Furthermore, the review provides a concise overview of the origin and progression of research on humic substances (HS), including their extraction and obtaining process, as well as their structural characteristics and the relationship between structure, properties, and functions. The review also presents the research findings that support the potential of humic substances influencing crops affected by abiotic stress. These findings highlight the beneficial effects of humic substances in enhancing the resilience and performance of crops facing challenges such as drought, salinity, temperature extremes, and other non-biological stressors. The evidence underscores the significance of humic substances as a valuable tool in mitigating the detrimental impacts of abiotic stress on crop productivity and overall plant health.

Keywords: physiological effects, yield, eustress.

Citation: Hernández-Campos R, Robles C, Muñiz-Becerá S, Pérez-Álvarez S, Loera-Corral O. 2023. Humic extract as a biostimulant in crops subjected to abiotic stress. *Agrociencia* 57(5): 1008-1045. doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2942

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: January 08, 2023.

Approved: June 07, 2023.

Published in Agrociencia:
July 12, 2023.

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



INTRODUCTION

Plants possess a moderate level of mobility, which means that throughout their vegetative cycle, they encounter unfavorable conditions that hinder the optimal development of their vegetative functions (Zhang *et al.*, 2022). Among the main types of abiotic stress affecting crop development are drought, high salinity, cold, and heat, which can reduce biomass production and performance by 70 % (Liliane and Charles, 2020). These are especially significant in arid and semi-arid regions due to the impact of climate change, disrupting precipitation patterns and altering temperature values in various geographical areas across the globe. This has a severe impact on plants in these regions, exacerbating the difficulties they face in maintaining their vegetative functions (Malhi *et al.*, 2021).

Numerous studies have focused on horticulture and agronomy, to enhance productivity and increase the resistance of various crops to abiotic stresses. The research efforts are directed toward developing strategies and techniques that can improve crop performance under adverse environmental conditions. These studies contribute valuable insights into mitigating the effects of abiotic stresses and promoting sustainable agricultural practices (Drobek *et al.*, 2019).

Genetic enhancement is employed as part of a range of strategies aimed at boosting yield and improving crop productivity, particularly in challenging environments. This technique may include the incorporation of genes associated with tolerance, the expression of which modifies the main biochemical and physiological mechanisms involved in tolerance. Some of these genes are related to the transport of ions and water, the synthesis of osmoprotective substances such as glycine-betaine, mannitol, and proline, ion exclusion transporters, mechanisms for the detoxification of reactive oxygen species (ROS), production of chaperone molecules, in addition to the control of transcriptional regulation (Carvajal-Campos and Jiménez, 2021).

In addition to the above, modern agriculture increasingly uses biostimulants as an agronomic tool and an environmentally friendly alternative. Biostimulants are recognized for their ability to help crops cope with frequent drought periods and improve their yields under adverse conditions (Bulgari *et al.*, 2019).

The definition and concept of plant or agricultural biostimulants are continually evolving, mainly due to the wide range of materials that can be used to produce biostimulants (Rouphael and Colla, 2020). From an industrial point of view, these are referred to as compounds that contain both substances and microorganisms, whose function, once they have been applied to crops via foliar or root, is to stimulate processes related to nutrient absorption, tolerance to abiotic stress, and crop quality. Biostimulants, despite their beneficial effects on plants, do not possess direct pesticidal properties. Consequently, they are not categorized or regulated as pesticides. Their primary function is to enhance plant growth, development, and stress tolerance, rather than directly combatting pests (Van Oosten *et al.*, 2017). Plant hormones (Zakeel and Safeena, 2019), algae extracts (Hassan *et al.*, 2021), protein hydrolysates (Carillo *et al.*, 2019), and humic and fulvic acids (Bayat *et al.*, 2021) are the main and most used biostimulants in modern agriculture.

Humic substances (HS), from which humic (HA) and fulvic (AF) acids are derived, are recognized for their nutrient absorption and anti-stress effects (Van Oosten *et al.*, 2017). The effects of biostimulants on cultivated plants have indeed been more commonly reported on the root system rather than the aerial (above-ground) parts. This is because biostimulants often interact directly with the root system, influencing root growth, nutrient uptake, and overall root health. These effects can be divided into direct and indirect. Direct effects are understood to be those that do not depend on the characteristics of the complex soil or the availability of micro- and macro-elements, although they do involve the regulation of cell activity, variation in metabolism, as well as changes in gene expression and present hormonal action (du Jardin *et al.*, 2015). One of the indirect effects of biostimulants is the improvement of the granular structure of the soil, leading to enhanced air-water relationships within the soil. Biostimulants can positively influence soil structure by promoting the aggregation of soil particles, which results in the formation of stable soil aggregates. These aggregates create pore spaces within the soil, improving its aeration and water-holding capacity (Chen *et al.*, 2004).

The direct effects are mainly associated with the entry of HS, which are low molecular weight compounds, into the plant tissue (at the cellular level) through the epidermis (Kulikova *et al.*, 2016) or due to the existence of physical-chemical interactions (Asli and Neumann, 2010), causing marked stimulations in the different metabolic processes in different plants, as in maize (*Zea mays* L.) (Canellas *et al.*, 2002) and rice (*Oryza sativa* L.) (García *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2017).

This review aims to provide an overview of the biostimulant effects of HS on crops facing stress and rainfed cultivation conditions. It also highlights the existing gaps in research and identifies areas that require further investigation. Additionally, the review briefly discusses the origin and evolution of research related to HS, the processes involved in obtaining HS, and the relationship between its structure, properties, and functions. The research findings that support the potential of HS in positively influencing crops affected by abiotic stress are also shown.

HUMIC SUBSTANCES

Research related to the HS theme dates back more than 250 years, with the term humus being referenced for the first time in *Agriculturae Fundamenta Chemica*. Since then, the field of humic substances (HS) experienced a significant surge in research and interest, particularly in the context of agricultural sciences. As agricultural practices advanced, there was a realization that HS could serve as a valuable resource for improving crop production. This realization prompted a greater focus on studying the chemistry and properties of these molecules (Senn and Kingman, 1973).

As natural organic matter, HS is defined as a set of molecules widely distributed in nature, encompassing the entire terrestrial ecosystem, as well as rivers, lakes, and oceans (Yang and Antonietti, 2020). Piccolo (2002) defined them as supramolecular associations of relatively small, self-assembled, heterogeneous molecules held together predominantly by non-covalent forces.

HS are formed through the complex process of decomposition and resynthesis in the soil, primarily driven by the action of microbiota. They originate from the breakdown and transformation of plant and animal residues. Microbiota, including bacteria, fungi, and other microorganisms, play a vital role in the degradation and subsequent synthesis of organic matter, leading to the formation of HS (García *et al.*, 2019; Hernández *et al.*, 2021). The main sources for obtaining HS are soils, peat, coal, manure, compost, and vermicompost, as well as minerals such as leonardite, and others (Hernández *et al.*, 2021).

The wide range of sources available for obtaining HS contributes to the significant structural diversity found in HS molecules, which are the primary constituents of soil organic matter. The fundamental role of the structures and properties of HS has been documented, together with its relationship with physiological effects, both on the aerial part and the root part in plants, as well as its incidence on the main physicochemical properties of the soil (du Jardin *et al.*, 2015). Canellas *et al.* (2005) have proposed a model that is in correspondence with the structural characteristics present in HS.

The primary impacts observed from the application of HS (hormonal signaling) in plants predominantly manifest in the root system. These effects can be categorized into direct and indirect effects, as discussed in the introduction section. These effects significantly enhance various metabolic processes in plants, as demonstrated in previous studies conducted on corn (*Z. mays*) (Canellas *et al.*, 2002), rice (*O. sativa*) (Tavares *et al.*, 2017), and other species (Chen *et al.*, 2004).

STRUCTURE AND OBTAINING OF HUMIC SUBSTANCES

Multiple interpretations exist regarding the structure of humic substances (HS). One of the most widely accepted models was presented by Piccolo (2002). This model encompasses two key aspects: i) the supramolecular structure, and ii) an updated comprehension of the supramolecular arrangement of HS. These propositions have gained significant recognition within the scientific community and are frequently referenced in the literature about HS. According to this model, HS is described as supramolecular assemblies composed of diverse, relatively small organic molecules with varying characteristics (Canellas *et al.*, 2015). This indicates that the HS (Figure 1),

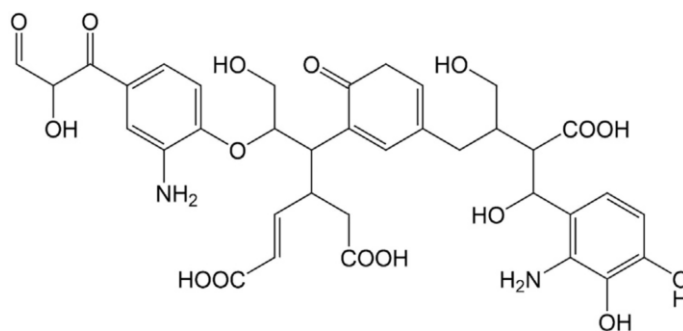


Figure 1. Structural model of a humic acid unit (molecular weight 731 g mol⁻¹).

when they are part of the soil complex, acquire a strong assemblage, as well as greater stability, caused by the interactions of weak forces (van der Waals, $\pi - \pi$, CH - π), being the links by hydrogen bonds, in addition to hydrophobic forces, the main causes of the large molecular size (Canellas *et al.*, 2015).

The introduction of the supramolecular concept in understanding the structure of HS (Figure 2) brought about a significant shift in the previously employed classifications. This novel approach revolutionized our comprehension of HS by providing insights into their interactions with soil minerals, as well as their capacity for the adsorption

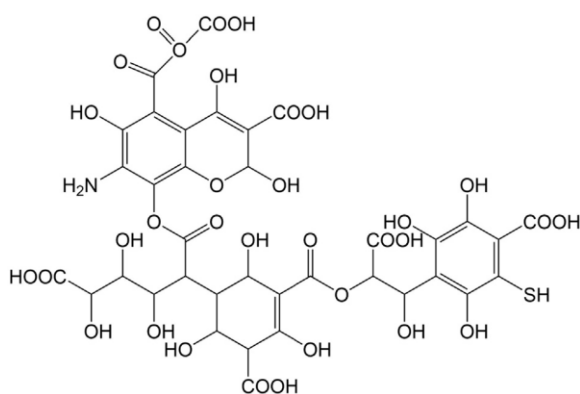


Figure 2. Structural model of a fulvic acid unit (molecular weight 1051 g mol⁻¹).

and complexation of ions. The adoption of the supramolecular perspective allowed for a more comprehensive understanding of HS and paved the way for advancements in studying their intricate behaviors and functionalities. It allowed a better practical interpretation of the humification process, understood as a fluid degradation process of organic waste from animals and plants, which, through the action of microorganisms, start to form substances with structural patterns that coincide with the HS (Piccolo, 2016; Hayes and Swift, 2018; García *et al.*, 2019).

After obtaining HS, the next step in the process involves purification, typically achieved through dialysis. Fractionation is the most widely used method to reduce the heterogeneity of substances, which is based on the separation of its components taking advantage of the properties related to its molecular structure. The most widely used fractionation technique of HS is based on the variation of its solubility at different pH values (Figure 3) (Nebbioso and Piccolo, 2012).

Depending on their solubility at different pH values, three main fractions that make up HS are recognized: humin (H), an insoluble fraction in an aqueous medium at any pH value; fulvic acids (FA) (Figure 2), a fraction soluble in an aqueous medium at any pH value; and humic acids (HA) (Figure 1), which are soluble in a basic medium and insoluble at pH close to 2 (Stevenson, 1994). In the light of more recent studies, both quantitative and qualitative information has been found regarding the main

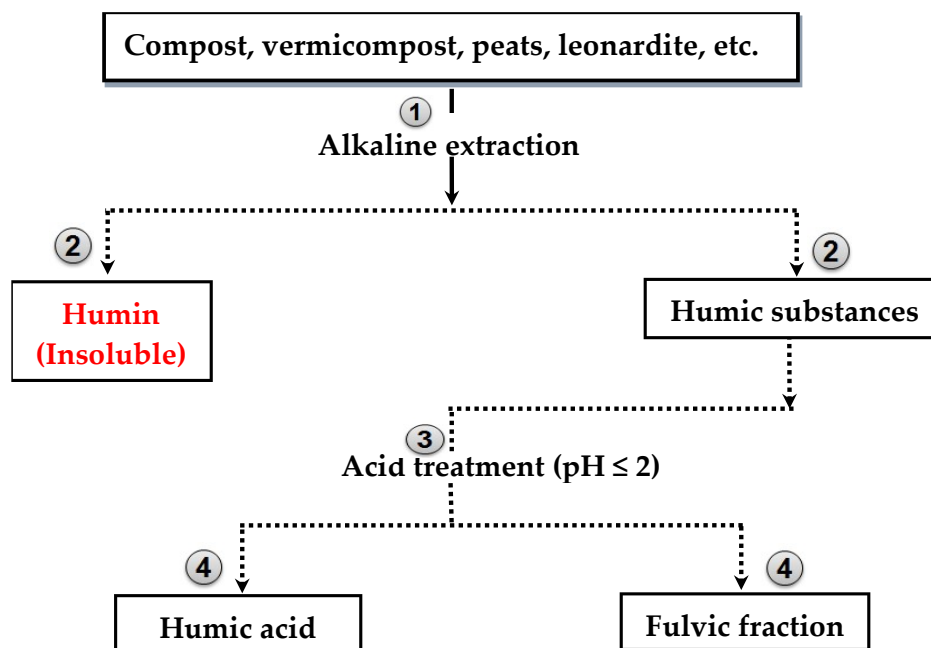


Figure 3. Diagram of the pH-based fractionation process of the humic substances (Stevenson, 1994).

functional groups found in the structure of HS (García *et al.*, 2019). In reports that include spectroscopic studies, HS generally presents aromatic structures (benzenes and polysubstituted phenols), as well as phenolic and alcohol-COOH, carboxylic acid-COOH, esters, quinones, among others (Schulten and Schnitzer, 1993).

An approximate representation of the HS structure (Figure 4) was proposed by Schulten and Schnitzer (1993), in which the main functional groups are observed, as well as the aliphatic and aromatic parts, in addition to the outer hydrophilic domain, which consists of polar groups (for example, carboxylic residues), and the interior hydrophobic domain, which is composed of macromolecules of plant origin. According to Muscolo *et al.* (2007), both domains HS and the variability of functional groups within them play crucial roles in determining the biological effects of these compounds on plants because of the solubility and biological reactivity that they generate when applied to plants. HS are formed irregularly depending on the hydrophobicity present in the components of the humic molecules, although they are also the result of their size, shape, and chemical interactions (Nebbioso and Piccolo, 2012).

Recent advances in technology and analytical techniques have significantly contributed to our understanding of the structures of HS. One area of particular interest is the determination of the maturity index of HS derived from various sources. This analysis is valuable as it enables the tracking of organic residue degradation and facilitates the description of biochemical changes that occur during processes such as vermicomposting. By assessing the maturity index, researchers can gauge the extent of

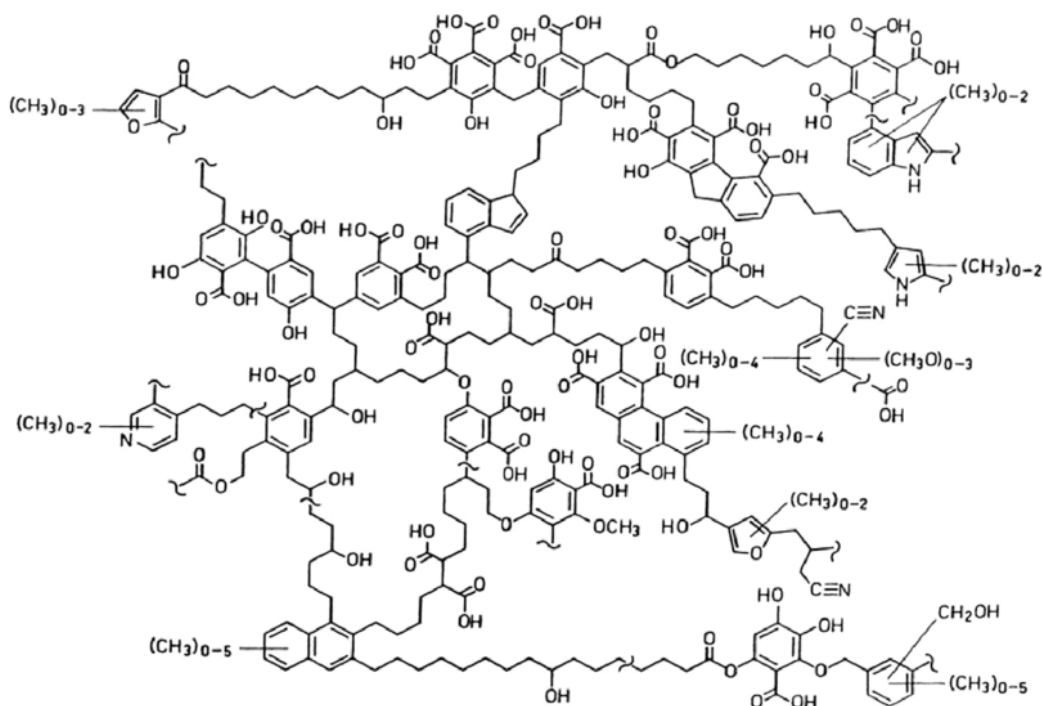


Figure 4. The approximate structure model of a humic acid molecule, developed from a tentative chemical network of humic substances ($C_{308}H_{328090}N_5$) proposed by Schulten and Schnitzer (1993).

mineralization and decomposition of the raw materials used. The information is crucial for evaluating the effectiveness and efficiency of composting processes, providing insights into the rate of organic matter breakdown and nutrient release. The ability to monitor and quantify these changes aids in optimizing composting practices and using organic residues more effectively in agricultural and environmental applications (Bhat *et al.*, 2017). These techniques are as follows: FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), UV/Vis (Ultraviolet-Visible Spectroscopy), Py-GC/MS (Gas-liquid Chromatography coupled with Pyrolysis and Mass Spectroscopy), ^{13}C CP/ MAS - NMR (Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance) (Canellas *et al.*, 2005).

The variability of the HS structure during the vermicomposting process has been reported and more than 250 compounds derived from different sources such as lignins, carbohydrates, proteins, alcohols, and fatty acids have been identified, the presence of which varies according to the progress of the stabilization of organic matter.

RELATIONSHIP BETWEEN STRUCTURE-PROPERTY AND FUNCTION OF HS

The relationship between the structure and properties of HS (Figure 5) is crucial for comprehending their functional characteristics (García *et al.*, 2016; Nardi *et al.*, 2017).

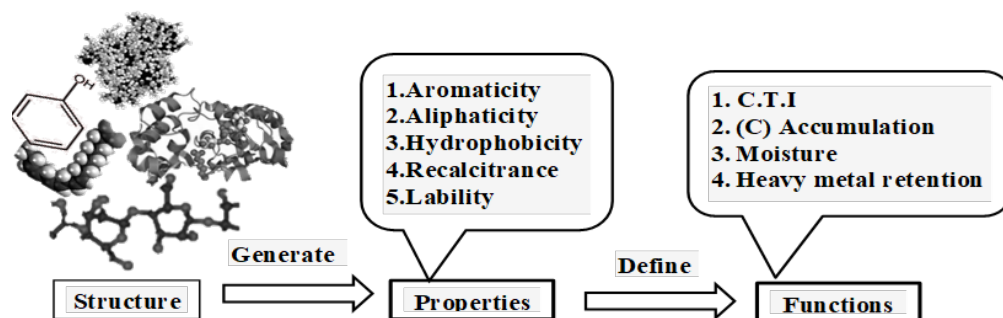


Figure 5. Proposal of the relationship between structure, property, and function of humic substances (García *et al.*, 2019).

Understanding how the structure of HS influences its properties provides valuable insights into how these molecules, derived from the humification process, exert their effects on plants. The properties of HS, such as solubility, chemical reactivity, and complexation capacity, directly impact their interactions with plant systems.

Explaining the relationship between the structure, properties, and effects of HS can be complex, particularly considering the varying effects and intensities observed when HS are applied either foliarly (on leaves) or radially (to the roots) in different plant species (Nardi *et al.*, 2017). Muscolo *et al.* (2007) found differences in the activity of carbon and nitrogen metabolism in *Pinus nigra* J.F.A plants when applying HS extracted from two different sources, one with an abundant presence of methyl (CH_3) and carboxyl (COOH) groups, and the other with abundant contents of betaine and organic acids, justifying said differences by the structural inequality. García *et al.* (2019) state that HS obtained from vermicompost material in an alkaline medium with an abundant presence of carboxyl groups (COOH) achieved significant increases in the development variable of lateral roots. Nardi *et al.* (2017) state that there is a direct relationship between some specific functional groups and their biological activity. Using volcanic soil as a source of origin, they separated the HS from the original sample into three fractions of different sizes, to be able to observe a relationship between its structure and its biological activity.

During the evaluation, it was observed that both the original sample of HS and its three derived fractions significantly stimulated enzymatic activities associated with the glycolytic pathway and respiratory processes in maize plants. Notably, fraction III, which had the smallest molecular size and a more flexible conformation, yielded the most favorable results. According to Nardi *et al.* (2017), this is because fraction III presents a more flexible conformation than the other fractions, thus allowing a better diffusion of the bioactive humic components when coming into contact with the maize cells. On the other hand, Canellas *et al.* (2010) described contrary results in *Z. mays* crops after carrying out different experiments in which they evaluated the bioactivity

of HA extracted from different sources (vermicompost, oxisols, tropical soils with different degrees of weathering).

In a review, García *et al.* (2016) explain the relationship between the biological activity of HA and the structures and properties present in said humic supramolecule. After characterizing a large number of HA from different areas of Brazil and establishing a structural pattern where labile (HS) and recalcitrant (HA) structures predominate, they conclude that this pattern is significantly related to the growth of smaller roots and that the biological activity of such products is directly related to the structure. In a more recent review, García *et al.* (2019) described the relationship structure - property - function of HS with the oxidative metabolism of plants. The authors conclude that: i) regardless of the type of origin of the HS, there is a common structural pattern for this type of humic compound, which makes them different from any other group of compounds present in the complex soil. If there is a reproducible structural pattern, then it follows that HS is seen as a group of substances with their own structural identity; ii) therefore, the fact that how these humic superstructures are formed is unknown but insufficient to deny its existence; iii) humification continues to be the precursor process of HS, which largely determines the total number of components present in the humic supramolecule.

BIOSTIMULATION ACTION OF HS

Humic substances (HS) are used as biologically active materials due to their ability to modify the physical, chemical, and biological properties of soil. When applied to soil, HS can have significant positive impacts on plant growth and development processes (García *et al.*, 2012). Plant development is closely related to good mineral nutrition, availability of water, air, and environmental parameters such as light and temperature. However, the use of organic matter in both its liquid and solid forms has a proven effect on plant development under laboratory conditions and some under field conditions (Canellas *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2020; Nardi *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2020). Numerous authors (Gerke, 2018; García *et al.*, 2019; Nardi *et al.*, 2021; Bondareva and Kudryasheva, 2021) have separated the effects exerted by HS into direct and indirect, as mentioned earlier.

When HS are sprayed on plants to evaluate their effects on growth, it has been observed that the impacts are often more pronounced and evident in the root system compared to the aerial part of the plants. The responses to HS, when applied to the root system of plants, have been widely discussed, and different viewpoints exist regarding the mechanisms and effects on plant roots. These differing perspectives aim to elucidate the underlying processes and outcomes of HS application. The first considers an initial effect on the roots of the plants and, later, in the whole plant. Nardi *et al.* (2002) state that this effect is mediated by the presence of significant concentrations of both plant hormones and the presence of molecules with structures similar to plant hormones as components of HS supramolecules, which could trigger actions analogous to those promoted by plant hormones (Canellas *et al.*, 2011). Alternatively, Olaetxea *et al.*

(2016) report that, although hormonal concentrations like those of plant hormones are not detected in the HS structures studied, they promote molecular and biochemical responses that affect the root system of HS-treated plants. The transcriptional regulation of gene networks, reported in some studies, allows us to affirm that the foliar application of HS affects certain transcription factors involved in the absorption of nutrients by the root, and their subsequent metabolism, thus expressing positive effects on plant metabolism and plant root development (Nardi *et al.*, 2021).

Due to their direct effects on plant development, HS can modify the different endogenous concentrations of phytohormones in the root system, which present a close relationship between auxins, root characteristics, and biological activities (Jindo *et al.*, 2020; Nardi *et al.*, 2021). The main effects caused by HS through indoleacetic acid (IAA) are associated with root morphology and the emission of lateral roots (Canellas *et al.*, 2002; Jindo *et al.*, 2020; Nardi *et al.*, 2021). According to these authors, this change in the morphology of the root and the promotion of growth is associated with the auxin-like effect by HS, managing to stimulate the activity of H⁺-ATPases in the root plasma membrane. This coincides with the acid growth theory that said: during the process of cell elongation, the accumulation of auxin in the apoplast can activate the auxin receptor protein ABP1 and then stimulate the activity of H⁺-ATPases in the plasma membrane, secreting protons outside the membrane cell, coming to acidify the cell wall whose optimum pH is 5, for which this decrease in pH induces the activation of polysaccharidases. These enzymes that can hydrolyze a series of cell wall bonds and as a consequence, the wall loses its rigidity and it can undergo a viscoelastic extension caused by the pressure potential (Sun *et al.*, 2020).

In the Soil Laboratory of the Interdisciplinary Research Center for Integral Regional Development, Oaxaca Unit (CIIDIR-Oaxaca Unit), significant results have been obtained in different crops of agronomic interest, specifically under rainfed conditions. In addition, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have been used to increase tolerance to water stress in maize plants under rainfed conditions (Matías *et al.*, 2021). To achieve similar objectives, humic extracts derived from urban solid waste (USW) and vermicompost produced from bovine manure have been utilized. These extracts have been applied to various landraces of native maize and different rice cultivars. Promising outcomes have been observed not only in greenhouse conditions but also in open-field settings, encompassing the vegetative to reproductive stages of plant growth. These findings highlight the potential of utilizing humic extracts derived from USW and vermicompost as effective treatments for enhancing crop performance and development (Hernández *et al.*, 2021).

Various laboratories and research groups at the international level have reported significant results by obtaining HS from diverse sources such as bovine manure vermicompost, urban solid waste, soils from different regions, and minerals like leonardite. These HS are then processed into humic extracts, which are subsequently applied to crops facing non-optimal conditions. The objective behind these studies is to enhance the crops' responses to different abiotic stresses and increase potential

yields under challenging environmental conditions. Among these are the group from the Soil Biological Chemistry Laboratory, UFRRJ, Brasil (García *et al.*, 2016; Pinos *et al.*, 2019), the Agricultural Chemistry and Biology Group (BACH) of the University of Navarra, Spain (Olaetxea *et al.*, 2016; Olaetxea *et al.*, 2018), and the Organic Matter and Biostimulants Research Group (MOBI) of the Chemistry Department of the Agrarian University of Havana, Cuba (Galbán-Méndez *et al.*, 2021).

The biostimulant effects of different doses of humic extracts from various sources have been demonstrated in different plants of agricultural interest such as rice (*O. sativa*) and maize (*Z. mays*) (Hernández *et al.*, 2021; Galbán-Méndez *et al.*, 2021; García *et al.*, 2019), lettuce (*Lactuca sativa* L.) (Hernández *et al.*, 2015), garlic (*Allium sativum* L.) (Balmori *et al.*, 2019), and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fariás *et al.*, 2020). During the physical-chemical characterization of the extracts, the presence of HS (HA, FA), phytohormones, beneficial microorganisms, amino acids, lignin, and cellulose has been detected (García *et al.*, 2019; Jindo *et al.*, 2020).

The application of HS has been reported to stimulate key enzymes involved in the metabolism of carbon (C) and nitrogen (N) in plants. Several studies conducted under different experimental conditions have shown that certain enzymes associated with N metabolism exhibit increased activity following HS application. These enzymes include glutamate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, nitrate reductase, and glutamine synthetase (Canellas and Olivares, 2014; Vaccaro *et al.*, 2015). A significant increase in the activity of the main enzymes involved in the reduction and assimilation of inorganic N has been reported as an effect of the application of HA at different concentrations (Vaccaro *et al.*, 2015). The enzymatic activity of the proton pump (H^+ -ATPases) in the root plasma membrane is also increased by the application of HS, which induces changes in root morphology and growth promotion and is closely linked to the theory of acid growth (Canellas *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2020). This enzyme, in addition to being associated with the aforementioned processes, promotes an increase in branching or a greater density of root hairs, and it is also related to greater absorption of nutrients and changes in the exudation profile of the root, as well as in primary and secondary metabolism (Canellas and Olivares, 2014).

CROPS UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS AND BIOSTIMULANT EFFECTS OF HUMIC SUBSTANCES

Unfavorable climatic conditions, including prolonged drought periods, high soil salinity levels, and extreme temperatures, have detrimental effects on crop yields. According to a study by Ibarra-Villareal *et al.* (2021), these adverse conditions can result in yield losses of more than 52 % for crops. These conditions cause oxidative stress, which in turn stimulates the production of extremely harmful reactive oxygen species (ROS) for plants, especially when the balance between production/elimination is affected, causing enzymatic inhibition, in addition to the degradation of chlorophylls, severe damage to biomolecules, and lipid peroxidation mediated by the presence of free radicals such as superoxide ($O_2^{\cdot -}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and singlet oxygen (1O_2) (Apel and Hirt, 2004).

The concerning impact of unfavorable climatic conditions on agricultural productivity poses a significant risk to food security worldwide. As highlighted by Roupheal *et al.* (2018), this situation raises concerns regarding the ability to meet the growing global demand for food. To address the challenges posed by unfavorable climatic conditions and enhance agricultural productivity, the use of environmentally friendly biostimulant products has been suggested, such as plant hormones (Zakeel *et al.*, 2019), algae extract (Hassan *et al.*, 2021), protein hydrolysates, amino acids (Carillo *et al.*, 2019), and HS (Bayat *et al.*, 2021). All of these are considered agronomic tools with significant potential (Povero *et al.*, 2016). This can be corroborated by the increase in scientific publications in this area and, from a practical point of view, by the increase in the number of products formulated with these substances throughout the world (Caradonia *et al.*, 2019). According to market estimates, the production of natural compounds, including biostimulants such as plant hormones, algae extracts, protein hydrolysates, amino acids, and HS, is projected to generate significant profits in the coming years. It is anticipated that by the year 2025, the global market for these natural compounds will exceed USD 4.14 billion in revenue (Bulgari *et al.*, 2019).

HS, in addition to their roles as regulators of primary and secondary metabolism, have been found to have beneficial effects in attenuating environmental stresses in plants. Studies by Canellas *et al.* (2015), du Jardin (2015), Van Oosten *et al.* (2017), and Veobides-Amador *et al.* (2018) have highlighted the ability of HS to mitigate the negative impacts of soil water deficit, salinization, and exposure to suboptimal temperatures, resulting in improved plant performance and productivity.

One example is the foliar application of humic acid (HA) to pepper plants (*Capsicum annuum* L.) under high salinity conditions (100 mM NaCl). Kaya *et al.* (2018) reported that the foliar application of HA enhanced the plant's tolerance to salt stress. This was observed through several physiological and biochemical changes in the plants. The application of HA resulted in increased plant biomass, enhanced chlorophyll and proline content, and enhanced activity of antioxidant enzymes such as peroxidase, catalase, and superoxide dismutase. These changes indicate an improved ability of the plants to cope with oxidative stress induced by salinity, leading to better plant growth and productivity. Subjected to drought stress, maize seedlings demonstrate enhanced growth and physiological responses upon the application of HA. This includes an increase in the content of photosynthetic pigments, relative water content, root and shoot length, and the diameter of the root metaxylem (Bijan-zadeh *et al.*, 2019). In rice experiencing water deficit conditions, the application of HA through the roots leads to an elevation in proline content and antioxidant activity, while concurrently reducing the levels of H₂O₂ (García *et al.*, 2012). Similar results have been reported for sugar beet (*Beta vulgaris* L.) (Khodadadi *et al.*, 2020) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.).

Despite evidence for the protective action of HS in plants grown under stressful conditions, as well as its biostimulant effects, many unanswered questions remain. For this reason, future research should consider the protective effects against abiotic types of stress using humic products extracted from cheap and highly available sources

(manures, household organic waste, composts, and vermicompost), sprayed both via the foliar and root routes to cultivate plants of agricultural interest, including the seedbed, nursery, and open field stages. Likewise, the development of formulations and products must be validated under commercial cultivation conditions, before being placed on the market for the availability of farmers.

RESEARCH NEEDS AND KNOWLEDGE GAPS

The study of HS has seen continuous advancements, with numerous publications contributing to our understanding of their properties and applications. Several notable studies in the literature have significantly contributed to this field. These include works by Piccolo *et al.* (2016), García *et al.* (2016), García *et al.* (2019), Nardi *et al.* (2017), Nardi *et al.* (2021), and Olaetxea *et al.* (2018). These publications have shed light on various aspects of HS, such as their structure, functions, and effects on plant growth and development. Many studies on HS have indeed focused primarily on the chemical aspects, aiming to elucidate their structure, formation process, and the relationship between structure, properties, and functions. These investigations have provided valuable insights into the complex nature of HS and their potential pathways of action. The knowledge gained from these studies has contributed significantly to our understanding of the role of HS in soil and plant systems.

However, it is important to recognize that the application of HS under controlled laboratory or greenhouse conditions may present limitations when it comes to understanding their effects in real-world open-field conditions. Controlled conditions allow researchers to isolate and study specific variables, but they may not fully represent the complexities and interactions that occur in natural environments. In this context, the studies designed under laboratory conditions consider the effect of HS only between 30 and 45 days (vegetative stage), therefore, only the initial phases of the crops are analyzed, when in real open field conditions, most crops exceed 4 months. The current practice of evaluating HS application at specific doses and in controlled conditions, primarily focusing on the early stages of crop growth, presents limitations in terms of understanding the effectiveness of these application rates in open field conditions. As a result, these investigations, although aimed at demonstrating the product's impact on crop quality, physiology, morphology, and yields, often fail to extend their evaluations to the later stages of crop development.

Open field conditions introduce a multitude of factors that can significantly influence the effectiveness of HS application, such as the interaction of multiple stresses, varying climatic conditions, and changing soil dynamics. It is therefore necessary to expand the scope of research to encompass the entire crop cycle and replicate field conditions more accurately.

This discrepancy between the results obtained under controlled conditions and the application of HS in open-field conditions highlights a significant research gap. It raises doubts about whether the same outcomes observed in controlled environments can be replicated when HS are applied under the complex and dynamic conditions

of open-field agriculture, where crops are exposed to multiple simultaneous stresses. In the agricultural market, there are currently various natural bioproducts available that aim to enhance the entire vegetative cycle of crops, increase agricultural yields, and mitigate specific conditions such as water stress and salinity. These products are designed to address the challenges faced by crops throughout their growth stages, providing comprehensive support and promoting overall plant health and productivity.

In a similar vein, the application of HS in crops aims to achieve similar objectives. By applying HS under open field conditions, the goal is to enhance the resilience and adaptability of crops to various types of stress. HS has the potential to improve nutrient uptake, enhance root development, stimulate plant growth, and modulate plant responses to environmental challenges. However, to fully realize the potential benefits of HS in open-field agriculture, further research is needed. Field trials should be conducted to evaluate the effectiveness of HS in real-world farming scenarios, where crops are exposed to multiple stresses simultaneously. These trials should consider different crop species, soil types, climate conditions, and agronomic practices.

By conducting field studies, researchers can assess the performance of HS in diverse agricultural contexts and determine their effectiveness in increasing agricultural yields and mitigating stress. These studies would provide valuable insights into the practical applications of HS and their potential to contribute to sustainable and resilient agriculture.

CONCLUSION

Humic substances have a complex structure characterized by high variability of functional groups and the presence of small heterogeneous molecules that interact through weak bonds. These compounds offer a wide range of benefits when applied to plants. Notably, they help mitigate the adverse effects caused by abiotic stresses and stimulate plant growth and productivity. Although the exact mechanisms of action are still being extensively studied and remain a topic of discussion in scientific literature, various research efforts have focused on understanding the relationship between the structure, properties, and functions of humic substances. This has led to the elucidation of potential mechanisms, such as their similar activity to auxins, which explain their biostimulant effects.

Humic compounds have demonstrated the ability to modulate secondary metabolism, leading to the stimulation of antioxidant enzymatic complexes in conditions of water stress. This action on plant physiology suggests that humic substances could serve as a viable and environmentally friendly alternative for mitigating the consequences of climate change. In effect, they may enhance the characteristics of plants grown under unfavorable conditions. As research progresses, the efficacy of humic products under field conditions, optimal application rates, and the ability to differentiate genuine products from fraudulent ones will become clearer. This increased understanding will further enhance the utilization of humic products over time.

Overall, the complex structure and diverse functionalities of humic substances make them valuable assets in agriculture and plant science. Their potential to alleviate abiotic stress effects and promote plant growth holds promise for sustainable agricultural practices in the face of climate change. Continued research and exploration of humic compounds will pave the way for their optimal use and integration into agricultural systems.

ACKNOWLEDGMENT

RHC gratefully acknowledges Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) for providing the invaluable PhD scholarship (615819), which has been instrumental in supporting this research endeavor.

REFERENCES

- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55 (1): 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Asli S, Neumann PM. 2010. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant and Soil* 336 (1–2): 313–336. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0483-2>
- Balmori DM, Domínguez CYA, Carreras CR, Rebatos SM, Farías LBP, Izquierdo FG, García CA. 2019. Foliar application of humic liquid extract from vermicompost improves garlic (*Allium sativum* L.) production and fruit quality. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 8 (1): 103–112. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-00483-2>
- Bayat H, Shafie F, Aminifard MH, Daghighi S. 2021. Comparative effects of humic and fulvic acids as biostimulants on growth, antioxidant activity and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Scientia Horticulturae* 279: 109912 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109912>
- Bhat SA, Singh J, Vig AP. 2017. Instrumental characterization of organic wastes for evaluation of vermicompost maturity. *Journal of Analytical Science and Technology* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s40543-017-0112-2>
- Bijanzadeh E, Naderi R, Egan TP. 2019. Exogenous application of humic acid and salicylic acid to alleviate seedling drought stress in two corn (*Zea mays* L.) hybrids. *Journal of Plant Nutrition* 42 (13): 1483–1495. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1617312>
- Bondareva L, Kudryasheva N. 2021. Direct and indirect detoxification effects of humic substances. *Agronomy* 11 (2): 198. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020198>
- Bulgari R, Franzoni G, Ferrante A. 2019. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy* 9 (6): 306–33. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- Canellas LP, Dantas DJ, Aguiar NO, Peres LEP, Zsogon A, Olivares FL, Dobbss LB, Façanha AR, Nebbioso A, Piccolo A. 2011. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology* 159 (2): 202–211. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00487.x>
- Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Jones DL, Nebbioso A, Mazzei P. 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196: 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130 (4): 1951–1957. <https://doi.org/10.1104/pp.007088>
- Canellas LP, Olivares FL. 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>

- Canellas LP, Piccolo A, Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, Façanha AR. 2010. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* 78 (4): 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.018>
- Canellas LP, Xavier Velloso AC, de Araújo Santos G. 2005. Modelos estruturais de substâncias húmicas. In Canellas LP, de Araújo Santos G. (eds). *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias: Campos dos Goytacazes, Brazil. 53 p.
- Caradonia F, Battaglia V, Righi L, Pascali G, La Torre A. 2019. Plant biostimulant regulatory framework: prospects in Europe and current situation at international level. *Journal of Plant Growth Regulation* 38 (2): 438–448. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9853-4>
- Carillo P, Colla G, Fusco GM, Dell'Aversana E, El-Nakhel C, Giordano M, Roupheal Y. 2019. Morphological and physiological responses induced by protein hydrolysate-based biostimulant and nitrogen rates in greenhouse spinach. *Agronomy* 9 (8): 450. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080450>
- Carvajal-Campos P, Jiménez VM. 2021. Ingeniería genética contra estrés abiótico en cultivos neotropicales: osmolitos, factores de transcripción y CRISPR/Cas9. *Revista Colombiana de Biotecnología* 23 (2): 47–66. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n2.88487>
- Chen Y, De Nobili M, Aviad T. 2004. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In Magdoff F, Weil RR (eds.). *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp: 103–129. <https://doi.org/10.1201/9780203496374>
- Drobek M, Fraç M, Cybulska J. 2019. Plant biostimulants: Importance of the quality and yield of horticultural crops and the improvement of plant tolerance to abiotic stress—A Review. *Agronomy* 9 (6): 335. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060335>
- du Jardin P. 2015. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196: 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Fariás LP, Balmori DM, Izquierdo FG, Rodríguez AF, García AC, Torres JPM. 2020. Plasma membrane alterations in *Phaseolus vulgaris* L. variety CC-25-9-N induced by metals. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 29 (2): 53–63.
- Galbán-Méndez JM, Martínez-Balmori D, González-Viera D. 2021. Efecto de extractos de sustancias húmicas en la germinación y el crecimiento de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.), cv. INCA LP-5. *Cultivos Tropicales* 42 (1): e05.
- García AC, Berbara RLL, Portuondo Fariás L, Izquierdo FG, Hernández OL, Campos RH, Castro RN. 2012. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *African Journal of Biotechnology* 11 (13): 3125–3134. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1960>
- García AC, de Souza LGA, Pereira MG, Castro RN, García-Mina JM, Zonta E, Berbara RLL. 2016. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific Reports* 6 (1): 20798. <https://doi.org/10.1038/srep20798>
- García AC, van Tol de Castro TA, Santos LA, Tavares OCH, Castro RN, Berbara RLL, García-Mina JM. 2019. Structure–property–function relationship of humic substances in modulating the root growth of plants: a review. *Journal of Environmental Quality* 48 (6): 1622–1632. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0027>
- Gerke J. 2018. Concepts and misconceptions of humic substances as the stable part of soil organic matter: A review. *Agronomy* 8 (5): 76. <https://doi.org/10.3390/agronomy8050076>
- Hassan SM, Ashour M, Soliman AA, Hassanien HA, Alsanie WF, Gaber A, Elshobary ME. 2021. The potential of a new commercial seaweed extract in stimulating morpho-agronomic and bioactive properties of (*Eruca vesicaria* L.) Cav. *Sustainability* 13 (8): 4485. <https://doi.org/10.3390/su13084485>
- Hayes MH, Swift RS. 2018. An appreciation of the contribution of Frank Stevenson to the advancement of studies of soil organic matter and humic substances. *Journal of Soils and Sediments* 18 (4): 1212–1231. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1636-6>
- Hernández OL, Calderín A, Huelva R, Martínez D, Guridi F, Aguiar NO. 2015. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for Sustainable Development* 35 (1): 225–32. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0221-x>

- Hernández-Campos R, Robles C, Calderin Garcia A. 2021. Humic acids effects on plant growth and protection against water stress in selected native maize populations from Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 44 (4): 561–569.
- Ibarra-Villareal AL, Gándara-Ledezma A, Godoy-Flores AD, Herrera-Sepúlveda A, Díaz-Rodríguez AM, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2021. Especies de *Bacillus* tolerantes a la sal como una estrategia prometedor para mitigar el estrés por salinidad en trigo (*Triticum turgidum* subsp. durum). *Journal of Arid Environments* 186: 104399. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>
- Jindo K, Canellas LP, Albacete A, Figueiredo dos Santos L, Frinhani Rocha RL, Carvalho Baia D and Olivares FL. 2020. Interaction between humic substances and plant hormones for phosphorous acquisition. *Agronomy* 10 (5): 640. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050640>
- Kaya C, Akram NA, Ashraf M, Sonmez O. 2018. Exogenous application of humic acid mitigates salinity stress in maize (*Zea mays* L.) plants by improving some key physico-biochemical attributes. *Cereal Research Communications* 46 (1): 67–78. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.064>
- Khodadadi S, Chegini MA, Soltani A, Ajam Norouzi H, Sadeghzadeh Hemayati S. 2020. Influence of foliar-applied humic acid and some key growth regulators on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under drought stress: Antioxidant defense system, photosynthetic characteristics and sugar yield. *Sugar Tech* 22 (5): 765–772. <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00839-6>
- Kulikova NA, Abroskin DP, Badun GA, Chernysheva MG, Korobkov VI, Beer AS, Perminova IV. 2016. Label distribution in tissues of wheat seedlings cultivated with tritium-labeled leonardite humic acid. *Scientific Reports* 6 (1): 28869. <https://doi.org/10.1038/srep28869>
- Liliane TN, Charles MS. 2020. Factors affecting yield of crops. In Amanullah. (ed.). *Agronomy. Climate Change and Food Security*. IntechOpen: London, UK. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90672>
- Malhi GS, Kaur M, Kaushik P. 2021. Impact of climate change on agriculture and its mitigation strategies: A review. *Sustainability* 13 (3): 1318. <https://doi.org/10.3390/su13031318>
- Matías AM, Robles C, Cuevas LH. 2021. Hongos micorrizógenos arbusculares asociados con el cultivo de maíz en regiones con sequía en Oaxaca. *Agrociencia* 55 (1): 19–35. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i1.2345>
- Muscolo A, Sidari M, Attina` E, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S. 2007. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal* 71 (1): 75–85. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0055>
- Nardi S, Ertani A, Francioso O. 2017. Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 180 (1): 5–13. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>
- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry* 34 (11): 1527–1536. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00174-8)
- Nardi S, Schiavon M, and Francioso O. 2021. Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. *Molecules* 26 (8): 2256. <https://doi.org/10.3390/molecules26082256>
- Nebbioso A, Piccolo A. 2012. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta* 720: 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.027>
- Olaetxea M, De Hita D, García CA, Fuentes M, Baigorri R, Mora V, García-Mina JM. 2018. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root-and shoot-growth. *Applied Soil Ecology* 123: 521–537. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.007>
- Olaetxea M, Mora V, García AC, Santos LA, Baigorri R, Fuentes M, Garcia-Mina JM. 2016. Root-shoot signaling crosstalk involved in the shoot growth promoting action of rhizospheric humic acids. *Plant Signaling and Behavior* 11: 1161878. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1161878>
- Piccolo A. 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy* 75: 57–134. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)75003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)75003-7)

- Piccolo A. 2016. In memoriam Prof. F. J. Stevenson and the question of humic substances in soil. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 3: 23. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0076-2>
- Pinos NQ, Louro Barbara RL, Elias SS, van Tol de Castro TA, García AC. 2019. Combination of humic substances and arbuscular mycorrhizal fungi affecting corn plant growth. *Journal of Environmental Quality* 48 (6): 1594–1604. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0035>
- Povero G, Mejia JF, Di Tommaso D, Piaggese A, Warrior PA. 2016. Systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. *Frontiers in Plant Science* 7: 435. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00435>
- Rouphael Y, Colla G. 2020. Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science* 11: 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
- Rouphael Y, Kyriacou MC, Colla G. 2018. Vegetable grafting: A toolbox for securing yield stability under multiple stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 8: 2255. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02255>
- Schulten HR, Schnitzer M. 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften* 80 (1): 29–30. <https://doi.org/10.1007/BF01139754>
- Senn TL, Kingman, AR. 1973. A review of humus and humic acids. Horticulture Department Research Series No. 165, The South Carolina Agricultural Experiment Station, Clemson University: Clemson, South Carolina, USA. 5 p.
- Stevenson FJ. 1994. Humus chemistry. Genesis, composition, reaction (Second edition). John Wiley & Sons: Madison, WI, USA. 512 p.
- Sun X, Chen H, Wang P, Chen F, Yuan L, Mi G. 2020. Low nitrogen induces root elongation via auxin-induced acid growth and auxin-regulated target of rapamycin (TOR) pathway in maize. *Journal of Plant Physiology* 254: 153281. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153281>
- Tavares OCH, Santos LA, Ferreira LM, Sperandio MVL, da Rocha JG, García AC, Fernandes MS. 2017. Humic acid differentially improves nitrate kinetics under low- and high-affinity systems and alters the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and nitrate transporters in rice. *Annals of Applied Biology* 170 (1): 89–103. <https://doi.org/10.1111/aab.12317>
- Vaccaro S, Ertani A, Nebbioso A, Muscolo A, Quaggiotti S, Piccolo A, Nardi S. 2015. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-015-0033-5>
- Van Oosten MJ, Pepe O, De Pascale S, Silletti S, Maggio A. 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Veobides-Amador H, Guridi-Izquierdo F, Vázquez-Padrón V. 2018. Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental. *Cultivos Tropicales* 39 (4): 102–109.
- Yang F, Antonietti M. 2020. Artificial humic acids: sustainable materials against climate change. *Advanced Science* 7 (5): 1902992. <https://doi.org/10.1002/advs.201902992>
- Yoon HY, Jeong HJ, Cha JY, Choi M, Jang KS, Kim WY, Jeon JR. 2020. Structural variation of humic-like substances and its impact on plant stimulation: Implication for structure-function relationship of soil organic matters. *Science of the Total Environment* 725: 138409. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138409>
- Zakeel MCM, Safeena MIS. 2019. Biofilmed biofertilizer for sustainable agriculture. In Ansari RA, Mahmood I. (eds.). *Plant health under biotic stress*. Springer: Heidelberg, Germany, pp: 65–82. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_3
- Zhang H, Zhu J, Gong Z. 2022. Abiotic stress responses in plants. *Nature Review in Genetics* 23 (2): 104–119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0279-1>

EXTRACTO HÚMICO COMO BIOESTIMULANTE EN CULTIVOS SOMETIDOS A ESTRÉS ABIÓTICO

Reinier Hernández-Campos^{1*}, Celerino Robles², Sahylin Muñiz-Becerá³,
Sandra Pérez-Álvarez⁴, Octavio Loera-Corral⁵

¹ Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, Ciudad de México, México. C. P. 04510.

² Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca. Laboratorio de Suelos. Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. C. P. 71230.

³ Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), Grupo de Ingeniería de Procesos. Cto. Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México. C. P. 04510.

⁴ Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus Delicias. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Carretera Delicias-Rosales km 2.5, Delicias, Chihuahua, México. C. P. 33000.

⁵ Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc, Iztapalapa, Ciudad de México, México. C. P. 09340.

* Autor para correspondencia: reinierhc86@hotmail.com

RESUMEN

Dado que el estrés abiótico plantea importantes retos para el crecimiento y la productividad de los cultivos, el desarrollo de plantas con mayor supervivencia y crecimiento cuando se exponen a situaciones desfavorables es un objetivo de varios grupos de investigación. Los bioestimulantes consisten en sustancias o microorganismos que, aplicados a los cultivos por las vías foliar o radicular, sirven para potenciar diversos procesos relacionados con el crecimiento y el desarrollo. Estos procesos incluyen la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés ambiental y la calidad general de la cosecha. Curiosamente, los bioestimulantes pueden lograr estos efectos incluso cuando poseen una baja concentración de elementos nutritivos en su composición. Entre los bioestimulantes principales y más utilizados se encuentran las hormonas vegetales, el extracto de algas, los hongos micorrícicos, los hidrolizados de proteínas y las sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos). Esta revisión arroja luz sobre los efectos bioestimulantes de la aplicación de sustancias húmicas a plantas que experimentan condiciones de estrés hídrico y cultivo de temporal bajo. Adicionalmente, pretende identificar las lagunas de investigación actual y destacar las áreas que requieren una mayor investigación. Además, la revisión ofrece una visión concisa del origen y la progresión de la investigación sobre las sustancias húmicas, incluyendo su proceso de extracción y obtención, así como sus características estructurales y la relación entre estructura, propiedades y funciones. La revisión también presenta los resultados de las investigaciones que respaldan el potencial de las sustancias húmicas para influir en los cultivos afectados por el estrés abiótico. Estos hallazgos destacan los efectos beneficiosos de SH en la mejora de la resiliencia y el rendimiento de los cultivos que se enfrentan a retos como la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas y otros factores de estrés no biológicos. Las pruebas subrayan la importancia de las sustancias húmicas como valiosa herramienta para

Citation: Hernández-Campos R, Robles C, Muñiz-Becerá S, Pérez-Álvarez S, Loera-Corral O. 2023. Extracto húmico como bioestimulante en cultivos sometidos a estrés abiótico. *Agrociencia* 57(5): 1008-1045. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2942

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: January 08, 2023.

Approved: June 07, 2023.

Published in Agrociencia:
July 12, 2023.

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



mitigar los efectos perjudiciales del estrés abiótico sobre la productividad de los cultivos y la salud general de las plantas.

Palabras clave: efectos fisiológicos, rendimiento, eustrés.

INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen un nivel moderado de movilidad, lo que significa que a lo largo de su ciclo vegetativo se encuentran con condiciones desfavorables que dificultan el desarrollo óptimo de sus funciones vegetativas (Zhang *et al.*, 2022). Entre los principales tipos de estrés abiótico que afectan al desarrollo de los cultivos se encuentran la sequía, la salinidad elevada, el frío y el calor, que pueden reducir la producción de biomasa y el rendimiento hasta en un 70 % (Liliane y Charles, 2020). Estos retos son especialmente importantes en las regiones áridas y semiáridas debido al impacto del cambio climático. El cambio climático está alterando los regímenes de precipitaciones y modificando los valores de temperatura en diversas zonas geográficas del planeta. Esto tiene un grave impacto en las plantas de estas regiones, exacerbando las dificultades a las que se enfrentan para mantener sus funciones vegetativas (Malhi *et al.*, 2021). Numerosos estudios se han centrado en la horticultura y la agronomía, para mejorar la productividad y aumentar la resistencia de diversos cultivos al estrés abiótico. Los esfuerzos de investigación se dirigen a desarrollar estrategias y técnicas que puedan mejorar el rendimiento de los cultivos en condiciones ambientales adversas. Al abordar aspectos tanto hortícolas como agronómicos, los estudios aportan valiosas ideas para mitigar los efectos del estrés abiótico y promover prácticas agrícolas sostenibles (Drobek *et al.*, 2019).

La mejora genética se emplea como parte de una serie de estrategias destinadas a aumentar el rendimiento y mejorar la productividad de los cultivos, particularmente en entornos difíciles. Esta técnica puede incluir la incorporación de genes asociados a la tolerancia, cuya expresión modifica los principales mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en la tolerancia. Algunos de estos genes son los relacionados con el transporte de iones y agua, la síntesis de sustancias osmoprotectoras como glicina-betaína, manitol y prolina, transportadores de exclusión iónica, mecanismos de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ERO), producción de moléculas chaperonas, además del control de la regulación transcripcional (Carvajal-Campos y Jiménez, 2021).

Además de las técnicas mencionadas, la agricultura moderna utiliza cada vez más los bioestimulantes como herramienta agronómica y alternativa respetuosa con el medio ambiente. Los bioestimulantes son reconocidos por su capacidad para ayudar a los cultivos a hacer frente a los frecuentes períodos de sequía y mejorar su rendimiento en condiciones adversas (Bulgari *et al.*, 2019).

La definición y el concepto de bioestimulantes vegetales o agrícolas están en continua evolución, principalmente debido a la amplia gama de materiales que pueden utilizarse para producir bioestimulantes (Rouphael y Colla, 2020). Desde un punto de

vista industrial, se trata de compuestos que contienen tanto sustancias como microorganismos, cuya función, una vez aplicados a los cultivos por vía foliar o radicular, es estimular procesos relacionados con la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad de los cultivos. Los bioestimulantes, a pesar de sus efectos beneficiosos para las plantas, no poseen propiedades pesticidas directas. Por consiguiente, no están clasificados ni regulados como plaguicidas. Su función principal es mejorar el crecimiento, el desarrollo y la tolerancia al estrés de las plantas, en lugar de combatir directamente las plagas (Van Oosten *et al.*, 2017). Las hormonas vegetales (Zakeel y Safeena, 2019), los extractos de algas (Hassan *et al.*, 2021), los hidrolizados de proteínas (Carillo *et al.*, 2019) y los ácidos húmicos y fúlvicos (Bayat *et al.*, 2021) son los principales y más utilizados bioestimulantes en la agricultura moderna.

Las SH, de las que derivan los ácidos húmicos (AH) y fúlvicos (AF), son reconocidos por su absorción de nutrientes y sus efectos antiestrés (Van Oosten *et al.*, 2017). De hecho, los efectos de los bioestimulantes en las plantas cultivadas se han descrito con más frecuencia en el sistema radicular que en las partes aéreas (por encima del suelo).v Esto se debe a que los bioestimulantes suelen interactuar directamente con el sistema radicular, influyendo en el crecimiento de las raíces, la absorción de nutrientes y la salud general de las raíces. Estos efectos pueden dividirse en directos e indirectos. Se entiende por efectos directos aquellos que no dependen de las características del suelo complejo ni de la disponibilidad de micro y macroelementos, aunque sí implican la regulación de la actividad celular, la variación del metabolismo, así como cambios en la expresión génica y la acción hormonal presente (du Jardin *et al.*, 2015). Uno de los efectos indirectos de los bioestimulantes es la mejora de la estructura granular del suelo, lo que conduce a una mejora de las relaciones aire-agua dentro del suelo. Los bioestimulantes pueden influir positivamente en la estructura del suelo promoviendo la agregación de las partículas del suelo, lo que da lugar a la formación de agregados estables en el suelo. Estos agregados crean espacios porosos en el suelo, mejorando su aireación y su capacidad de retención de agua (Chen *et al.*, 2004).

Los efectos directos están asociados principalmente a la entrada de HS, compuestos de bajo peso molecular, en el tejido vegetal (a nivel celular) a través de la epidermis (Kulikova *et al.*, 2016) o por la existencia de interacciones físico-químicas (Asli y Neumann, 2010), provocando marcadas estimulaciones en los diferentes procesos metabólicos en distintas plantas, como en maíz (*Zea mays* L.) (Canellas *et al.*, 2002) y arroz (*Oryza sativa* L.) (García *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2017).

Esta revisión tiene como objetivo proporcionar una visión general de los efectos bioestimulantes de las SH en cultivos sometidos a estrés y en condiciones de cultivo de temporal. También destaca las lagunas existentes en la investigación e identifica las áreas que requieren una mayor investigación. Adicionalmente, la revisión discute brevemente el origen y la evolución de la investigación relacionada con las SH, los procesos implicados en la obtención del SH y la relación entre su estructura, propiedades y funciones. La revisión presenta los resultados de las investigaciones que apoyan el potencial de las SH para influir positivamente en los cultivos afectados por el estrés abiótico.

SUSTANCIAS HÚMICAS

Las investigaciones relacionadas con el tema de la SH se remontan a hace más de 250 años, y el término humus se menciona por primera vez en *Agriculturae Fundamenta Chemica*. Desde entonces, el campo de las SH ha experimentado un aumento significativo de la investigación y el interés, sobre todo en el contexto de las ciencias agrarias. A medida que avanzaban las prácticas agrícolas, se comprendió que las SH podían ser un recurso valioso para mejorar la producción de cultivos. Esta constatación hizo que se prestara más atención al estudio de la química y las propiedades de estas moléculas (Senn y Kingman, 1973).

Como materia orgánica natural, las SH se definen como un conjunto de moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza, que abarca todo el ecosistema terrestre, así como ríos, lagos y océanos (Yang y Antonietti, 2020). Piccolo (2002) las definió como asociaciones supramoleculares de moléculas relativamente pequeñas, autoensambladas y heterogéneas, unidas predominantemente por fuerzas no covalentes.

Las HS se forman a través del complejo proceso de descomposición y resíntesis en el suelo, impulsado principalmente por la acción de la microbiota. Se originan a partir de la descomposición y transformación de residuos vegetales y animales. La microbiota, que incluye bacterias, hongos y otros microorganismos, desempeña un papel vital en la degradación y posterior síntesis de materia orgánica, lo que conduce a la formación de SH. (García *et al.*, 2019; Hernández *et al.*, 2021). Las principales fuentes para la obtención de SH son los suelos, la turba, el carbón, el estiércol, la composta y la vermicomposta, así como minerales como la leonardita, entre otros (Hernández *et al.*, 2021). La amplia gama de fuentes disponibles para la obtención de SH contribuye a la significativa diversidad estructural encontrada en las moléculas, que son los constituyentes primarios de la materia orgánica del suelo. Se ha documentado el papel fundamental de las estructuras y propiedades de las SH y su relación con los efectos fisiológicos, tanto en la parte aérea como en la parte radicular en las plantas, así como su incidencia en las principales propiedades fisicoquímicas del suelo (du Jardin *et al.*, 2015). Canelas *et al.* (2005) han propuesto un modelo que se corresponde con las características estructurales presentes en las SH.

Los principales impactos observados de la aplicación de SH (señalización hormonal) en las plantas se manifiestan predominantemente en el sistema radicular. Estos efectos pueden clasificarse en directos e indirectos, tal y como se explica en la introducción. Estos efectos mejoran significativamente varios procesos metabólicos en las plantas, como se ha demostrado en estudios previos realizados en maíz (*Z. mays*) (Canelas *et al.*, 2002), arroz (*O. sativa*) (Tavares *et al.*, 2017) y otras especies (Chen *et al.*, 2004).

ESTRUCTURA Y OBTENCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS

Existen múltiples interpretaciones sobre la estructura de las sustancias húmicas (SH). Uno de los modelos más aceptados fue el presentado por Piccolo (2002). Este modelo abarca dos aspectos clave: i) la estructura supramolecular y ii) una comprensión actualizada de la disposición supramolecular de las SH. Estas proposiciones han obtenido

un reconocimiento significativo en la comunidad científica y se mencionan con frecuencia en la literatura sobre las SH. De acuerdo con este modelo, las SH se describen como ensamblajes supramoleculares compuestos por diversas moléculas orgánicas relativamente pequeñas con características variables (Canellas *et al.*, 2015). Esto indica que las SH (Figura 1), cuando forman parte del complejo suelo, adquieren un fuerte ensamblaje, así como una mayor estabilidad, causada por las interacciones de fuerzas débiles (van der Waals, $\pi - \pi$, CH - π), siendo los enlaces por enlaces de hidrógeno, además de las fuerzas hidrofóbicas, las principales causas del gran tamaño molecular (Canellas *et al.*, 2015).

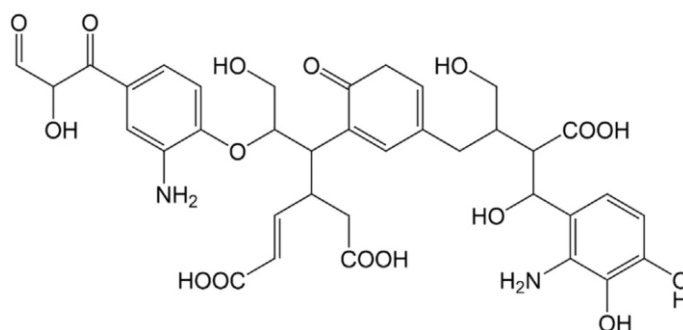


Figura 1. Modelo estructural de una unidad de ácido húmico (peso molecular 731 g mol⁻¹).

La introducción del concepto supramolecular en la comprensión de la estructura de las SH (Figura 2) supuso un cambio significativo en las clasificaciones empleadas anteriormente. Este novedoso enfoque ha revolucionado nuestra comprensión de las SH al proporcionar información sobre sus interacciones con los minerales del suelo, así como sobre su capacidad de adsorción y complejación de iones. La adopción de la perspectiva supramolecular permitió comprender mejor las SH y allanó el camino

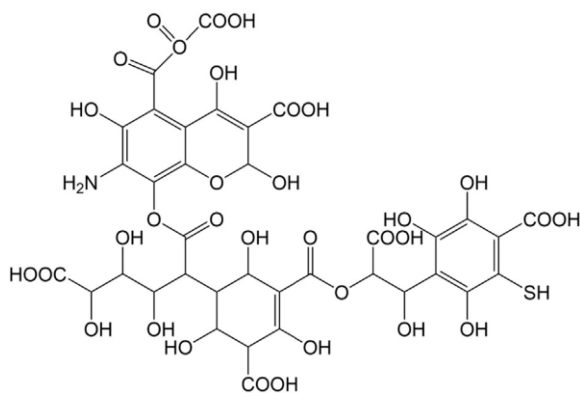


Figura 2. Modelo estructural de una unidad de ácido fúlvico (peso molecular 1051 g mol⁻¹).

para avanzar en el estudio de sus intrincados comportamientos y funcionalidades. Permitió una mejor interpretación práctica del proceso de humificación, entendido como un proceso de degradación fluida de residuos orgánicos procedentes de animales y plantas que, por acción de microorganismos, comienzan a formar sustancias con patrones estructurales coincidentes con las SH (Piccolo, 2016; Hayes y Swift, 2018; García *et al.*, 2019).

Una vez obtenidas las SH, el siguiente paso en el proceso consiste en la purificación, que normalmente se consigue mediante diálisis. El fraccionamiento es el método más utilizado para reducir la heterogeneidad de las sustancias, que se basa en la separación de sus componentes aprovechando las propiedades relacionadas con su estructura molecular. La técnica de fraccionamiento de las SH más utilizada se basa en la variación de su solubilidad a diferentes valores de pH (Figura 3) (Nebbioso y Piccolo, 2012). En función de su solubilidad a diferentes valores de pH, se reconocen tres fracciones principales que componen las SH: la humina (H), fracción insoluble en medio acuoso a cualquier valor de pH; los ácidos fúlvicos (AF) (Figura 2), fracción soluble en medio acuoso a cualquier valor de pH; y los ácidos húmicos (AH) (Figura 1), solubles en medio básico e insolubles a pH próximo a 2 (Stevenson, 1994). A la luz de estudios más recientes, se ha encontrado información tanto cuantitativa como cualitativa sobre los principales grupos funcionales encontrados en la estructura de las SH (García *et al.*,

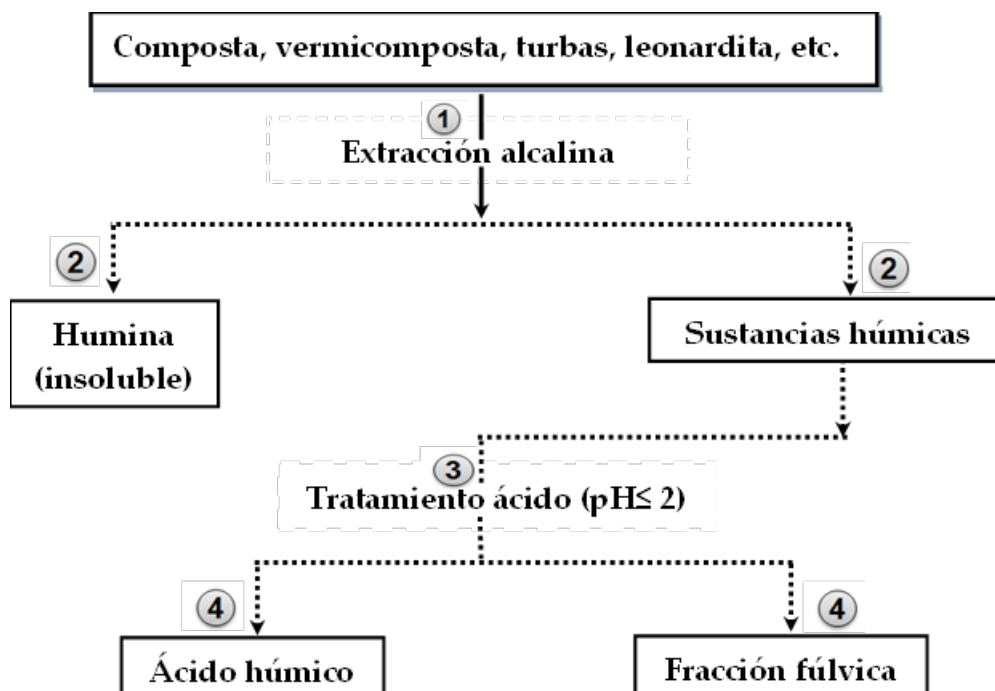


Figura 3. Diagrama del proceso de fraccionamiento de las sustancias húmicas basado en el pH (Stevenson, 1994).

2019). En los informes que incluyen estudios espectroscópicos, las SH generalmente presentan estructuras aromáticas (bencenos y fenoles polisustituídos), así como fenólicas y alcohol-COOH, ácido carboxílico-COOH, ésteres, quinonas, entre otras (Schulten y Schnitzer, 1993).

Una representación aproximada de la estructura de las SH (Figura 4) fue propuesta por Schulten y Schnitzer (1993), en la que se observan los principales grupos funcionales, así como las partes alifáticas y aromáticas, además del dominio hidrofílico exterior, formado por grupos polares (por ejemplo, residuos carboxílicos), y el dominio hidrofóbico interior, compuesto por macromoléculas de origen vegetal. De acuerdo con Muscolo *et al.* (2007), tanto los dominios de las SH como la variabilidad de los grupos funcionales dentro de ellas desempeñan papeles cruciales en la determinación de los efectos biológicos de estos compuestos en las plantas, debido a la solubilidad y a la reactividad biológica que generan cuando se aplican a las plantas. Las SH se forman de forma irregular dependiendo de la hidrofobicidad presente en los componentes de las moléculas húmicas, aunque también son el resultado de su tamaño, forma e interacciones químicas (Nebbio y Piccolo, 2012).

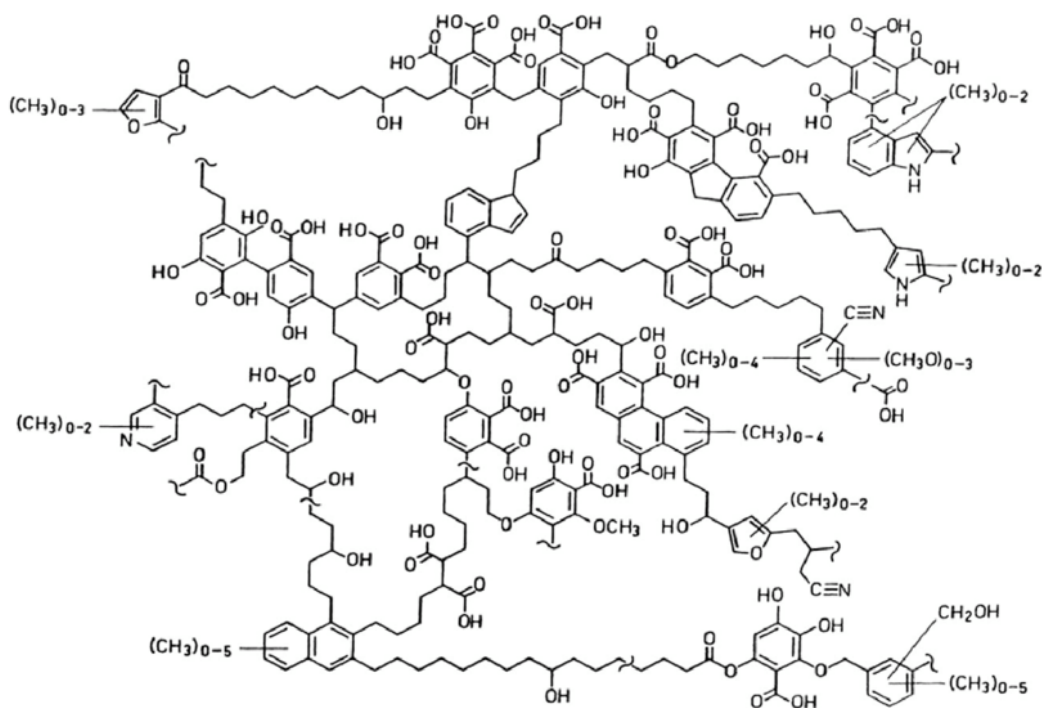


Figura 4. El modelo de estructura aproximada de una molécula de ácido húmico, desarrollado a partir de una red química tentativa de sustancias húmicas (C₃₀₈H₃₂₈₀₉₀N₅) propuesta por Schulten y Schnitzer (1993).

Los recientes avances en tecnología y técnicas analíticas han contribuido significativamente a nuestra comprensión de las estructuras de las SH. Un área de especial interés es la determinación del índice de madurez de las SH derivadas de diversas fuentes. Este análisis es valioso, ya que permite seguir la degradación de los residuos orgánicos y facilita la descripción de los cambios bioquímicos que se producen durante procesos como el vermicompostaje. Mediante la evaluación del índice de madurez, los investigadores pueden calibrar el grado de mineralización y descomposición de las materias primas utilizadas. La información es crucial para evaluar la eficacia y eficiencia de los procesos de compostaje, ya que proporciona información sobre el ritmo de descomposición de la materia orgánica y la liberación de nutrientes. La capacidad de controlar y cuantificar estos cambios ayuda a optimizar las prácticas de compostaje y a utilizar los residuos orgánicos de forma más eficaz en aplicaciones agrícolas y medioambientales (Bhat *et al.*, 2017). Estas técnicas son las siguientes: FT-IR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier), UV/Vis (espectroscopia ultravioleta-visible), Py-GC/MS (cromatografía de gases líquidos acoplada a pirólisis y espectroscopia de masas), ¹³C CP/ MAS - NMR (resonancia magnética nuclear del carbono 13) (Canellas *et al.*, 2005). Se ha informado de la variabilidad de la estructura de las SH durante el proceso de vermicompostaje y se han identificado más de 250 compuestos derivados de diferentes fuentes, como ligninas, carbohidratos, proteínas, alcoholes y ácidos grasos, cuya presencia varía en función del progreso de la estabilización de la materia orgánica.

RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA-PROPIEDAD Y FUNCIÓN DE LAS SH

La relación entre la estructura y las propiedades de las SH (Figura 5), es crucial para comprender sus características funcionales (García *et al.*, 2016; Nardi *et al.*, 2017). Comprender cómo influye la estructura de las SH en sus propiedades proporciona valiosos conocimientos sobre la forma en que estas moléculas, derivadas del proceso de humificación, ejercen sus efectos sobre las plantas. Las propiedades de las SH, como

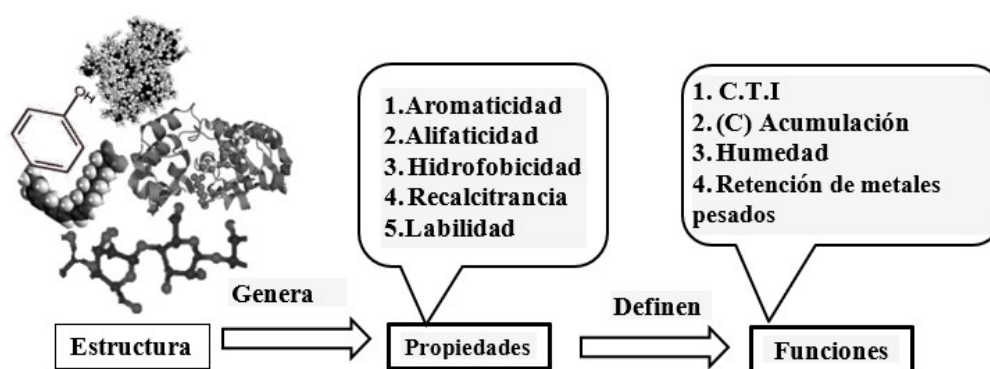


Figura 5. Propuesta de la relación entre estructura, propiedad y función de las sustancias húmicas (García *et al.*, 2019).

la solubilidad, la reactividad química y la capacidad de complejación, repercuten directamente en sus interacciones con los sistemas vegetales.

Explicar la relación entre la estructura, las propiedades y los efectos de las SH puede ser complejo, especialmente si se tienen en cuenta los diferentes efectos e intensidades observados cuando las SH se aplican por vía foliar (en las hojas) o radial (en las raíces) en diferentes especies de plantas (Nardi *et al.*, 2017). Muscolo *et al.* (2007) encontraron diferencias en la actividad del metabolismo del carbono y nitrógeno en plantas de *Pinus nigra* J.F.A al aplicar SH extraído de dos fuentes diferentes, una con abundante presencia de grupos metilo (CH_3) y carboxilo (COOH), y la otra con abundante contenido de betaína y ácidos orgánicos, justificando dichas diferencias por la desigualdad estructural. García *et al.* (2019) afirman que el HS obtenido a partir de material vermicompostado en un medio alcalino con abundante presencia de grupos carboxilo (COOH) logró incrementos significativos en la variable de desarrollo de raíces laterales. Nardi *et al.* (2017) afirman que existe una relación directa entre algunos grupos funcionales específicos y su actividad biológica. Utilizando suelo volcánico como fuente de origen, separaron las SH de la muestra original en tres fracciones de diferentes tamaños, para poder observar una relación entre su estructura y su actividad biológica.

Durante la evaluación, se observó que tanto la muestra original de SH como sus tres fracciones derivadas estimulaban significativamente las actividades enzimáticas asociadas con la vía glucolítica y los procesos respiratorios en las plantas de maíz. En particular, la fracción III, que tenía el tamaño molecular más pequeño y una conformación más flexible, arrojó los resultados más favorables. De acuerdo con Nardi *et al.* (2017), esto se debe a que la fracción III presenta una conformación más flexible que las otras fracciones, permitiendo así una mejor difusión de los componentes húmicos bioactivos al entrar en contacto con las células de maíz. Por otra parte, Canellas *et al.* (2010) describieron resultados contrarios en cultivos de *Z. mays* tras realizar diferentes experimentos, en los que evaluaron la bioactividad de AH extraídos de diferentes fuentes (vermicomposta, oxisoles, suelos tropicales con diferentes grados de meteorización). En una revisión, García *et al.* (2016) explican la relación entre la actividad biológica de los AH y las estructuras y propiedades presentes en dicha supramolécula húmica. Tras caracterizar un gran número de AH procedentes de diferentes zonas de Brasil y establecer un patrón estructural en el que predominan las estructuras lábiles (SH) y recalcitrantes (AH), concluyen que este patrón está significativamente relacionado con el crecimiento de raíces más pequeñas y que la actividad biológica de dichos productos está directamente relacionada con la estructura. En una revisión más reciente, García *et al.* (2019) describieron la relación estructura - propiedad - función de las SH con el metabolismo oxidativo de las plantas. Los autores concluyen que: i) independientemente del tipo de origen de las SH, existe un patrón estructural común para este tipo de compuestos húmicos, que los hace diferentes de cualquier otro grupo de compuestos presentes en el suelo complejo. Si existe un patrón estructural reproducible, entonces se deduce que las SH se consideran un grupo de sustancias con identidad

estructural propia; ii) por lo tanto, el hecho de que se desconozca cómo se forman estas superestructuras húmicas es insuficiente para negar su existencia; iii) la humificación sigue siendo el proceso precursor de las SH, que determina en gran medida el número total de componentes presentes en la supramolécula húmica.

ACCIÓN BIOESTIMULANTE DE LAS SH

Las sustancias húmicas (SH) se utilizan como materiales biológicamente activos debido a su capacidad para modificar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Cuando se aplican al suelo, las SH pueden tener efectos positivos significativos en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (García *et al.*, 2012). El desarrollo de las plantas está estrechamente relacionado con una buena nutrición mineral, la disponibilidad de agua, aire y parámetros ambientales como la luz y la temperatura. Sin embargo, el uso de materia orgánica tanto en su forma líquida como sólida tiene un efecto demostrado sobre el desarrollo de las plantas en condiciones de laboratorio y algunas en condiciones de campo (Canellas *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2020; Nardi *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2020). Numerosos autores (Gerke, 2018; García *et al.*, 2019; Nardi *et al.*, 2021; Bondareva and Kudryasheva, 2021) han separado los efectos ejercidos por las SH en directos e indirectos, como se ha mencionado anteriormente.

Cuando se pulverizan sustancias húmicas sobre las plantas para evaluar sus efectos sobre el crecimiento, se ha observado que los impactos suelen ser más pronunciados y evidentes en el sistema radicular que en la parte aérea de las plantas. Las respuestas a las SH, cuando se aplican al sistema radicular de las plantas, han sido ampliamente debatidas, y existen diferentes puntos de vista sobre los mecanismos y efectos de las SH en las raíces de las plantas. Estas diferentes perspectivas pretenden dilucidar los procesos subyacentes y los resultados de la aplicación de las SH. El primero considera un efecto inicial de las SH en las raíces de las plantas y, posteriormente, este efecto se refleja en toda la planta. Nardi *et al.* (2002) afirman que este efecto está mediado por la presencia de concentraciones significativas de ambas hormonas vegetales y por la presencia de moléculas con estructuras similares a las hormonas vegetales como componentes de las supramoléculas de las SH, que podrían desencadenar acciones análogas a las promovidas por las hormonas vegetales (Canellas *et al.*, 2011). Alternativamente, Olaetxea *et al.* (2016) informan de que, aunque no se detectan concentraciones hormonales como las de las hormonas vegetales en las estructuras de SH estudiadas, promueven respuestas moleculares y bioquímicas que afectan al sistema radicular de las plantas tratadas con SH. La regulación transcripcional de redes de genes, reportada en algunos estudios, permite afirmar que la aplicación foliar de SH afecta a ciertos factores de transcripción implicados en la absorción de nutrientes por la raíz, y su posterior metabolismo, expresando así efectos positivos sobre el metabolismo de la planta y el desarrollo radicular de la misma (Nardi *et al.*, 2021).

Debido a sus efectos directos sobre el desarrollo de la planta, las SH pueden modificar las diferentes concentraciones endógenas de fitorreguladores en el sistema radicular, lo que presenta una estrecha relación entre auxinas, características de la raíz y activi-

dades biológicas (Jindo *et al.*, 2020; Nardi *et al.*, 2021). Los principales efectos causados por las SH a través del ácido indolacético (IAA) están asociados a la morfología de las raíces y a la emisión de raíces laterales (Canellas *et al.*, 2002; Jindo *et al.*, 2020; Nardi *et al.*, 2021). De acuerdo con estos autores, este cambio en la morfología de la raíz y la promoción del crecimiento está asociado al efecto similar a la auxina por SH, logrando estimular la actividad de las H⁺-ATPasas en la membrana plasmática de la raíz, lo que coincide con la teoría del crecimiento ácido que decía: durante el proceso de elongación celular, la acumulación de auxina en el apoplasto puede activar la proteína receptora de auxina ABP1 y luego estimular la actividad de las H⁺-ATPasas en la membrana plasmática, secretando protones fuera de la membrana celular, llegando a acidificar la pared celular cuyo pH óptimo es 5, por lo que esta disminución del pH induce la activación de las polisacaridasas, enzimas que pueden hidrolizar una serie de enlaces de la pared celular y como consecuencia, la pared pierde su rigidez y puede sufrir una extensión viscoelástica provocada por el potencial de presión (Sun *et al.*, 2020).

En el Laboratorio de Suelos del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-Unidad Oaxaca), se han obtenido resultados significativos en diferentes cultivos de interés agronómico, específicamente en condiciones de temporal. Adicionalmente, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se han utilizado para aumentar la tolerancia al estrés hídrico en plantas de maíz en condiciones de temporal (Matías *et al.*, 2021). Para lograr objetivos similares, se han utilizado extractos húmicos derivados de residuos sólidos urbanos (RSU) y vermicomposta producida a partir de estiércol bovino. Estos extractos se han aplicado a varias variedades autóctonas extracts have been applied to various landraces de maíz nativo y a diferentes cultivares de arroz. Se han observado resultados prometedores no sólo en condiciones de invernadero, sino también en campo abierto, abarcando desde la fase vegetativa hasta la reproductiva del crecimiento de la planta. Estos resultados ponen de relieve el potencial de la utilización de extractos húmicos derivados de los RSU y del vermicompost como tratamientos eficaces para mejorar el rendimiento y el desarrollo de los cultivos (Hernández *et al.*, 2021).

Diversos laboratorios y grupos de investigación a nivel internacional han reportado resultados significativos en la obtención de SH a partir de diversas fuentes como vermicomposta de estiércol bovino, residuos sólidos urbanos, suelos de diferentes regiones y minerales como la leonardita. A continuación, estas SH se transforman en extractos húmicos, que se aplican posteriormente a los cultivos que se enfrentan a condiciones no óptimas. El objetivo de estos estudios es mejorar la respuesta de los cultivos a diferentes estreses abióticos y aumentar el rendimiento potencial en condiciones ambientales difíciles. Entre estos se encuentran el grupo del Laboratorio de Química Biológica del Suelo, UFRRJ, Brasil (García *et al.*, 2016; Pinos *et al.*, 2019), el Grupo de Química y Biología Agrícola (BACH) de la Universidad de Navarra, España (Olaetxea *et al.*, 2016; Olaetxea *et al.*, 2018), y el Grupo de Investigación en Materia Orgánica y Bioestimulantes (MOBI) del Departamento de Química de la Universidad Agraria de La Habana, Cuba (Galbán-Méndez *et al.*, 2021).

Los efectos bioestimulantes de diferentes dosis de extractos húmicos de diversas fuentes han sido demostrados en diferentes plantas de interés agrícola como arroz (*O. sativa*) y maíz (*Z. mays*) (Hernández *et al.*, 2021; Galbán-Méndez *et al.*, 2021; García *et al.*, 2019), lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Hernández *et al.*, 2015), ajo (*Allium sativum* L.) (Balmori *et al.*, 2019) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Farías *et al.*, 2020). Durante la caracterización físico-química de los extractos se ha detectado la presencia de SH (AH, AF), fitohormonas, microorganismos beneficiosos, aminoácidos, lignina y celulosa (García *et al.*, 2019; Jindo *et al.*, 2020).

Se ha informado de que la aplicación de SH estimula enzimas clave implicadas en el metabolismo del carbono (C) y el nitrógeno (N) en las plantas. Varios estudios realizados en diferentes condiciones experimentales han demostrado que ciertas enzimas asociadas al metabolismo del N muestran una mayor actividad tras la aplicación de SH. Estas enzimas incluyen la glutamato deshidrogenasa, la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la nitrato reductasa y la glutamina sintetasa (Canellas y Olivares, 2014; Vaccaro *et al.*, 2015). Se ha reportado un aumento significativo en la actividad de las principales enzimas implicadas en la reducción y asimilación de N inorgánico como efecto de la aplicación de AH a diferentes concentraciones (Vaccaro *et al.*, 2015). La actividad enzimática de la bomba de protones (H⁺-ATPasas) en la membrana plasmática de la raíz también aumenta con la aplicación de SH, lo que induce cambios en la morfología de la raíz y la promoción del crecimiento y está estrechamente relacionado con la teoría del crecimiento ácido (Canellas *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2020). Esta enzima, además de estar asociada a los procesos mencionados, promueve un aumento de la ramificación o una mayor densidad de pelos radicales, y también está relacionada con una mayor absorción de nutrientes y cambios en el perfil de exudación de la raíz, así como en el metabolismo primario y secundario (Canellas y Olivares, 2014).

CULTIVOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO Y EFECTOS BIOESTIMULANTES DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS

Las condiciones climáticas desfavorables, incluidos los periodos prolongados de sequía, los altos niveles de salinidad del suelo y las temperaturas extremas, pueden tener efectos perjudiciales en el rendimiento de los cultivos. De acuerdo con un estudio de Ibarra *et al.* (2021), estas condiciones adversas pueden provocar pérdidas de rendimiento superiores al 52 % en los cultivos (Ibarra-Villareal *et al.*, 2021). Esto se debe a que estas condiciones causan estrés oxidativo, que a su vez estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) extremadamente dañinas para las plantas, especialmente cuando se afecta el equilibrio entre producción/eliminación, causando inhibición enzimática, además de la degradación de las clorofilas, daños severos a las biomoléculas y peroxidación lipídica mediada por la presencia de radicales libres como superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno singlete (¹O₂) (Apel y Hirt, 2004).

El preocupante impacto de las condiciones climáticas desfavorables sobre la productividad agrícola supone un riesgo importante para la seguridad alimentaria en todo el

mundo. Como destacan Rouphael *et al.* (2018), esta situación suscita preocupación en cuanto a la capacidad de satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos. Para hacer frente a los desafíos que plantean las condiciones climáticas desfavorables y mejorar la productividad agrícola, se ha sugerido el uso de productos bioestimulantes respetuosos con el medio ambiente, como hormonas vegetales (Zakeel *et al.*, 2019), extracto de algas (Hassan *et al.*, 2021), hidrolizados de proteínas, aminoácidos (Carillo *et al.*, 2019) y HS (Bayat *et al.*, 2021). Todas ellas se consideran herramientas agronómicas con un potencial significativo (Povero *et al.*, 2016). Esto puede corroborarse por el aumento de las publicaciones científicas en este ámbito y, desde un punto de vista práctico, por el incremento del número de productos formulados con estas sustancias en todo el mundo (Caradonia *et al.*, 2019). De acuerdo con las estimaciones del mercado, se prevé que la producción de compuestos naturales, incluidos bioestimulantes como hormonas vegetales, extractos de algas, hidrolizados de proteínas, aminoácidos y SH, genere importantes beneficios en los próximos años. Se prevé que para el año 2025, el mercado mundial de estos compuestos naturales supere los 4 140 millones de USD en ingresos (Bulgari *et al.*, 2019).

Además de sus funciones como reguladores del metabolismo primario y secundario, se ha descubierto que las SH tienen efectos beneficiosos en la atenuación del estrés ambiental en las plantas. Los estudios de Canellas *et al.* (2015), du Jardin (2015), Van Oosten *et al.* (2017) y Veobides-Amador *et al.* (2018) han destacado la capacidad de las SH para mitigar los impactos negativos del déficit hídrico del suelo, la salinización y la exposición a temperaturas subóptimas, lo que se traduce en una mejora del rendimiento y la productividad de las plantas.

Un ejemplo es la aplicación foliar de ácido húmico (AH) a plantas de pimiento (*Cap-sicum annuum* L.) en condiciones de alta salinidad (100 mM NaCl). Kaya *et al.* (2018) informaron que la aplicación foliar de AH mejoró la tolerancia de la planta al estrés salino. Esto se observó a través de varios cambios fisiológicos y bioquímicos en las plantas. La aplicación de AH produjo un aumento de la biomasa vegetal, del contenido de clorofila y prolina, y de la actividad de enzimas antioxidantes como la peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa. Estos cambios indican una mayor capacidad de las plantas para hacer frente al estrés oxidativo inducido por la salinidad, lo que conduce a un mejor crecimiento y productividad de las plantas. Sometidas a estrés por sequía, las plántulas de maíz muestran un mayor crecimiento y respuestas fisiológicas tras la aplicación de AH. Esto incluye un aumento del contenido de pigmentos fotosintéticos, del contenido relativo de agua, de la longitud de la raíz y del brote, y del diámetro del metaxilema de la raíz. (Bijanzadeh *et al.*, 2019). En arroz que experimenta condiciones de déficit hídrico, la aplicación de AH a través de las raíces conduce a una elevación del contenido de prolina y de la actividad antioxidante, al tiempo que reduce los niveles de H_2O_2 (García *et al.*, 2012). Se han comunicado resultados similares para la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Khodadadi *et al.*, 2020) y el tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

A pesar de las pruebas de la acción protectora de las SH en plantas cultivadas en condiciones de estrés, así como de sus efectos bioestimulantes, quedan muchas preguntas

sin respuesta. Por esta razón, futuras investigaciones deberían considerar los efectos protectores contra tipos abióticos de estrés utilizando productos húmicos extraídos de fuentes baratas y altamente disponibles (estiércoles, residuos orgánicos domésticos, composta y vermicomposta), pulverizados tanto por vía foliar como radicular para cultivar plantas de interés agrícola, incluyendo las etapas de semillero, vivero y campo abierto. Del mismo modo, el desarrollo de formulaciones y productos debe validarse en condiciones de cultivo comercial, antes de ponerlos en el mercado a disposición de los agricultores.

NECESIDADES DE INVESTIGACIÓN Y LAGUNAS DE CONOCIMIENTO

El estudio de las HS ha experimentado continuos avances, con numerosas publicaciones que contribuyen a nuestra comprensión de sus propiedades y aplicaciones. Varios estudios notables en la literatura han contribuido significativamente a este campo. Entre ellos se encuentran los trabajos de Piccolo *et al.* (2016), García *et al.* (2016), García *et al.* (2019), Nardi *et al.* (2017), Nardi *et al.* (2021), y Olaetxea *et al.* (2018). Estas publicaciones han arrojado luz sobre diversos aspectos de las SH, como su estructura, funciones y efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. De hecho, muchos estudios sobre las SH se han centrado principalmente en los aspectos químicos, con el objetivo de dilucidar su estructura, el proceso de formación y la relación entre estructura, propiedades y funciones. Estas investigaciones han aportado valiosos conocimientos sobre la compleja naturaleza de los compuestos húmicos y sus posibles vías de acción. Los conocimientos adquiridos gracias a estos estudios han contribuido significativamente a nuestra comprensión del papel de las SH en el suelo y en los sistemas vegetales.

Sin embargo, es importante reconocer que la aplicación de SH en condiciones controladas de laboratorio o invernadero puede presentar limitaciones a la hora de comprender sus efectos en condiciones reales de campo abierto. Las condiciones controladas permiten a los investigadores aislar y estudiar variables específicas, pero pueden no representar plenamente las complejidades e interacciones que se dan en los entornos naturales. En este contexto, los estudios diseñados en condiciones de laboratorio consideran el efecto de las SH sólo entre los 30 y 45 días (fase vegetativa), por lo que sólo se analizan las fases iniciales de los cultivos, cuando en condiciones reales de campo abierto, la mayoría de los cultivos superan los 4 meses. La práctica actual de evaluar la aplicación de SH a dosis específicas y en condiciones controladas, centrándose principalmente en las primeras fases de crecimiento del cultivo, presenta limitaciones en cuanto a la comprensión de la eficacia de estas tasas de aplicación en condiciones de campo abierto. Como resultado, estas investigaciones, aunque tienen como objetivo demostrar el impacto del producto en la calidad, la fisiología, la morfología y el rendimiento de los cultivos, a menudo no extienden sus evaluaciones a las fases posteriores del desarrollo de los cultivos.

Las condiciones de campo abierto introducen multitud de factores que pueden influir significativamente en la eficacia de la aplicación de SH, como la interacción de múltiples tensiones, las condiciones climáticas variables y la dinámica cambiante del suelo.

Por lo tanto, es necesario ampliar el alcance de la investigación para abarcar todo el ciclo del cultivo y reproducir con mayor precisión las condiciones de campo.

Esta discrepancia entre los resultados obtenidos en condiciones controladas y la aplicación de SH en condiciones de campo abierto pone de manifiesto una importante laguna en la investigación. Plantea dudas sobre si los mismos resultados observados en entornos controlados pueden reproducirse cuando se aplican SH en las condiciones complejas y dinámicas de la agricultura a campo abierto, donde los cultivos están expuestos a múltiples tensiones simultáneas.

En el mercado agrícola, existen actualmente varios bioproductos naturales destinados a mejorar todo el ciclo vegetativo de los cultivos, aumentar el rendimiento agrícola y mitigar condiciones específicas como el estrés hídrico y la salinidad. Estos productos están diseñados para hacer frente a los retos a los que se enfrentan los cultivos a lo largo de sus etapas de crecimiento, proporcionando un apoyo integral y promoviendo la salud y la productividad general de las plantas.

De forma similar, la aplicación de SH en los cultivos apunta a objetivos parecidos. Aplicando SH en condiciones de campo abierto, el objetivo es mejorar la resistencia y adaptabilidad de los cultivos a diversos tipos de estrés. Las SH tienen el potencial de mejorar la absorción de nutrientes, potenciar el desarrollo de las raíces, estimular el crecimiento de las plantas y modular sus respuestas a los desafíos medioambientales. Sin embargo, para aprovechar plenamente los beneficios potenciales de las SH en la agricultura a campo abierto, es necesario seguir investigando. Deberían realizarse ensayos de campo para evaluar la eficacia de las SH en escenarios agrícolas reales, en los que los cultivos están expuestos a múltiples estreses simultáneamente. Estos ensayos deben tener en cuenta diferentes especies de cultivos, tipos de suelo, condiciones climáticas y prácticas agronómicas.

Mediante la realización de estudios de campo, los investigadores pueden evaluar el rendimiento de las SH en diversos contextos agrícolas y determinar su eficacia para aumentar el rendimiento agrícola y mitigar el estrés. Estos estudios aportarían información valiosa sobre las aplicaciones prácticas de las HS y su potencial para contribuir a una agricultura sostenible y resistente.

CONCLUSIÓN

Las sustancias húmicas tienen una estructura compleja caracterizada por una gran variabilidad de grupos funcionales y la presencia de pequeñas moléculas heterogéneas que interactúan mediante enlaces débiles. Estos compuestos ofrecen una amplia gama de beneficios cuando se aplican a las plantas. En particular, ayudan a mitigar los efectos adversos causados por el estrés abiótico y estimulan el crecimiento y la productividad de las plantas. Aunque los mecanismos exactos de acción todavía se están estudiando ampliamente y siguen siendo un tema de debate en la literatura científica, varios esfuerzos de investigación se han centrado en comprender la relación entre la estructura, las propiedades y las funciones de las sustancias húmicas. Esto ha llevado a dilucidar posibles mecanismos, como su actividad similar a la de las auxinas, que explican sus efectos bioestimulantes.

Los compuestos húmicos han demostrado la capacidad de modular el metabolismo secundario, lo que conduce a la estimulación de complejos enzimáticos antioxidantes en condiciones de estrés hídrico. Esta acción sobre la fisiología vegetal sugiere que las sustancias húmicas podrían constituir una alternativa viable y respetuosa con el medio ambiente para mitigar las consecuencias del cambio climático. En efecto, pueden mejorar las características de las plantas cultivadas en condiciones desfavorables. A medida que avanza la investigación, se conocerá mejor la eficacia de los productos húmicos en condiciones de campo, las dosis óptimas de aplicación y la capacidad de diferenciar los productos auténticos de los fraudulentos. Esta mayor comprensión mejorará aún más la utilización de los productos húmicos con el paso del tiempo. En general, la compleja estructura y las diversas funcionalidades de las sustancias húmicas las convierten en valiosos activos en la agricultura y la fitología. Su potencial para aliviar los efectos del estrés abiótico y promover el crecimiento de las plantas es prometedor para las prácticas agrícolas sostenibles frente al cambio climático. La investigación y exploración continuas de los compuestos húmicos allanarán el camino para su uso e integración óptimos en los sistemas agrícolas.

AGRADECIMIENTO

RHC agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) la inestimable beca de doctorado (615819), que ha sido decisiva para apoyar esta labor de investigación.

REFERENCIAS

- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55 (1): 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Asli S, Neumann PM. 2010. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant and Soil* 336 (1–2): 313–336. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0483-2>
- Balmori DM, Domínguez CYA, Carreras CR, Rebatos SM, Farías LBP, Izquierdo FG, García CA. 2019. Foliar application of humic liquid extract from vermicompost improves garlic (*Allium sativum* L.) production and fruit quality. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 8 (1): 103–112. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-0279-1>
- Bayat H, Shafie F, Aminifard MH, Daghighi S. 2021. Comparative effects of humic and fulvic acids as biostimulants on growth, antioxidant activity and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Scientia Horticulturae* 279: 109912 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109912>
- Bhat SA, Singh J, Vig AP. 2017. Instrumental characterization of organic wastes for evaluation of vermicompost maturity. *Journal of Analytical Science and Technology* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s40543-017-0112-2>
- Bijanzadeh E, Naderi R, Egan TP. 2019. Exogenous application of humic acid and salicylic acid to alleviate seedling drought stress in two corn (*Zea mays* L.) hybrids. *Journal of Plant Nutrition* 42 (13): 1483–1495. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1617312>
- Bondareva L, Kudryasheva N. 2021. Direct and indirect detoxification effects of humic substances. *Agronomy* 11 (2): 198. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020198>
- Bulgari R, Franzoni G, Ferrante A. 2019. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy* 9 (6): 306–33. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- Canellas LP, Dantas DJ, Aguiar NO, Peres LEP, Zsogon A, Olivares FL, Dobbss LB, Façanha AR, Nebbioso A, Piccolo A. 2011. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic

- components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology* 159 (2): 202–211. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00487.x>
- Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Jones DL, Nebbioso A, Mazzei P. 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196: 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130 (4): 1951–1957. <https://doi.org/10.1104/pp.007088>
- Canellas LP, Olivares FL. 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>
- Canellas LP, Piccolo A, Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, Façanha AR. 2010. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* 78 (4): 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.018>
- Canellas LP, Xavier Velloso AC, de Araújo Santos G. 2005. Modelos estruturais de substâncias húmicas. In Canellas LP, de Araújo Santos G. (eds). *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias: Campos dos Goytacazes, Brazil. 53 p.
- Caradonia F, Battaglia V, Righi L, Pascali G, La Torre A. 2019. Plant biostimulant regulatory framework: prospects in Europe and current situation at international level. *Journal of Plant Growth Regulation* 38 (2): 438–448. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9853-4>
- Carillo P, Colla G, Fusco GM, Dell'Aversana E, El-Nakhel C, Giordano M, Roupheal Y. 2019. Morphological and physiological responses induced by protein hydrolysate-based biostimulant and nitrogen rates in greenhouse spinach. *Agronomy* 9 (8): 450. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080450>
- Carvajal-Campos P, Jiménez VM. 2021. Ingeniería genética contra estrés abiótico en cultivos neotropicales: osmolitos, factores de transcripción y CRISPR/Cas9. *Revista Colombiana de Biotecnología* 23 (2): 47–66. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n2.88487>
- Chen Y, De Nobili M, Aviad T. 2004. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In Magdoff F, Weil RR (eds.). *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp: 103–129. <https://doi.org/10.1201/9780203496374>
- Drobek M, Fraç M, Cybulska J. 2019. Plant biostimulants: Importance of the quality and yield of horticultural crops and the improvement of plant tolerance to abiotic stress—A Review. *Agronomy* 9 (6): 335. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060335>
- du Jardin P. 2015. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196: 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Fariás LP, Balmori DM, Izquierdo FG, Rodríguez AF, García AC, Torres JPM. 2020. Plasma membrane alterations in *Phaseolus vulgaris* L. variety CC-25-9-N induced by metals. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 29 (2): 53–63.
- Galbán-Méndez JM, Martínez-Balmori D, González-Viera D. 2021. Efecto de extractos de sustancias húmicas en la germinación y el crecimiento de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.), cv. INCA LP-5. *Cultivos Tropicales* 42 (1): e05.
- García AC, Berbara RLL, Portuondo Fariás L, Izquierdo FG, Hernández OL, Campos RH, Castro RN. 2012. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *African Journal of Biotechnology* 11 (13): 3125–3134. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1960>
- García AC, de Souza LGA, Pereira MG, Castro RN, García-Mina JM, Zonta E, Berbara RLL. 2016. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific Reports* 6 (1): 20798. <https://doi.org/10.1038/srep20798>
- García AC, van Tol de Castro TA, Santos LA, Tavares OCH, Castro RN, Berbara RLL, García-Mina, JM. 2019. Structure–property–function relationship of humic substances in modulating the root growth of plants: a review. *Journal of Environmental Quality* 48 (6): 1622–1632. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0027>

- Gerke J. 2018. Concepts and misconceptions of humic substances as the stable part of soil organic matter: A review. *Agronomy* 8 (5): 76. <https://doi.org/10.3390/agronomy8050076>
- Hassan SM, Ashour M, Soliman AA, Hassani HA, Alsanie WF, Gaber A, Elshobary ME. 2021. The potential of a new commercial seaweed extract in stimulating morpho-agronomic and bioactive properties of (*Eruca vesicaria* L.) Cav. *Sustainability* 13 (8): 4485. <https://doi.org/10.3390/su13084485>
- Hayes MH, Swift RS. 2018. An appreciation of the contribution of Frank Stevenson to the advancement of studies of soil organic matter and humic substances. *Journal of Soils and Sediments* 18 (4): 1212–1231. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1636-6>
- Hernández OL, Calderín A, Huelva R, Martínez D, Guridi F, Aguiar NO. 2015. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for Sustainable Development* 35 (1): 225–32. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0221-x>
- Hernández-Campos R, Robles C, Calderin Garcia A. 2021. Humic acids effects on plant growth and protection against water stress in selected native maize populations from Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 44 (4): 561–569.
- Ibarra-Villareal AL, Gándara-Ledezma A, Godoy-Flores AD, Herrera-Sepúlveda A, Díaz-Rodríguez AM, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2021. Especies de *Bacillus* tolerantes a la sal como una estrategia prometedor para mitigar el estrés por salinidad en trigo (*Triticum turgidum* subsp. durum). *Journal of Arid Environments* 186: 104399. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>
- Jindo K, Canellas LP, Albacete A, Figueiredo dos Santos L, Frinhani Rocha RL, Carvalho Baia D and Olivares FL. 2020. Interaction between humic substances and plant hormones for phosphorous acquisition. *Agronomy* 10 (5): 640. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050640>
- Kaya C, Akram NA, Ashraf M, Sonmez O. 2018. Exogenous application of humic acid mitigates salinity stress in maize (*Zea mays* L.) plants by improving some key physico-biochemical attributes. *Cereal Research Communications* 46 (1): 67–78. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.064>
- Khodadadi S, Chegini MA, Soltani A, Ajam Norouzi H, Sadeghzadeh Hemayati S. 2020. Influence of foliar-applied humic acid and some key growth regulators on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under drought stress: Antioxidant defense system, photosynthetic characteristics and sugar yield. *Sugar Tech* 22 (5): 765–772. <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00839-6>
- Kulikova NA, Abroskin DP, Badun GA, Chernysheva MG, Korobkov VI, Beer AS, Perminova IV. 2016. Label distribution in tissues of wheat seedlings cultivated with tritium-labeled Leonardite humic acid. *Scientific Reports* 6 (1): 28869. <https://doi.org/10.1038/srep28869>
- Liliane TN, Charles MS. 2020. Factors affecting yield of crops. In Amanullah. (ed.). *Agronomy. Climate Change and Food Security*. IntechOpen: London, UK. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90672>
- Malhi GS, Kaur M, Kaushik P. 2021. Impact of climate change on agriculture and its mitigation strategies: A review. *Sustainability* 13 (3): 1318. <https://doi.org/10.3390/su13031318>
- Matías AM, Robles C, Cuevas LH. 2021. Hongos micorrizógenos arbusculares asociados con el cultivo de maíz en regiones con sequía en Oaxaca. *Agrociencia* 55 (1): 19–35. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i1.2345>
- Muscolo A, Sidari M, Attina` E, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S. 2007. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal* 71 (1): 75–85. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0055>
- Nardi S, Ertani A, Francioso O. 2017. Soil-root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 180 (1): 5–13. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>
- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry* 34 (11): 1527–1536. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00174-8)
- Nardi S, Schiavon M, and Francioso O. 2021. Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. *Molecules* 26 (8): 2256. <https://doi.org/10.3390/molecules26082256>

- Nebbioso A, Piccolo A. 2012. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta* 720: 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.027>
- Olaetxea M, De Hita D, García CA, Fuentes M, Baigorri R, Mora V, García-Mina JM. 2018. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root-and shoot-growth. *Applied Soil Ecology* 123: 521–537. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.007>
- Olaetxea M, Mora V, García AC, Santos LA, Baigorri R, Fuentes M, Garcia-Mina JM. 2016. Root-shoot signaling crosstalk involved in the shoot growth promoting action of rhizospheric humic acids. *Plant Signaling and Behavior* 11: 1161878. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1161878>
- Piccolo A. 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy* 75: 57–134. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)75003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)75003-7)
- Piccolo A. 2016. In memoriam Prof. F. J. Stevenson and the question of humic substances in soil. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 3: 23. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0076-2>
- Pinos NQ, Louro Barbara RL, Elias SS, van Tol de Castro TA, García AC. 2019. Combination of humic substances and arbuscular mycorrhizal fungi affecting corn plant growth. *Journal of Environmental Quality* 48 (6): 1594–1604. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0035>
- Povero G, Mejia JF, Di Tommaso D, Piaggese A, Warrior PA. 2016. Systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. *Frontiers in Plant Science* 7: 435. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00435>
- Rouphael Y, Colla G. 2020. Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science* 11: 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
- Rouphael Y, Kyriacou MC, Colla G. 2018. Vegetable grafting: A toolbox for securing yield stability under multiple stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 8: 2255. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02255>
- Schulten HR, Schnitzer M. 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften* 80 (1): 29–30. <https://doi.org/10.1007/BF01139754>
- Senn TL, Kingman, AR. 1973. A review of humus and humic acids. Horticulture Department Research Series No. 165, The South Carolina Agricultural Experiment Station. Clemson University: Clemson, South Carolina, USA. 5 p.
- Stevenson FJ. 1994. Humus chemistry. Genesis, composition, reaction (Second edition). John Wiley & Sons: Madison, WI, USA. 512 p.
- Sun X, Chen H, Wang P, Chen F, Yuan L, Mi G. 2020. Low nitrogen induces root elongation via auxin-induced acid growth and auxin-regulated target of rapamycin (TOR) pathway in maize. *Journal of Plant Physiology* 254: 153281. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153281>
- Tavares OCH, Santos LA, Ferreira LM, Sperandio MVL, da Rocha JG, García AC, Fernandes MS. 2017. Humic acid differentially improves nitrate kinetics under low-and high-affinity systems and alters the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and nitrate transporters in rice. *Annals of Applied Biology* 170 (1): 89–103. <https://doi.org/10.1111/aab.12317>
- Vaccaro S, Ertani A, Nebbioso A, Muscolo A, Quaggiotti S, Piccolo A, Nardi S. 2015. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-015-0033-5>
- Van Oosten MJ, Pepe O, De Pascale S, Silletti S, Maggio A. 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Veobides-Amador H, Guridi-Izquierdo F, Vázquez-Padrón V. 2018. Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental. *Cultivos Tropicales* 39 (4): 102–109.
- Yang F, Antonietti M. 2020. Artificial humic acids: sustainable materials against climate change. *Advanced Science* 7 (5): 1902992. <https://doi.org/10.1002/advs.201902992>

- Yoon HY, Jeong HJ, Cha JY, Choi M, Jang KS, Kim WY, Jeon JR. 2020. Structural variation of humic-like substances and its impact on plant stimulation: Implication for structure-function relationship of soil organic matters. *Science of the Total Environment* 725: 138409. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138409>
- Zakeel MCM, Safeena MIS. 2019. Biofilmed biofertilizer for sustainable agriculture. *In* Ansari RA, Mahmood I. (eds.). *Plant health under biotic stress*. Springer: Heidelberg, Germany, pp: 65–82. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_3
- Zhang H, Zhu J, Gong Z. 2022. Abiotic stress responses in plants. *Nature Review in Genetics* 23 (2): 104–119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>

Agrociencia



TOXICITY OF *Argemone mexicana* (L.) EXTRACTS AND IMIDACLOPRID ON *Chrysoperla carnea* (Stephens)

Carlos Serratos-Tejeda¹, Arturo Huerta-de La Peña^{1*},
Juan Antonio Villanueva-Jiménez², Agustín Aragón-García³

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Boulevard Forjadores No. 205, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla, Mexico. C. P. 72760.

² Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, Mexico. C. P. 94953.

³ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias, Centro de Agroecología. Edificio VAL1, Carretera a San Baltazar km 1.7, San Pedro Zacachimalpa, Puebla, Mexico. C. P. 72063.

* Author for correspondence: arturohp@colpos.mx

ABSTRACT

In sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) cultivation, the main pest is the sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari* Zehntner (Hemiptera: Aphididae)). The insecticide imidacloprid is frequently used to control this insect, and in some cases, it is complemented with the release of lacewings of the species *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae). The insecticide has been shown to be harmful to non-target insects, such as the natural enemies of this aphid, so it is necessary to find other less harmful products. The objective of this study was to evaluate the toxicity of aqueous and oily extracts of chicalote (*Argemone mexicana* L.) on *C. carnea* and to contrast it with that of imidacloprid, with the hypothesis that extracts of *A. mexicana* applied to the developmental stages of *C. carnea* generate less mortality on the predator than imidacloprid. The aqueous and oily extracts had a concentration of 30 g L⁻¹. For imidacloprid, the recommended dose for sugarcane aphid control (0.35 g L⁻¹) was used. Mortality and the treatments effect were evaluated by exposure methods: T1) topical on larvae, T2) egg immersion, T3) treated *Sitotroga cerealella* eggs, and T4) liquid ingestion in adults. Mortality, hatching and emergence variables were analyzed with a one-way ANOVA, followed by Tukey's comparison of means ($p \leq 0.05$). Treatments were classified according to the toxicity levels proposed by the International Organization for Biological Control. The aqueous and oily extracts were in toxicity class 1 for *C. carnea*, except in eggs treated with the oily extract (class 4). Imidacloprid was classified in class 4 when applied topically and by ingestion in adults and in class 2 in ingestion of treated *S. cerealella* eggs. In general, extracts of *A. mexicana* could be used as selective insecticides, while imidacloprid can be considered incompatible with releases of this predator.

Keywords: *Melanaphis sacchari*, *Sitotroga cerealella*, *Sorghum bicolor*, side effects.

INTRODUCTION

Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is one of the main crops in Puebla, Mexico, and a raw material for the animal feed industry (SAGARPA, 2017). Several pests affect

Citation: Serratos-Tejeda C, Huerta-de La Peña A, Villanueva-Jiménez JA, Aragón-García A. 2023. Toxicity of *Argemone mexicana* (L.) extracts and imidacloprid on *Chrysoperla carnea* (Stephens). *Agrociencia* 57(5): 1046-1070. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2494

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: August 03, 2021.

Approved: May 16, 2023.

Published in Agrociencia:
July 27, 2023.

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



sorghum; however, the sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari* Zehntner (Hemiptera: Aphididae)) is the one to which the greatest control efforts are devoted (INIFAP, 2015). One of the main insecticides used against this aphid is imidacloprid (SAGARPA, 2017). As an alternative control measure, releases of the lacewing species *Chrysoperla carnea* Stephens are conducted (Neuroptera: Chrysopidae), a beneficial, polyphagous and cosmopolitan insect, considered one of the most important predators of *M. sacchari* (Delgado-Ramírez *et al.*, 2016). This neuropteran is present in agricultural systems treated with synthetic chemical insecticides, which can affect its life cycle (Haramboure, 2017). However, both imidacloprid application and lacewing release represent the main recommendations of SAGARPA (2017) for the control of *M. sacchari* in Mexico. An alternative to the use of synthetic pesticides are insecticides of botanical origin that are effective against insect pests in different crops, are economical, biodegradable, have varied modes of action and low toxicity to non-target organisms (Lengai *et al.*, 2020). Chicalote (*Argemone mexicana* L.) is a species of the Papaveraceae family, widely distributed in tropical America. Its extracts are used for their toxic properties in insects due to the presence of alkaloids such as: berberine, palmatine, sanguinarine, protoberberine, benzophenanthridine, benzyloisoquinoline, and protopine (Singh *et al.*, 2010; Brahmachari *et al.*, 2013) and other secondary metabolites such as glycosides, tannins, and saponins (Upreti *et al.*, 1991). Prior to the incorporation of a pesticide, either synthetic or of plant origin, into an integrated pest management program, it is necessary to determine its secondary effects on non-target insects in order to generate the guidelines to ensure the conservation of natural enemies (Alegre *et al.*, 2017b). The objective of this research was to compare the toxicity of *A. mexicana* aqueous and oily extracts on different stages of *C. carnea* under laboratory conditions to the toxicity of imidacloprid. The hypothesis was that extracts of *A. mexicana* applied to different stages of development of *C. carnea* would result in lower mortality than the insecticide imidacloprid.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Adults of *C. carnea* collected in horticultural plots in the municipality of Los Reyes de Juárez, state of Puebla, Mexico (18° 55' 36" N, 97° 47' 54" W, 2197 m mean altitude), were transferred to the Entomology Laboratory of the Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, to establish a brood stock. Once oviposition was initiated, eggs were extracted and larvae were individualized in brood units. The food supplied to the larvae consisted of *Sitotroga cerealella* (Olivier) eggs *ad libitum*, biological material provided by the Saltillo Reproduction Center of Beneficial Organisms of the State Plant Health Committee of Coahuila, Mexico. Adult *C. carnea* were fed with artificial diet proposed by Vogt *et al.* (2000), which contains 15 mL condensed milk, one egg, 30 g honey, 20 g fructose, 50 g wheat germ, 30 g brewer's yeast, and 45 mL distilled water. Furthermore, they were provided with drinking water in a 10 mL beaker and a cotton

swab was placed on the surface to prevent drowning of the individuals. Insects were maintained in a bioclimatic chamber at a temperature of 25 ± 2 °C, relative humidity of 70 ± 10 %, and 12 h light/dark photoperiod.

Treatments

Plant collection and extract production

In spring 2019, at the locality of Libertad Tecola, Puebla ($18^{\circ} 52' 53.86''$ N, $98^{\circ} 10' 56.29''$ W, 2145 m altitude), whole plants of *A. mexicana* in flowering stage were collected. The plant stems, flowers and seeds were used, according to the methodology proposed by Pérez-Torres *et al.* (2017). Each plant was washed several times to remove dust particles, and then dried in the shade at room temperature (27 ± 2 °C) for 20 days. Once dried, these parts were cut into small pieces, mechanically pulverized and sieved through a plastic strainer to obtain a fine powder. The seeds were crushed using a mortar and pestle. To obtain the aqueous extract, 30 g of crushed dry matter were mixed in 1 L of distilled water; the mixture was left to stand for 24 h and filtered through filter paper. The same procedure was followed to obtain the oily extract, but using Maxima Premium® edible vegetable oil instead of water. Both extractions were performed in the shade at room temperature according to the protocol described by Aragón-García *et al.* (2012). In this study, it was decided to use both aqueous and oily extracts to determine any difference when testing the two solvents.

Insecticide formulation and dosage

A third treatment was based on imidacloprid (Dynasty 350 SC®, 350 g i. a. L⁻¹) at a dose of 0.35 g L⁻¹ equivalent to 200 mL of commercial product in 200 L of water per ha. This concentration corresponds to that recommended by SAGARPA (2017) for the control of *M. sacchari* in sorghum crop.

In each of the bioassays, a control with potable water application was included.

Application Methods

Topical application

Using a 0.1–2.5 µL Research® manual micropipette (Eppendorf, Hamburg, Germany), 0.5 µL of the previously described treatments were applied to third stage (L3) larvae of *C. carnea*. To avoid cannibalism, treated larvae were individually placed in 3 cm diameter and 1 cm height plastic boxes with perforated lids (1 cm diameter) and sealed with Micropore® tape for ventilation. Each treatment consisted of 10 larvae with four replicates. Mortality and absence of body movement of larvae when stimulated with an entomological pin for 15 s were recorded at 48 and 72 h after treatment application (Alegre *et al.*, 2017a). Likewise, the percentage of treated larvae that pupated and the number of adults that emerged was quantified.

Egg immersion in treatments

Segments of cloth gauze containing sixty 24 h-old *C. carnea* eggs were immersed for 10 s in 30 mL of the treatment to be evaluated, contained in a glass Petri dish (90 mm diameter). Subsequently, the gauze with the eggs was placed on absorbent paper for 10 min to remove excess solution and facilitate drying at room temperature. Once the gauze with the *C. carnea* eggs had dried, they were placed in Petri dishes and kept in the bioclimatic chamber under the same conditions. Each fabric gauze segment was considered one of four replicates. The percentage of larval hatching was recorded at 48, 72, and 96 h after the treatments were applied. The larvae were fed *S. cerealella* eggs *ad libitum*. To evaluate the sublethal effect, the percentage of adult emergence was recorded.

Ingestion in larvae

The 24 h-old eggs of *Sitotroga cerealella* used in this test were obtained from a laboratory-kept brood of the insect; 3 g of this material were placed in a fine cloth mesh and immersed for 10 s in 30 mL of the treatments. Treated eggs were dried on filter paper and subsequently fed to newly emerged *C. carnea* larvae until pupation. To avoid degradation of the active principles of the extracts, the treated food was replaced every 48 h. To prevent cannibalism, the larvae were placed individually in plastic boxes 3 cm in diameter and 1 cm high. The treatments consisted of 15 *C. carnea* first instar larvae (L1) with five replicates. The plastic boxes were checked every 48 h to record the mortality obtained at each stage. Mortality was determined by observing exuviae using a Motic[®] microscope model SMZ 168 (Vancouver, Canada); once the change was detected, dead individuals per stage were counted.

Ingestion in adults of *Chrysoperla carnea*

A pair of predator adults less than 24 h old were placed in a plastic container 7.5 cm high and 11.5 cm in diameter, with a 10 cm diameter opening covered with cloth mesh. The concentration of the treatments was 30 g L⁻¹ of water for *A. mexicana* extracts and 0.35 g L⁻¹ for imidacloprid. Adult drinkers were 20 mL plastic containers with a sponge cloth segment inserted in the center of the lid, allowing the insects access to the treatment. Furthermore, they were fed the artificial adult diet proposed by Vogt *et al.* (2000), which was placed on the side of the containers with a spatula. Each plastic container with a pair of individuals was considered an experimental unit and each treatment consisted of eight replicates. Mortality was assessed at 24, 48 and 72 h after initiation of the trial.

The toxicity of the treatments on *C. carnea* was classified according to the recommended scale of the International Organization for Biological Control, West Palearctic Regional Section (IOBC) for tests carried out under laboratory conditions (Hassan, 1992): toxicity class 1, the treatment was considered harmless if it caused less than 30 % mortality; toxicity class 2, slightly harmful when causing 30 to 79 % mortality; toxicity class 3, moderately harmful, with 80 to 99 % mortality; and toxicity class 4, harmful, when causing more than 99 % mortality.

Statistical analysis

In all cases, mortality and larval hatching and adult emergence data at 48, 72 or 96 h after application of treatments as appropriate were analyzed with a one-way ANOVA, followed by Tukey's comparison of means ($p \leq 0.05$). All analyses were performed with Statgraphics Centurion XVI statistical software (Statgraphics Technologies, 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

Topical application

Mortality of third stage larvae (L3) of *C. carnea* recorded at 48 and 72 h did not differ between individuals treated with aqueous and oily extract of *A. mexicana* and the control (Table 1). In contrast, the imidacloprid-based treatment showed higher mortality than the control and the rest of the treatments from 48 h of evaluation and reached 100 % mortality at 72 h of exposure. The percentage of adult emergence from topically treated larvae was not different between the aqueous and oily *A. mexicana* extracts and the control.

Table 1. Mortality of third stage larvae of *Chrysoperla carnea* treated with *Argemone mexicana* extracts and imidacloprid by topical application.

| Treatment | Mortality in larvae (% ± SE) at 48 and 72 h | | Adult emergence (% ± EE) |
|-----------------|---|---------------|-----------------------------|
| | 48 h | 72 h | |
| Control | 0.0 ± 0.0 a | 0.0 ± 0.0 a | 90.0 ± 8.1 a |
| Aqueous extract | 0.0 ± 0.0 a | 5.0 ± 5.7 a | 72.5 ± 15.0 a |
| Oily extract | 0.0 ± 0.0 a | 0.0 ± 0.0 a | 65.0 ± 33.1 a |
| Imidacloprid | 90.0 ± 4.0 b | 100.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| Statistics | F = 486.0, gl = 3, p = 0.00 | | F = 17.79, gl = 3, p = 0.00 |

Means with different literals indicate significant statistical differences according to the Tukey test ($p \leq 0.05$). EE: Standard error.

A high percentage of alkaloids and other secondary metabolites with toxic effects has been documented in *A. mexicana* (Brahmachari *et al.*, 2013). Extracts based on this plant have shown insecticidal effect on adults and nymphs of *Bemisia tabaci* Gennadius (Martínez-Tomás *et al.*, 2015) as well as a larvicidal and developmental inhibitory effect on *Culex quinquefasciatus* Say (Granados-Echegoyen *et al.*, 2016), and antifeedant on *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Aragón-García *et al.*, 2019). However, in our experiment, mortality of L3 larvae treated with aqueous and oily extracts of *Argemone mexicana* was less than 5%. Adult emergence percentages of 72.5 and 65%, respectively, were observed. Similar mortality (3%) of *C. carnea* larvae was reported by direct contact with the botanical insecticide Biodie®, formulated from plant extracts of *A. mexicana*, *Berberis* sp., *Ricinus communis* L., and terthienyl (Luna-Cruz *et al.*, 2018), indicating that lacewing larvae may present some tolerance to chicalote-based treatments.

The mortality recorded in third stage larvae of *C. carnea* (100 %) treated with imidacloprid, showed its toxicity in this neuropteran's stage of development, due to which it was not possible to evaluate the percentage of adult emergence. This same effect was reported by Huerta *et al.* (2003), who found that imidacloprid is highly toxic to third stage *C. carnea* and inhibits adult emergence.

Egg immersion in treatments

The hatching percentage of *Chrysoperla carnea* larvae in the control group and the aqueous extract of *A. mexicana* was not different (Table 2), suggesting that the extracts have no toxic effect at this early stage of development. The eggs of the control that did not hatch showed natural mortality, as they remained green and did not develop the embryo, which is a common phenomenon given the experience obtained in rearing the predator in the laboratory. The effect of exposure of eggs of individuals of the genus *Chrysoperla* to plant extracts based on mullein (*Lonchocarpus nicou* (Aubl.) D.C.) and neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) has been reported by authors such as Iannacone and Lamas (2002), who found that the two botanical products did not affect the percentage of egg hatching and that at all doses evaluated this was higher than 70 %. This fact could be attributed to the natural tolerance of the species that confers resistance to botanical insecticides (Grafton-Cardwell and Hoy, 1987).

Table 2. Hatching percentage of *Chrysoperla carnea* eggs treated with *Argemone mexicana* extracts and imidacloprid by immersion.

| Treatment | Hatching at 72 and 96 h (% ± EE) | |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------|
| | 72 h | 96 h |
| Control | 57.1 ± 3.3 a | 81.6 ± 3.3 a |
| Aqueous extract | 59.5 ± 4.4 a | 72.1 ± 7.3 a |
| Oily extract | 0.0 ± 0.0 c | 0.0 ± 0.0 c |
| Imidacloprid | 22.9 ± 9.3 b | 26.6 ± 7.9 b |
| Statistics | F=486.0, gl= 3, p= 0.00 | F=146.0, gl= 3, p= 0.00 |

Means with different literals indicate significant statistical differences according to the Tukey test ($p \leq 0.05$). EE: Standard error.

The data show that the oil extract clearly affected the hatching of *C. carnea* eggs and was statistically different from the rest of the treatments. After the application of this treatment, the presence of a film that permanently and completely covered the eggs was observed. Although there is evidence that the presence of secondary metabolites such as lipophilic saponins in *A. mexicana* (Dénou *et al.*, 2020) have the capacity to affect embryogenesis by modifying cell permeability, inhibiting membrane proteins, and inducing apoptosis (Korchowiec *et al.*, 2015). In the present study, due to the absence of an additional control in which only oil without plant extract was applied, it was not possible to attribute the negative effect on embryogenesis solely to secondary metabolites without ruling out a possible effect of the physicochemical properties of the oil.

Imidacloprid was also found to be toxic to *Chrysoperla carnea* eggs, with a lower cumulative hatching percentage (26.6 %) than the control and the aqueous extract of *A. mexicana*, both at 72 and 96 h after immersion. A similar result of the toxic effect of this insecticide on *C. carnea* eggs has been reported by Ayubi *et al.* (2013), indicating that at a dose of 3.87 µg i. a. L⁻¹ imidacloprid has a lethal effect on this stage of lacewing development.

Ingestion in larvae

No differences were observed in the mortality of larvae of stages L₁ and L₂ of *C. carnea* that consumed eggs of *S. cerealella* treated with *A. mexicana*-based extracts compared to the control, in all cases mortality is less than 11 % except for that recorded in larvae of stage L₃ (Table 3). The effect on mortality of chrysopid larvae exposed to continuous consumption of feed treated with botanical compounds has already been reported. For example, no mortality was found in larvae of *Chrysoperla externa* (Schneider) fed with *S. cerealella* eggs treated with rothethione extracted from barbasco and neem roots at concentrations of 800 and 40 mg i. a. L⁻¹ (Iannacone and Lamas, 2002). In second stage larvae of *C. carnea*, mortality levels of 20 and 35 % were reported in bioassays of consumption of *Planococcus citri* Risso individuals treated with citrus oil (*Citrus* spp.) and neem oil at a sublethal concentration (Bibi *et al.*, 2021).

Table 3. Cumulative mortality in larval stages and percentage of pupation of *Chrysoperla carnea* treated by ingestion of food contaminated with *Argemone mexicana* and imidacloprid extracts.

| Treatment | n | Cumulative mortality by stage (% ± S.E) | | | | | Pupation (% ± EE) |
|-----------------|----|---|----|-------------------------------|----|--------------------------------|--------------------------------|
| | | L ₁ | n | L ₂ | n | L ₃ | |
| Control | | 5.3 ± 2.4 a | 71 | 2.6 ± 2.6 a | 69 | 0.0 ± 0.0 a | 91.9 ± 4.9 A |
| Aqueous extract | 75 | 10.6 ± 3.4 a | 67 | 3.9 ± 1.6 a | 64 | 1.3 ± 1.3 a | 83.9 ± 4.5 a |
| Oily extract | | 7.9 ± 3.8 a | 69 | 1.3 ± 1.3 a | 68 | 13.3 ± 2.1 b | 77.3 ± 4.9 a |
| Imidacloprid | | 49.3 ± 3.4 b | 38 | 9.3 ± 4.5 a | 31 | 19.9 ± 4.2 b | 21.3 ± 2.4 b |
| Statistics | | F = 38.8, gl = 3, p = 0.00 | | F = 1.54, gl = 3, p = 0.24 | | F = 15.46, gl = 3, p = 0.00 | F = 54.70, gl = 3, p = 0.00 |

Means with different literals indicate statistical differences according to the Tukey test ($p \leq 0.05$). EE: standard error.

The mortality percentages of the different larval stages of *C. carnea* that ingested feed treated with imidacloprid differed from those observed in larvae that consumed feed treated with aqueous extract of *A. mexicana* and the control, but not in L₃ larvae that ingested feed treated with oily extract. Although lacewings have developed resistance to a wide range of insecticides (Nordlund *et al.*, 2001), L₃ larvae of lacewings have a higher tolerance to insecticides than L₁ larvae (Liu and Chen, 2000), which differs from the results shown here, since the mortality recorded in the first larval stage was higher (49.3 %) than that observed in the third (19.9 %).

The high susceptibility of lacewing larvae to imidacloprid significantly reduced the percentage of pupation (21.3 %), which is not entirely unexpected. Although neonicotinoid insecticides have been considered as biorational insecticides, this toxicological categorization is highly disputed, mainly due to the high mortality recorded in natural enemies such as *C. carnea* (Cerna *et al.*, 2012).

Ingestion in adults

Mortality rate of *C. carnea* adults that ingested the aqueous extract of *A. mexicana* was not significantly different from that of the control after 72 h of exposure. However, neither treatment differed from the mortality observed in adults ingesting the oily extract, although it cannot be ruled out that mortality occurred as a result of a possible dietary effect. The time of exposure, however, is a critical point to explain this fact. According to observations made during predator rearing, the predator can survive up to 6 days without water by consuming only diet (Table 4).

Table 4. Mortality of adults of *Chrysoperla carnea* treated by ingestion of *Argemone mexicana* and imidacloprid extracts.

| Treatment | Cumulative mortality at 24, 48 and 72 h (% ± SE) | | |
|-----------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| Control | 0.0 ± 0.0 a | 12.5 ± 8.1 a | 12.5 ± 8.1 a |
| Aqueous extract | 0.0 ± 0.0 a | 6.2 ± 6.2 a | 12.5 ± 8.1 a |
| Oily extract | 0.0 ± 0.0 a | 12.5 ± 8.1 a | 43.7 ± 11.3 a |
| Imidacloprid | 75.0 ± 13.3 b | 100.0 ± 0.0 b | 100.0 ± 0.0 b |
| Statistics | = 31.50, gl = 3 <i>p</i> = 0.000 | = 46.59, gl = 3 <i>p</i> = 0.000 | = 25.96, gl = 3 <i>p</i> = 0.000 |

Means with different literals indicate significant statistical differences according to the Tukey test (*p* ≤ 0.05). EE: Standard error.

The effects of botanical compounds on adults of *C. carnea* have been reported by other authors. Medina *et al.* (2005) evaluated the effect of consumption of aqueous extracts of plum (*Trichilia havanensis* Jacq.) at a concentration of 1000 mg i. a. L⁻¹, which showed no toxicity after continuous exposure via ingestion. Similar to this study, *C. carnea* was fed botanical extracts without apparently achieving any effect. The species *A. mexicana* contains a high percentage of alkaloids (Brahmachari *et al.*, 2013), some of them which are benzylisoquinoline alkaloids (ABI), which show toxicity and affect the central nervous system of insects, with a high potential for use as pesticides (Ziegler and Facchini, 2008; Juárez-García *et al.*, 2020). These metabolites have a greater impact on *C. carnea* individuals when they are obtained in an oily form rather than when their base is water.

In adults, the ingestion of aqueous extract of *A. mexicana* caused a mortality similar to that obtained in the control, though both cases were less than 13 %. Although the oil extract of *Argemone mexicana* showed a higher percentage of mortality (43.7 %),

it did not differ significantly from the other botanical treatments, but it did differ significantly from imidacloprid.

The results show that imidacloprid ingestion has a lethal effect on adults of *C. carnea*. In this study, 100 % mortality was recorded after 48 h of exposure. The harmful effect of imidacloprid on other adults of the genus *Chrysoperla* has been reported by authors such as Silva *et al.* (2017) at a dose of 1.05 g L⁻¹ water.

Toxicity of treatments according to IOBC classification under laboratory conditions

The mortality percentage of *A. mexicana* aqueous extract in the different bioassays performed was less than 30 %, so it was classified as harmless (class 1 IOBC). The mortality recorded in the bioassays in which oily extract of *A. mexicana* was applied shows a similar pattern, except for the harmful effect observed in the ingestion of this treatment in adults of *C. carnea* at 72 h of exposure (class 2), and in eggs, where this treatment produces total mortality of this stage of development (class 4) and in adults. Imidacloprid was classified as harmful (class 4) after 72 h when applied topically to L₃ larvae and when consumed by adults. The present study shows that the effect of this neonicotinoid varies depending on the developmental stages of the predator *C. carnea*, as it was less susceptible when applied to eggs (71.9 % mortality, class 2) and when ingested by larvae (78.7 % cumulative mortality, class 2).

CONCLUSIONS

The aqueous extract of *Argemone mexicana* was innocuous for eggs, larvae and adults of *Chrysoperla carnea*. The results suggest that this treatment could be included as part of an integrated pest management (IPM) program.

The oily extract of *A. mexicana* had a significant effect on egg mortality (100 %), so it was deemed harmful for this stage. However, additional bioassays are needed to rule out the possibility that these effects are the result of the activity of secondary metabolites associated with this plant, rather than the effect of the physical properties of the oil *per se* with which this treatment was developed. Additionally, a slightly harmful effect (43.7 % mortality, toxicity class 2 according to IOBC) was observed in adults after 72 h of treatment application. When applied topically and via ingestion on larvae, it was placed in class 1 IOBC as it presented a mortality rate of less than 30 %.

The imidacloprid concentration recommended for sugarcane aphid control in sorghum, was harmful for L₃ larvae and adults 72 h after topical application. Although this same treatment was classified as slightly harmful in eggs and via ingestion in larvae, the recorded mortality percentages of 71.9 and 78.5 %, respectively, suggest a low compatibility of this product with eggs, larvae and adults of the predator.

If the application of imidacloprid and the release of *C. carnea* remain as the first recommendations for the control of *M. sacchari* in sorghum, more bioassays under semi-field and field conditions, as well as tests of sublethal effects, are recommended to determine concentrations of this product that will provide effective control of the aphid with minimal effects on beneficial organisms such as lacewings.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the postgraduate doctoral scholarship awarded to the first author.

REFERENCES

- Alegre A, Bonifaz E, Solange-Lee SE, Iannacone J. 2017a. Sensibilidad de dos biocontroladores *Chrysoperla externa* y *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) frente al extracto acuoso de *Ruta graveolens* (Rutaceae). *The Biologist* 15 (1): 173–180. <https://doi.org/10.24039/rtb2017151152>
- Alegre A, Iannacone J, Carhuapoma M. 2017b. Toxicidad del extracto acuoso, etanólico y hexánico de *Annona muricata*, *Minthostachys mollis*, *Lupinus mutabilis*, y *Chenopodium quinoa* sobre *Tetranychus urticae* y *Chrysoperla externa*. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 33 (3): 273–284. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902017005000705>
- Aragón-García A, Pérez-Torres BC, López-Olguín JF, Damián-Huato MA, Jiménez D, González P. 2012. Estrategia agroecológica para disminuir los daños por plagas en el cultivo de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* L. (Caryophyllales: Amaranthaceae). *Entomología Mexicana* 11: 131–136.
- Aragón-García A, Pérez-Torres BC, Aragón-Sánchez M, Juárez RD, Hernández LMG, Lugo-García GA. 2019. Control de chapulín *Sphenarium purpurascens* Charpertier 1845 (Orthoptera: Pyrgomorphidae) con extractos vegetales, en cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Entomología Mexicana* 6: 75–81.
- Ayubi A, Moravvej G, Karimi J, Jooyandeh A. 2013. Lethal effects of four insecticides on immature stages of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) in laboratory conditions. *Turkish Journal of Entomology* 37 (4): 399–407.
- Bibi R, Ahmad M, Gulzar A, Tariq M. 2021. Effect of profenofos and citrus oil on *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant and *Chrysoperla carnea* Stephens, key predators of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso), under laboratory conditions. *International Journal of Tropical Insect Science* 42: 379–387.
- Brahmachari G, Gorai D, Roy R. 2013. *Argemone mexicana*, chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23 (3): 559–575. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000021>
- Cerna E, Ail C, Landeros J, Sánchez S, Badii M, Aguirre L, Ochoa Y. 2012. Comparación de la toxicidad y selectividad de insecticidas para la plaga *Bactericera cockerelli* y su depredador *Chrysoperla carnea*. *Agrociencia* 46 (8): 783–793.
- Delgado-Ramírez CS, Salas-Araiza MD, Martínez-Jaime OA, Díaz-García JA, Guzmán-Mendoza R, Salazar-Solís E. 2016. Consumo de *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae) por *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) y *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Entomología Agrícola* 3: 369–374.
- Dénou A, Ahmed A, Dafam DG, Yakubu TP, Sanogo R, Diallo D, Alemika TE. 2020. Pharmacognostic, physicochemical and phytochemical investigations on aerial parts of *Argemone mexicana* L. *Research Journal of Pharmacognosy* 7 (3): 15–24. <https://doi.org/10.22127/rjp.2020.220380.1559>
- Grafton-Cardwell EE, Hoy MA. 1987. Intraspecific variability in response to pesticides in the common green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *Hilgardia* 53 (6): 1–32. <https://doi.org/10.3733/hilg.v53n06p032>
- Granados-Echegoyen C, Ortega-Morales BO, Chan-Bacab MJ, Reyes-Estébanez MM, Camacho-Chab JC. 2016. Efecto del extracto etanólico de partes vegetales de *Argemone mexicana* (Papaveraceae) sobre larvas y pupas del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). *Entomología Agrícola* 3: 436–440.
- Haramboure M. 2017. Lethal and sublethal effects after treatment with conventional and biorational insecticides on eggs of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Revista Colombiana de Entomología* 43 (2): 161–166. <https://doi.org/10.25100/socolen.v43i2.5937>
- Hassan SA. 1992. Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: Description of test methods. *IOLB-WPRS Bulletin*: Marseille, France. 186 p.

- Huerta A, Medina P, Castanera P, Viñuela E. 2003. Residual effects of some modern pesticides on *Chrysoperla carnea* (Stephens) adults under laboratory conditions. IOBC WPRS Bulletin 26 (10): 165–170.
- Iannaccone J, Lamas G. 2002. Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 65: 92–101.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2015. El pulgón amarillo, una nueva plaga del sorgo en México, boletín electrónico 1 (16). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Río Bravo, México. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Eventos/2015/BE%20Pulgon%20amarillo,nueva%20plaga%20en%20Mexico.pdf> (Retrieved: May 2019).
- Juárez-García RA, Sanzón-Gómez D, Ramírez-Santoyo LF, Gonzales-Castañeda J. 2020. Revisión: el género *Argemone* (Papaveraceae) y los usos para el control de plagas en el sector agrícola. Ciencia e innovación agroalimentaria de la Universidad de Guanajuato 1 (2): 71–83.
- Korchowiec B, Gorczyca M, Wojszko K, Janikowska M, Henry M, Rogalska E. 2015. Impact of two different saponins on the organization of model lipid membranes. Biochimica et biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1848 (10): 1963–1973. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2015.06.007>
- Lengai MWG, Muthomi WJ, Mbega RE. 2020. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. Scientific African 7: e00239. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00239>
- Liu TX, Chen TY. 2000. Effects of the chitin synthesis inhibitor buprofezin on survival and development of inmatures of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). Journal of Economic Entomology 93 (2): 234–239. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.234>
- Luna-Cruz A, Lomeli-Flores JR, Rodríguez-Leyva E, Tovar-Hernández H, Vanegas-Rico JM, Murillo-Hernández JE. 2018. Toxicidad de un insecticida botánico sobre *Bombus impatiens*, *Apis mellifera*, *Chrysoperla carnea* y *Orius insidiosus*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 9: 1423–1433. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.851>
- Martínez-Tomás SH, Rodríguez-Hernández C, Pérez-Pacheco R, Granados-Echegoyen C, Ortíz-Hernández YD, Floreán-Méndez YD. 2015. Evaluación de tres extractos vegetales en la población de mosca blanca en el cultivo orgánico de jitomate en invernadero. Entomología Agrícola 2: 371–375.
- Medina Pilar, Budia F, González-Núñez M, Rodríguez B, Díaz A, Huerta-de la Peña A, Zapata N, Viñuela E. 2005. Effects of botanical insecticides on two natural enemies of importance in Spain: *Chrysoperla carnea* (Stephens) and *Psylliodes concolor* (Szépligeti). IOBC WPRS Bulletin 29: 85–93.
- Nordlund DA, Cohen AC, Smith RA, McEwen P, New T, Whittington A. 2001. Mass-Rearing, Release Techniques, and Augmentation. In McEwen PK, New, TR, Whittington AE. (eds.) Lacewings in the Crop Environment. Cambridge University Press: Cambridge, UK, pp: 301–319. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511666117>
- Pérez-Torres B, Aragón García A, Cuate-Mozo V, López-Olguín J, Aragón-Sánchez M, Lugo-García G. 2017. Efecto de la aplicación en campo de mezclas de extractos vegetales sobre la presencia y daños de insectos plaga del cultivo de *Amaranthus hypochondriacus* L. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia (LUZ) 34: 477–496.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017. Guía 2017 para el manejo del pulgón amarillo del sorgo. Comité Técnico del Pulgón Amarillo del Sorgo en Guanajuato. Folleto para productores no. 1. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Guadalajara, México. 42 p.
- Silva ABK, Godoy SM, De Lima GA, Oliveira SAK, Pastori LP. 2017. Toxicity of insecticides used in muskmelon on first-instar larvae of *Chrysoperla genanigra* freitas (Neuroptera: Chrysopidae). Revista Caatinga 30 (3): 662–669. <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n314rc>
- Singh S, Singh TD, Singh VP, Pandey VB. 2010. Quaternary alkaloids of *Argemone mexicana*. Pharmaceutical Biology 48: 158–160. <https://doi.org/10.3109/13880200903062622>

- Statgraphics Centurion, XVI. Statpoint Technologies. Inc. Versión 16.2.04. 2009. <https://www.statgraphics.com/download-statgraphics-centurion-xvi>
- Upreti KK, Das M, Khanna SK. 1991. Biochemical toxicology of *Argemone* oil. I. Effect on hepatic cytochrome P-450 and xenobiotic metabolizing enzymes. *Journal of Applied Toxicology* 11 (3): 203–209. <https://doi.org/10.1002/jat.2550110309>
- Vogt H, Bigler F, Brown K, Candolfi M, Kemmeter F, Kühner C, Moll M, Travis A, Ufer A, Viñuela E, Waldburger M, Waltersdorfer A. 2000. Laboratory method to test effects of plant protection products on larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera:Chrysopidae). In Candolfi MP, Blümel S, Forster R, Bakker F, Grimm C, Hassan SA, Heimbach U, Mead-Briggs B, Reber R, Schmuck R, Vogt, H. (eds.). Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods. International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, West Palearctic Regional Section. IOBC WPRS: Dijon, France, pp: 27–44.
- Ziegler J, Facchini, PJ. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59 (2): 735–769.

TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Argemone mexicana* (L.) E IMIDACLOPRID SOBRE *Chrysoperla carnea* (Stephens)

Carlos Serratos-Tejeda¹, Arturo Huerta-de La Peña^{1*},
Juan Antonio Villanueva-Jiménez², Agustín Aragón-García³

¹ Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Boulevard Forjadores No. 205, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla, México. C. P. 72760.

² Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94953.

³ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias. Centro de Agroecología. Edificio VAL1, Carretera a San Baltazar km 1.7, San Pedro Zacachimalpa, Puebla, México. C. P. 72063.

* Autor para correspondencia: arturohp@colpos.mx

RESUMEN

En el cultivo del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), la principal plaga es el pulgón amarillo (*Melanaphis sacchari* Zehntner (Hemiptera: Aphididae)). Para el control de este insecto frecuentemente se utiliza el insecticida imidacloprid, y en algunos casos se complementa con liberaciones de crisopas de la especie *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae). El insecticida ha mostrado ser nocivo para insectos no blanco, como los enemigos naturales de este áfido, por lo que es necesario encontrar otros productos menos nocivos. El objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad de los extractos acuoso y oleoso de chicalote (*Argemone mexicana* L.) sobre *C. carnea* y contrastarlo con la de imidacloprid. La hipótesis es que los extractos de *A. mexicana* aplicados a los estados de desarrollo de *C. carnea* generan menos mortalidad sobre el depredador que el imidacloprid. La concentración de los extractos acuoso y oleoso fue de 30 g L⁻¹ de agua. Para imidacloprid se usó la dosis recomendada para el control del pulgón amarillo (0.35 g L⁻¹). La mortalidad y el efecto de los tratamientos se evaluó mediante los métodos de exposición: T1) tópico en larvas T2) inmersión de huevos, T3) huevos de *Sitotroga cerealella* tratados, y T4) ingestión líquida en adultos. Las variables mortalidad, eclosión y emergencia se analizaron con un ANOVA de una vía, seguido de la comparación de medias con Tukey ($p \leq 0.05$), posteriormente los tratamientos se clasificaron de acuerdo con los niveles de toxicidad propuestos por la Organización Internacional de Control Biológico. Los extractos acuoso y oleoso se ubicaron en la clase 1 de toxicidad para *C. carnea*, excepto en huevecillos tratados con el extracto oleoso (clase 4). Imidacloprid se clasificó en la clase 4 cuando se aplicó vía tópica y por ingestión en adultos y en la clase 2 en ingestión de huevos de *S. cerealella* tratados. En general, los extractos de *A. mexicana* podrían utilizarse como insecticidas selectivos, mientras que imidacloprid puede considerarse no compatible con liberaciones de este depredador.

Palabras clave: *Melanaphis sacchari*, *Sitotroga cerealella*, *Sorghum bicolor*, efectos secundarios.

Citation: Serratos-Tejeda C, Huerta-de La Peña A, Villanueva-Jiménez JA, Aragón-García A. 2023. Toxicidad de extractos de *Argemone mexicana* (L.) e imidacloprid sobre *Chrysoperla carnea* (Stephens). *Agrociencia* 57(5): 1046-1070. doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2494

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: August 03, 2021.

Approved: May 16, 2023.

Published in Agrociencia:
July 27, 2023.

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



INTRODUCCIÓN

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es uno de los principales cultivos en Puebla, México y una de las materias primas de la industria generadora de alimentos balanceados (SAGARPA, 2017). Diversas plagas afectan al sorgo; sin embargo, al pulgón amarillo (*Melanaphis sacchari* Zehntner (Hemiptera: Aphididae)) se le dedican los mayores esfuerzos de control (INIFAP, 2015). Uno de los principales insecticidas utilizados contra este áfido es el imidacloprid (SAGARPA, 2017).

Como medida de control alternativa, se realizan liberaciones de especie de crisopa *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae), un insecto benéfico, polífago y cosmopolita, considerado uno de los depredadores de mayor importancia de *M. sacchari* (Delgado-Ramírez *et al.*, 2016). Este neuróptero se encuentra presente en sistemas agrícolas tratados con insecticidas químicos sintéticos, lo que puede afectar su ciclo de vida (Haramboure, 2017). No obstante, tanto la aplicación de imidacloprid como la liberación de crisopas representan las principales recomendaciones de SAGARPA (2017) para el control de *M. sacchari* en México.

Una alternativa al uso de plaguicidas sintéticos, son los insecticidas de origen botánico que presentan eficacia contra insectos plaga en diferentes cultivos, son económicos, biodegradables, presentan variados modos de acción y baja toxicidad para los organismos no objetivo (Lengai *et al.*, 2020). El chicalote (*Argemone mexicana* L.) es una especie de la familia Papaveraceae, ampliamente distribuida en América tropical. Sus extractos son utilizados por sus propiedades tóxicas en insectos debido a la presencia de alcaloides como: berberina, palmatina, sanguinarina, protoberberina, benzofenantridina, bencilisoquinolina y protopina (Singh *et al.*, 2010; Brahmachari *et al.*, 2013) y otros metabolitos secundarios como glicósidos, taninos y saponinas (Upreti *et al.*, 1991).

Previo a la incorporación de un plaguicida ya sea sintético o de origen vegetal a un programa de manejo integrado de plagas es necesario determinar sus efectos secundarios en insectos no blanco, a fin de generar las pautas que permitan garantizar la conservación de los enemigos naturales (Alegre *et al.*, 2017b). Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la toxicidad de los extractos acuoso y oleoso de *A. mexicana* sobre diferentes estadios de *C. carnea* en condiciones de laboratorio y contrastarla con la toxicidad de imidacloprid. La hipótesis fue que los extractos de *A. mexicana* aplicados a los diferentes estados de desarrollo de *C. carnea* producen una mortalidad menor al insecticida imidacloprid.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Adultos de *C. carnea* colectados en parcelas hortícolas del municipio de Los Reyes de Juárez, estado de Puebla, México (18° 55' 36" N, 97° 47' 54" O, 2197 m de altitud media), fueron trasladados a Laboratorio de Entomología del Colegio de Postgraduados

Campus Puebla, para establecer un pie de cría, iniciada la oviposición, se extrajeron huevos y se individualizaron larvas en unidades de cría. El alimento suministrado a las larvas consistió en huevos de *Sitotroga cerealella* (Olivier) *ad libitum*, material biológico que fue suministrado por el Centro Reprodutor de Organismos Benéficos Saltillo del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Coahuila, México. Los adultos de *C. carnea* se alimentaron con dieta artificial propuesta por Vogt *et al.* (2000), la cual contiene 15 mL de leche condensada, un huevo, 30 g de miel, 20 g de fructuosa, 50 g de germen de trigo, 30 g de levadura de cerveza y 45 mL de agua destilada. Además, se les proporcionó agua potable en un vaso de precipitado de 10 mL y se le colocó una torunda de algodón en la superficie, a fin de evitar el ahogamiento de los individuos. Los insectos se mantuvieron en una cámara bioclimática a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 70 ± 10 % y fotoperiodo de 12 h de luz/oscuridad.

Tratamientos

Colecta de plantas y producción de extractos

En primavera de 2019 en la localidad de la Libertad Tecola, Puebla ($18^{\circ} 52' 53.86''$ N, $98^{\circ} 10' 56.29''$ O, 2145 m de altitud), se colectaron plantas completas de *A. mexicana* en fase de floración. Las partes de la planta utilizadas fueron tallo, flor y semilla, de acuerdo con la metodología propuesta por Pérez-Torres *et al.* (2017). Cada planta fue lavada varias veces para eliminar partículas de polvo, y posteriormente se secaron a la sombra a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) durante 20 días. Una vez secas, estas partes se cortaron en trozos pequeños, se pulverizaron mecánicamente y se tamizaron a través de un colador plástico para obtener un polvo fino. Las semillas se trituraron con un mortero. Para obtener el extracto acuoso se mezclaron 30 g de materia seca triturada en 1 L de agua destilada; la mezcla se dejó reposar durante 24 h. El medio filtrante usado para esta solución fue papel filtro. El mismo procedimiento se siguió para obtener el extracto oleoso, pero utilizando aceite vegetal comestible Máxima Premium® en lugar del agua. Ambas extracciones se realizaron a la sombra a temperatura ambiental de acuerdo con el protocolo descrito por Aragón-García *et al.* (2012). En el presente trabajo se decidió utilizar tanto el extracto acuoso como el oleoso para determinar si existe alguna diferencia al probar los dos solventes.

Formulación y dosis de insecticida

Un tercer tratamiento fue a base de imidacloprid (Dinastía 350 SC®, 350 g i. a. L⁻¹) a la dosis de 0.35 g L⁻¹ equivalente a 200 mL de producto comercial en 200 L de agua por ha. Esta concentración corresponde a la recomendada por SAGARPA (2017) para el control de *M. sacchari* en el cultivo de sorgo.

En cada uno de los bioensayos se incluyó un testigo con aplicación de agua potable.

Métodos de Aplicación

Aplicación tópica

Con una micropipeta manual Research® (Eppendorf; Hamburgo, Alemania) de 0.1–2.5 µL, se aplicaron 0.5 µL de los tratamientos descritos previamente a larvas de tercer estadio (L3) de *C. carnea*. A fin de evitar el canibalismo, las larvas tratadas se colocaron individualmente en cajas de plástico de 3 cm de diámetro y 1 cm de altura, con tapas perforadas (1 cm de diámetro) y selladas con cinta Micropore® para fines de ventilación. Cada tratamiento constó 10 larvas, con cuatro repeticiones. La mortalidad, ausencia de movimiento corporal de las larvas al ser estimuladas con un alfiler entomológico durante 15 s, se registró a las 48 y 72 h posteriores a la aplicación de los tratamientos (Alegre *et al.*, 2017a). Así mismo, se cuantificó el porcentaje de larvas tratadas que puparon y posteriormente el número de adultos que emergieron.

Inmersión de huevos en tratamientos

Segmentos de gasa de tela con 60 huevos de *C. carnea* de 24 h de edad se sumergieron durante 10 s en 30 mL del tratamiento a evaluar, contenido en una caja Petri de cristal (90 mm de diámetro). Posteriormente, las gasas con los huevos se colocaron sobre papel absorbente durante 10 min para retirar el exceso de la solución y facilitar el secado a temperatura ambiente. Una vez secas las gasas con los huevos de *C. carnea*, se colocaron en cajas de Petri y se mantuvieron en las mismas condiciones de la cámara bioclimática. Cada segmento de gasa de tela se consideró una de cuatro repeticiones. El porcentaje de eclosión de larvas se registró a las 48, 72 y 96 h posteriores a la aplicación de los tratamientos. El alimento suministrado a las larvas consistió en huevos de *S. cerealella ad libitum*. Para evaluar el efecto subletal, se registró el porcentaje de emergencia de adultos.

Ingestión en larvas

Los huevos de 24 h de edad de *Sitotroga cerealella* utilizados en esta prueba se obtuvieron de una cría del insecto mantenida en laboratorio; se colocaron 3 g de este material en una malla de tela fina, y se sumergieron durante 10 s en 30 mL de los tratamientos. Los huevos tratados se secaron sobre papel filtro y posteriormente se ofrecieron como alimento a larvas recién emergidas de *C. carnea* hasta su pupación. A fin de evitar la degradación de los principios activos de los extractos, el alimento tratado se reemplazó cada 48 h. Con el propósito de impedir el canibalismo, las larvas se colocaron individualmente en cajas de plástico de 3 cm de diámetro y 1 cm de altura. Los tratamientos constaron de 15 larvas de primer estadio (L₁) de *C. carnea*, con cinco repeticiones. Las cajas de plástico se revisaron cada 48 h para registrar la mortalidad obtenida en cada estadio. La mortalidad se determinó a partir de la observación de exuvias mediante un microscopio Motic® modelo SMZ 168 (Vancouver, Canadá); una vez detectado el cambio, se contabilizaron los individuos muertos por estadio.

Ingestión en adultos de *Chrysoperla carnea*

Una pareja de adultos del depredador de menos de 24 h de edad fue colocada en un contenedor plástico de 7.5 cm de altura y 11.5 cm de diámetro, cuya tapa presentaba una abertura de 10 cm de diámetro cubierta con malla de tela. La concentración de los tratamientos fue de 30 g L⁻¹ de agua para los extractos de *A. mexicana* y de 0.35 g L⁻¹ para imidacloprid. Los bebederos, para adultos consistieron en recipientes plásticos de 20 mL de capacidad con un segmento de tela esponjosa insertada al centro de la tapa, a través del cual los insectos tuvieron acceso al tratamiento. Además, se les suministró la dieta artificial de adultos propuesta por Vogt *et al.* (2000), la cual se colocó por medio de una espátula en el lateral de los contenedores. Cada contenedor de plástico con una pareja de individuos se consideró una unidad experimental y cada tratamiento constó de ocho repeticiones. Se evaluó la mortalidad a las 24, 48 y 72 h de haberse iniciado el ensayo.

Se clasificó la toxicidad de los tratamientos sobre *C. carnea* de acuerdo con la escala recomendada de la Organización Internacional de Control Biológico (International Organization for Biological Control, West Palearctic Regional Section (IOBC)) para ensayos realizados en condiciones de laboratorio (Hassan, 1992). Toxicidad clase 1: El tratamiento se consideró inofensivo si causó menos del 30 % de mortalidad; toxicidad clase 2: ligeramente nocivo al causar 30 a 79 % de mortalidad; moderadamente nocivo (toxicidad clase 3) con 80 a 99 % de mortalidad y nocivo (toxicidad clase 4) al ocasionar más del 99 % de mortalidad.

Análisis estadístico

En todos los casos, los datos de mortalidad y eclosión de larvas y emergencia de adultos a las 48, 72 o 96 h posteriores a la aplicación de los tratamientos según corresponda, se analizaron con un ANOVA de una vía, seguido de la comparación de medias con Tukey ($p \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aplicación tópica

La mortalidad de larvas de tercer estadio (L₃) de *C. carnea* registrada a las 48 y 72 h no difiere entre los individuos tratados con extracto acuoso y oleoso de *A. mexicana* y el testigo (Cuadro 1). En contraste, el tratamiento a base de imidacloprid mostró mayor mortalidad respecto al testigo y el resto de los tratamientos desde las 48 h de evaluación y alcanzó 100 % de mortalidad a las 72 h de exposición. El porcentaje de emergencia de adultos provenientes de larvas tratadas vía tópica no fue diferente entre los extractos acuoso y oleoso de *A. mexicana* y el testigo.

Se ha documentado la presencia de un alto porcentaje de alcaloides y otros metabolitos secundarios con efecto tóxico en *A. mexicana* (Brahmachari *et al.*, 2013). Los extractos a base de esta planta han mostrado efecto insecticida sobre adultos y ninfas de *Bemisia*

Cuadro 1. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *Chrysoperla carnea* tratadas con extractos de *Argemone mexicana* e imidacloprid mediante aplicación tópica.

| Tratamiento | Mortalidad en larvas (% ± EE) a 48 y 72 h | | Emergencia de adultos (% ± EE) |
|-----------------|---|---------------|--------------------------------|
| | 48 h | 72 h | |
| Testigo | 0.0 ± 0.0 a | 0.0 ± 0.0 a | 90.0 ± 8.1 a |
| Extracto acuoso | 0.0 ± 0.0 a | 5.0 ± 5.7 a | 72.5 ± 15.0 a |
| Extracto oleoso | 0.0 ± 0.0 a | 0.0 ± 0.0 a | 65.0 ± 33.1 a |
| Imidacloprid | 90.0 ± 4.0 b | 100.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| Estadísticos | F = 486.0, gl = 3, p = 0.00 | | F = 1163.0, gl = 3, p = 0.00 |

Medias con literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). EE: Error estándar.

tabaci Gennadius (Martínez-Tomás *et al.*, 2015) así como un efecto larvicida e inhibidor del desarrollo en *Culex quinquefasciatus* Say (Granados-Echegoyen *et al.*, 2016), y antialimentario en *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Aragón-García *et al.*, 2019). No obstante, en nuestro experimento la mortalidad de larvas L₃ tratadas extractos acuoso y oleoso de *Argemone mexicana* fue inferior al 5 % y se observaron porcentajes de emergencia de adultos del 72.5 y 65 % respectivamente. Una mortalidad similar (3 %) de larvas de *C. carnea* se reportó por contacto directo con el insecticida botánico Biodie®, formulado a base de extractos vegetales de *A. mexicana*, *Berberis* sp., *Ricinus communis* L. y terthienyl (Luna-Cruz *et al.*, 2018), hecho que sugiere que las larvas de crisopa pueden presentar cierta tolerancia a la exposición a tratamientos a base de chicalote.

La mortalidad registrada en larvas de tercer estadio de *C. carnea* (100 %) tratadas con imidacloprid, demuestran su toxicidad en este estado de desarrollo del neuróptero, debido a ello no fue posible evaluar el porcentaje de emergencia de adultos. Este mismo efecto fue reportado por Huerta *et al.* (2003) quien encontró que imidacloprid es altamente tóxico al tercer estadio de *C. carnea* e inhibe la emergencia de adultos.

Inmersión de huevos en tratamientos

El porcentaje de eclosión de larvas de *Chrysoperla carnea* del grupo testigo y el extracto acuoso de *A. mexicana*, no fue diferente (Cuadro 2) esto sugiere que los extractos carecen de un efecto tóxico en este estadio inicial de desarrollo. Los huevos del testigo que no eclosionaron presentaron mortalidad natural, al quedarse en su color verde y no desarrollar el embrión, el cual es un fenómeno común, considerando la experiencia obtenida en la cría del depredador en laboratorio. El efecto de la exposición de huevos de individuos del género *Chrysoperla* a extractos vegetales a base de barbasco (*Lonchocarpus nicou* (Aubl.) D.C.) y neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) ha sido reportado por autores como Iannacone y Lamas (2002) quienes encontraron que los dos productos botánicos no afectaron el porcentaje de eclosión de huevos y que en todas las dosis

Cuadro 2. Porcentaje de eclosión de huevos de *Chrysoperla carnea* que se trataron con extractos de *Argemone mexicana* e imidacloprid mediante inmersión.

| Tratamiento | Eclosión a 72 y 96 h (% ± EE) | |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------|
| | 72 h | 96 h |
| Testigo | 57.1 ± 3.3 a | 81.6 ± 3.3 a |
| Extracto acuoso | 59.5 ± 4.4 a | 72.1 ± 7.3 a |
| Extracto oleoso | 0.0 ± 0.0 c | 0.0 ± 0.0 c |
| Imidacloprid | 22.9 ± 9.3 b | 26.6 ± 7.9 b |
| Estadísticos | F=486.0, gl= 3, p= 0.00 | F=146.0, gl= 3, p= 0.00 |

Medias con literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). EE: Error estándar.

evaluadas este fue superior al 70 %. Este hecho podría ser atribuido a la tolerancia natural propia de la especie que le confiere resistencia a insecticidas del tipo botánico (Grafton-Cardwell y Hoy, 1987).

Los datos muestran que el extracto oleoso afectó claramente la eclosión de huevos de *C. carnea* y fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. Posterior a la aplicación de este tratamiento, se observó la presencia de una película que recubrió permanentemente y en su totalidad los huevos. No obstante que existe evidencia que sugiere que la presencia de metabolitos secundarios como las saponinas lipofílicas en *A. mexicana* (Dénou *et al.*, 2020) tienen la capacidad de afectar la embriogénesis, al modificar la permeabilidad celular, inhibir las proteínas de la membrana e inducir apoptosis (Korchowiec *et al.*, 2015), en el presente estudio, al no contar con un testigo adicional en el que se aplicara únicamente aceite sin extracto vegetal, no se fue posible atribuir el efecto negativo en la embriogénesis únicamente a los metabolitos secundarios sin descartar un posible efecto de las propiedades fisicoquímicas del aceite *per se*.

Imidacloprid también mostró ser tóxico para huevos de *Chrysoperla carnea*, con un reducido porcentaje de eclosión acumulada (26.6 %) el cual es diferente al testigo y al extracto acuoso de *A. mexicana*, tanto a las 72 como a las 96 h post inmersión. Un resultado similar del efecto tóxico de este insecticida sobre huevos de *C. carnea* ha sido reportado por autores como Ayubi *et al.* (2013) quienes indican que a una dosis de 3.87 $\mu\text{g i. a. L}^{-1}$ imidacloprid tiene un efecto letal en este estado de desarrollo de crisopa.

Ingestión en larvas

No se observaron diferencias en la mortalidad de las larvas de los estadios L_1 y L_2 de *C. carnea* que consumieron huevos de *S. cerealella* tratados con los extractos a base de *A. mexicana* respecto al testigo, en todos los casos la mortalidad es inferior al 11 % a excepción de la registrada en larvas del estadio L_3 (Cuadro 3). El efecto en la mortalidad de larvas de crisópidos expuestas al consumo continuo de alimento tratado con compuestos botánicos ya ha sido reportada. Por ejemplo, se encontró nula mortalidad

Cuadro 3. Mortalidad acumulada en estadios larvales y porcentaje de pupación de *Chrysoperla carnea* que se trataron por ingestión de alimento contaminado con los extractos de *Argemone mexicana* e imidacloprid.

| Tratamiento | n | Mortalidad acumulada por estadios (% ± S.E) | | | | Pupación (% ± EE) | |
|-----------------|----|---|----|-------------------------------|----|--------------------------------|--------------------------------|
| | | L ₁ | n | L ₂ | n | | L ₃ |
| Testigo | | 5.3 ± 2.4 a | 71 | 2.6 ± 2.6 a | 69 | 0.0 ± 0.0 a | 91.9 ± 4.9 A |
| Extracto acuoso | 75 | 10.6 ± 3.4 a | 67 | 3.9 ± 1.6 a | 64 | 1.3 ± 1.3 a | 83.9 ± 4.5 a |
| Extracto oleoso | | 7.9 ± 3.8 a | 69 | 1.3 ± 1.3 a | 68 | 13.3 ± 2.1 b | 77.3 ± 4.9 a |
| Imidacloprid | | 49.3 ± 3.4 b | 38 | 9.3 ± 4.5 a | 31 | 19.9 ± 4.2 b | 21.3 ± 2.4 b |
| Estadísticos | | F = 38.8, gl = 3, p = 0.00 | | F = 1.54, gl = 3, p = 0.24 | | F = 15.46, gl = 3, p = 0.00 | F = 54.70, gl = 3, p = 0.00 |

Medias con literales diferentes indican diferencias estadísticas de acuerdo con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). EE: Error estándar.

en larvas de *Chrysoperla externa* (Schneider) alimentadas con huevos de *S. cerealella* tratados con rotetona extraída de raíces de barbasco y neem a una concentración de 800 y 40 mg i. a. L⁻¹ (Iannacone y Lamas, 2002). En larvas de segundo estadio de *C. carnea* se reportaron niveles de mortalidad de 20 y 35 %, en bioensayos de consumo de individuos de *Planococcus citri* Risso tratados con aceite de cítricos (*Citrus* spp.) y de neem a una concentración subletal (Bibi *et al.*, 2021).

Los porcentajes de mortalidad de los diferentes estadios larvarios de *C. carnea* que ingirieron alimento tratado con imidacloprid difiere de la observada en larvas que consumieron alimento tratado con extracto acuoso de *A. mexicana* y el testigo, pero no de larvas L₃ que ingirieron alimento tratado con extracto oleoso. Aunque las crisopas han desarrollado resistencia a un amplio grupo de insecticidas (Nordlund *et al.*, 2001), las larvas L₃ de crisópidos poseen una mayor tolerancia a insecticidas respecto a larvas L₁ (Liu y Chen, 2000, lo cual difiere con los resultados aquí mostrados, ya que la mortalidad registrada en el primer estadio larvario fue mayor (49.3 %) que la observada en el tercero (19.9 %).

La alta susceptibilidad de larvas de crisopa a imidacloprid redujo significativamente el porcentaje de pupación (21.3 %), lo cual no es del todo inesperado. Si bien los insecticidas neonicotinoides han sido considerados como insecticidas biorracionales, esta categorización toxicológica es muy discutida, principalmente por la alta mortalidad registrada en enemigos naturales como *C. carnea* (Cerna *et al.*, 2012).

Ingestión en adultos

La mortalidad de los adultos de *C. carnea* que ingirieron el extracto acuoso de *A. mexicana* no fue significativamente diferente respecto a la registrada en el testigo, luego de 72 h de exposición. No obstante, ambos tratamientos se diferenciaron de la mortalidad observada en adultos que ingirieron el extracto oleoso, aunque no se descarta que la mortalidad haya ocurrido como resultado de un posible efecto alimentario. El tiempo

de exposición, sin embargo, es un punto crítico para explicar este hecho, ya que de acuerdo a las observaciones que se han realizado durante la cría del depredador, éste puede sobrevivir hasta 6 días sin agua consumiendo únicamente dieta (Cuadro 4).

Cuadro 4. Mortalidad de adultos de *Chrysoperla carnea* tratados por ingestión de los extractos de *Argemone mexicana* e imidacloprid.

| Tratamiento | Mortalidad acumulada a 24,48 y 72 h (% ± SE) | | |
|-----------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| Testigo | 0.0 ± 0.0 a | 12.5 ± 8.1 a | 12.5 ± 8.1 a |
| Extracto acuoso | 0.0 ± 0.0 a | 6.2 ± 6.2 a | 12.5 ± 8.1 a |
| Extracto oleoso | 0.0 ± 0.0 a | 12.5 ± 8.1 a | 43.7 ± 11.3 a |
| Imidacloprid | 75.0 ± 13.3 b | 100.0 ± 0.0 b | 100.0 ± 0.0 b |
| Estadísticos | = 31.50, gl = 3 <i>p</i> = 0.000 | = 46.59, gl = 3 <i>p</i> = 0.000 | = 25.96, gl = 3 <i>p</i> = 0.000 |

Medias con literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). EE: Error estándar.

Los efectos de compuestos de origen botánico en adultos de *C. carnea* han sido reportados por otros autores. Medina *et al.* (2005) evaluaron el efecto del consumo de extractos acuosos de ciruelillo (*Trichilia havanensis* Jacq.) a una concentración 1000 mg i. a. L⁻¹, la cual mostró ausencia de toxicidad después de su exposición continua vía ingestión. Al igual que este estudio, forzamos a *C. carnea* a consumir extractos botánicos sin conseguir aparentemente algún efecto. La especie *A. mexicana* contiene un alto porcentaje de alcaloides (Brahmachari *et al.*, 2013), algunos de ellos alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI), los cuales muestran toxicidad y afectan el sistema nervioso central de insectos, con gran potencial de uso como plaguicidas (Ziegler y Facchini, 2008; Juárez-García, 2020). Estos metabolitos afectan en mayor medida a los individuos de *C. carnea*, cuando son obtenidos de forma oleosa y no cuando su base es agua.

En adultos, la ingestión de extracto acuoso de *A. mexicana* causó una mortalidad similar a la obtenida en el testigo, aunque en ambos casos, ésta fue inferior al 13 %. Pese a que el extracto oleoso de *Argemone mexicana* mostró un porcentaje mayor de mortalidad (43.7 %), éste no difiere significativamente de los demás tratamientos botánicos, pero sí de imidacloprid.

Los resultados muestran que la ingestión de imidacloprid tiene un efecto letal en adultos de *C. carnea*. En este estudio se registró 100 % de mortalidad tras 48 h de exposición. El efecto nocivo de imidacloprid en otros adultos del género *Chrysoperla* ha sido reportado por autores como Silva *et al.* (2017) a una dosis de 1.05 g L⁻¹ de agua.

Toxicidad de los tratamientos de acuerdo con la clasificación del IOBC en condiciones de laboratorio

El porcentaje de mortalidad del extracto acuoso de *A. mexicana* en los diferentes bioensayos realizados fue menor al 30 %, por lo que se clasificó como inofensivo (clase 1 IOBC). La mortalidad registrada en los bioensayos en los que se aplicó extracto oleoso de *A. mexicana* muestra un patrón similar, a excepción del efecto nocivo observado en la ingestión de este tratamiento en adultos de *C. carnea* a las 72 h de exposición (clase 2), y en huevos, donde este tratamiento produce la mortalidad total de este estado de desarrollo (clase 4) y en adultos.

Imidacloprid, fue clasificado como nocivo (clase 4) después de 72 h aplicado de forma tópica en larvas L₃ y cuando fue consumido por adultos. El presente estudio muestra que el efecto de este neonicotinoide varía en los diferentes estados de desarrollo del depredador *C. carnea*, ya que fue menos susceptible cuando se aplicó a huevos (71.9 % de mortalidad, clase 2) y cuando fue ingerido por larvas (78.7 % mortalidad acumulada, clase 2).

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *Argemone mexicana* resultó inocuo para huevos, larvas y adultos de *Chrysoperla carnea*. Los resultados obtenidos sugieren que este tratamiento podría incluirse como parte de un programa de manejo integrado de plagas (MIP).

El extracto oleoso de *A. mexicana* afectó significativamente la mortalidad de huevos (100 %), por lo que se consideró nocivo para este estadio. No obstante, es necesario realizar bioensayos adicionales para descartar que estos efectos sean el resultado de la actividad de metabolitos secundarios asociados a esta planta, y no al efecto de las propiedades físicas del aceite *per se* con las que se elaboró este tratamiento. Adicionalmente, se observó un efecto ligeramente nocivo (43.7 % mortalidad, clase 2 de toxicidad de acuerdo con IOBC) en adultos, luego de 72 h de aplicación del tratamiento. Cuando se aplicó de forma tópica y vía ingestión en larvas, se ubicó en la clase 1 IOBC al presentar una mortalidad inferior al 30 %.

La concentración de imidacloprid, recomendada para el control del pulgón amarillo en sorgo, resultó nociva en aplicación tópica en larvas L₃ y adultos después de 72 h de haberse aplicado. Aunque este mismo tratamiento se clasificó como ligeramente nocivo en huevos y vía ingestión en larvas, los porcentajes de mortalidad registrados de 71.9 y 78.5 %, respectivamente, sugieren una baja compatibilidad de este producto con huevos, larvas y adultos del depredador.

De continuar la aplicación de imidacloprid y la liberación de *C. carnea* como las primeras recomendaciones para el control del *M. sacchari* en sorgo, se sugiere realizar más bioensayos en condiciones de semicampo y campo, así como pruebas de efectos subletales, a fin de determinar concentraciones de este producto que permitan proporcionar un control efectivo del áfido con efectos mínimos en los organismos benéficos como la crisopa.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de postgrado doctoral otorgada al primer autor.

REFERENCIAS

- Alegre A, Bonifaz E, Solange-Lee SE, Iannacone J. 2017a. Sensibilidad de dos biocontroladores *Chrysoperla externa* y *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) frente al extracto acuoso de *Ruta graveolens* (Rutaceae). *The Biologist* 15 (1): 173–180. <https://doi.org/10.24039/rtb2017151152>
- Alegre A, Iannacone J, Carhuapoma M. 2017b. Toxicidad del extracto acuoso, etanólico y hexánico de *Annona muricata*, *Minthostachys mollis*, *Lupinus mutabilis*, y *Chenopodium quinoa* sobre *Tetranychus urticae* y *Chrysoperla externa*. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 33 (3): 273–284. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902017005000705>
- Aragón-García A, Pérez-Torres BC, López-Olguín JF, Damián-Huato MA, Jiménez D, González P. 2012. Estrategia agroecológica para disminuir los daños por plagas en el cultivo de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* L. (Caryophyllales: Amaranthaceae). *Entomología Mexicana* 11: 131–136.
- Aragón-García A, Pérez-Torres BC, Aragón-Sánchez M, Juárez RD, Hernández LMG, Lugo-García GA. 2019. Control de chapulín *Sphenarium purpurascens* Charpertier 1845 (Orthoptera: Pyrgomorphidae) con extractos vegetales, en cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Entomología Mexicana* 6: 75–81.
- Ayubi A, Moravvej G, Karimi J, Jooyandeh A. 2013. Lethal effects of four insecticides on immature stages of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) in laboratory conditions. *Turkish Journal of Entomology* 37 (4): 399–407.
- Bibi R, Ahmad M, Gulzar A, Tariq M. 2021. Effect of profenofos and citrus oil on *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant and *Chrysoperla carnea* Stephens, key predators of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso), under laboratory conditions. *International Journal of Tropical Insect Science* 42: 379–387.
- Brahmachari G, Gorai D, Roy R. 2013. *Argemone mexicana*, chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23 (3): 559–575. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000021>
- Cerna E, Ail C, Landeros J, Sánchez S, Badii M, Aguirre L, Ochoa Y. 2012. Comparación de la toxicidad y selectividad de insecticidas para la plaga *Bactericera cockerelli* y su depredador *Chrysoperla carnea*. *Agrociencia* 46 (8): 783–793.
- Delgado-Ramírez CS, Salas-Araiza MD, Martínez-Jaime OA, Díaz-García JA, Guzmán-Mendoza R, Salazar-Solís E. 2016. Consumo de *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae) por *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) y *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Entomología Agrícola* 3: 369–374.
- Dénou A, Ahmed A, Dafam DG, Yakubu TP, Sanogo R, Diallo D, Alemika TE. 2020. Pharmacognostic, physicochemical and phytochemical investigations on aerial parts of *Argemone mexicana* L. *Research Journal of Pharmacognosy* 7 (3): 15–24. <https://doi.org/10.22127/rjp.2020.220380.1559>
- Grafton-Cardwell EE, Hoy MA. 1987. Intraspecific variability in response to pesticides in the common green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *Hilgardia* 53 (6): 1–32. <https://doi.org/10.3733/hilg.v53n06p032>
- Granados-Echegoyen C, Ortega-Morales BO, Chan-Bacab MJ, Reyes-Estébanez MM, Camacho-Chab JC. 2016. Efecto del extracto etanólico de partes vegetales de *Argemone mexicana* (Papaveraceae) sobre larvas y pupas del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). *Entomología Agrícola* 3: 436–440.
- Haramboure M. 2017. Lethal and sublethal effects after treatment with conventional and biorational insecticides on eggs of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Revista Colombiana de Entomología* 43 (2): 161–166. <https://doi.org/10.25100/socolen.v43i2.5937>

- Hassan SA. 1992. Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: Description of test methods. IOLB-WPRS Bulletin: Marseille, France. 186 p.
- Huerta A, Medina P, Castanera P, Viñuela E. 2003. Residual effects of some modern pesticides on *Chrysoperla carnea* (Stephens) adults under laboratory conditions. IOBC WPRS Bulletin 26 (10): 165–170.
- Iannacone J, Lamas G. 2002. Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 65: 92–101.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2015. El pulgón amarillo, una nueva plaga del sorgo en México, boletín electrónico 1 (16). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Río Bravo, México. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Eventos/2015/BE%20Pulgon%20amarillo,nueva%20plaga%20en%20Mexico.pdf> (Recuperado: mayo 2019).
- Juárez-García RA, Sanzón-Gómez D, Ramírez-Santoyo LF, Gonzales-Castañeda J. 2020. Revisión: el género *Argemone* (Papaveraceae) y los usos para el control de plagas en el sector agrícola. Ciencia e innovación agroalimentaria de la Universidad de Guanajuato 1 (2): 71–83.
- Korchowiec B, Gorczyca M, Wojszko K, Janikowska M, Henry M, Rogalska E. 2015. Impact of two different saponins on the organization of model lipid membranes. Biochimica et biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1848 (10): 1963–1973. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2015.06.007>
- Lengai MWG, Muthomi WJ, Mbega RE. 2020. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. Scientific African 7: e00239. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00239>
- Liu TX, Chen TY. 2000. Effects of the chitin synthesis inhibitor buprofezin on survival and development of immatures of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). Journal of Economic Entomology 93 (2): 234–239. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.234>
- Luna-Cruz A, Lomeli-Flores JR, Rodríguez-Leyva E, Tovar-Hernández H, Vanegas-Rico JM, Murillo-Hernández JE. 2018. Toxicidad de un insecticida botánico sobre *Bombus impatiens*, *Apis mellifera*, *Chrysoperla carnea* y *Orius insidiosus*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 9: 1423–1433. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.851>
- Martínez-Tomás SH, Rodríguez-Hernández C, Pérez-Pacheco R, Granados-Echegoyen C, Ortíz-Hernández YD, Floreán-Méndez YD. 2015. Evaluación de tres extractos vegetales en la población de mosca blanca en el cultivo orgánico de jitomate en invernadero. Entomología Agrícola 2: 371–375.
- Medina Pilar, Budia F, González-Núñez M, Rodríguez B, Díaz A, Huerta-de la Peña A, Zapata N, Viñuela E. 2005. Effects of botanical insecticides on two natural enemies of importance in Spain: *Chrysoperla carnea* (Stephens) and *Psytalia concolor* (Szépligeti). IOBC WPRS Bulletin 29: 85–93.
- Nordlund DA, Cohen AC, Smith RA, McEwen P, New T, Whittington A. 2001. Mass-Rearing, Release Techniques, and Augmentation. In McEwen PK, New, TR, Whittington AE. (eds.) Lacewings in the Crop Environment. Cambridge University Press: Cambridge, UK, pp: 301–319. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511666117>
- Pérez-Torres B, Aragón García A, Cuate-Mozo V, López-Olguín J, Aragón-Sánchez M, Lugo-García G. 2017. Efecto de la aplicación en campo de mezclas de extractos vegetales sobre la presencia y daños de insectos plaga del cultivo de *Amaranthus hypochondriacus* L. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia (LUZ) 34: 477–496.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017. Guía 2017 para el manejo del pulgón amarillo del sorgo. Comité Técnico del Pulgón Amarillo del Sorgo en Guanajuato. Folleto para productores no. 1. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Guadalajara, México. 42 p.
- Silva ABK, Godoy SM, De Lima GA, Oliveira SAK, Pastori LP. 2017. Toxicity of insecticides used in muskmelon on first-instar larvae of *Chrysoperla genanigra* freitas (Neuroptera: Chrysopidae). Revista Caatinga 30 (3): 662–669. <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n314rc>

- Singh S, Singh TD, Singh VP, Pandey VB. 2010. Quaternary alkaloids of *Argemone mexicana*. *Pharmaceutical Biology* 48: 158–160. <https://doi.org/10.3109/13880200903062622>
- Statgraphics Centurion, XVI. Statpoint Technologies. Inc. Versión 16.2.04. 2009. <https://www.statgraphics.com/download-statgraphics-centurion-xvi>
- Upreti KK, Das M, Khanna SK. 1991. Biochemical toxicology of *Argemone* oil. I. Effect on hepatic cytochrome P-450 and xenobiotic metabolizing enzymes. *Journal of Applied Toxicology* 11 (3): 203–209. <https://doi.org/10.1002/jat.2550110309>
- Vogt H, Bigler F, Brown K, Candolfi M, Kemmeter F, Kühner C, Moll M, Travis A, Ufer A, Viñuela E, Waldburger M, Waltersdorfer A. 2000. Laboratory method to test effects of plant protection products on larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera:Chrysopidae). In Candolfi MP, Blümel S, Forster R, Bakker F, Grimm C, Hassan SA, Heimbach U, Mead-Briggs B, Reber R, Schmuck R, Vogt, H. (eds.). Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods. International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, West Palearctic Regional Section. IOBC WPRS: Dijon, France, pp: 27–44.
- Ziegler J, Facchini, PJ. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59 (2): 735–769.

Agrociencia



SEDIMENT TRANSPORT ESTIMATION FROM HYDROLOGICAL AND AUTOREGRESSIVE MODELS

Samuel Rodríguez-Flores¹, José Antonio Quevedo-Tiznado^{2*}, Carlos Muñoz-Robles³, Patricia Julio-Miranda¹

¹ Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales 1. Av. Dr. Nava No. 221, Col. Lomas Los Filtros, San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico. C. P. 78210.

² Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Paseo Cuauhnáhuac No. 8532, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, Mexico. C. P. 62550.

³ Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Instituto de Investigación de Zonas Desérticas. Altair No. 200, Col. Del Llano, San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico. C. P. 78377.

* Author for correspondence: jose_quevedo@tlaloc.imta.mx

ABSTRACT

Hydrologic modeling allows the simulation of runoff and sediment processes, which are applied in integrated watershed management, soil and water nutrients, among others. However, these models require considerable amounts of input data. Sediment data is often lacking in quantity and quality, which leads to uncertainty in hydrological models. The objective of the present study was to propose a methodological alternative based on sediment time series in the Santa Cruz de Aquismón sub-basin, San Luis Potosí, Mexico, by means of autoregressive integrated moving average models (ARIMA) and the Soil and Water Assessment Tool (SWAT) model. The SWAT model was calibrated and validated with measured flows from the National Surface Water Data Bank (BANDAS) of station 26 241 (Ballesmi). Model calibration and validation performance was assessed with Nash-Sutcliffe Coefficient (NSE), percent bias (PBIAS), and the root mean squared error (RMSE). The SWAT model fit was rated as very good. The hydrologic model results were compared to the daily sediment estimates from three months in 1985 (June, September, and November) obtained from ARIMA models. The mean absolute percent error (MAPE) was 0.571, 0.168, and 0.029, respectively. The results indicated that the use of the ARIMA model for sediment estimation is useful when there are short time series with limited information, since it allows the completion of missing data series or short-term estimates.

Keywords: ArcSWAT, runoff, time series, ARIMA.

INTRODUCTION

Sediment assessment by modeling is used in studies to understand the structure, function, or problems in watershed management. It is also used to model runoff and erosion, as well as to estimate the influence of land use and climate change on the hydrologic balance. To improve sediment assessment, it is necessary to implement methodologies using approaches such as parameter optimization, operational management, and spatial distribution, among others (Song *et al.*, 2015). However, their application depends on the quantity and quality of available data, which must be

Citation: Rodríguez-Flores S, Quevedo-Tiznado JA, Muñoz-Robles C, Julio-Miranda P. 2023. Sediment transport estimation from hydrological and autoregressive models. *Agrociencia* 57(5): 1071-1094. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2433

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: May 21, 2021.
Approved: May 14, 2023.
Published in Agrociencia:
July 27, 2023.

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



free of missing values and consistent in magnitude. In case of having missing values, some methodologies cannot be applied, decreasing the analysis options. Regarding the magnitudes, the results obtained should be verified to ensure homogeneity in the data.

One of the most widely used models at the global level is the Soil and Water Assessment Tool (SWAT) model, which includes a hydrological module for sediment, nutrients, crop growth, and agricultural practices, and allows the analysis of ecosystem services (Shujiang *et al.*, 2020). One disadvantage of this model is the amount of complete input data required, which affects the quality of the results and makes runoff and sediment validation necessary.

In Mexico, most of the hydrometric stations provide incomplete daily data on runoff and sediment, which make it difficult to make decisions focused on watershed problems, erosion, and agriculture, among others, so methodologies are needed to correct the missing data. There is a great diversity of methods for estimating missing data on runoff, but few on sediment, which is often a limitation in the construction of a physical model such as SWAT. Therefore, the models mostly used in hydrology to estimate univariate time series are the ARIMA models, usually applied in the calculation of streamflow (Wong *et al.*, 2007).

Rivera-Toral *et al.* (2012) analyzed the performance of the SWAT model for estimating erosion in watersheds in Mexico and concluded that it is adequate, but emphasized the topographic factor (LS) with an independent calculation and a correction for slopes greater than 25 % without performing a sediment calibration due to lack of data. Salas-Martínez *et al.* (2014) and Sánchez-Galindo *et al.* (2017) used the SWAT hydrological model for biomass, runoff, and sediment prediction. This resulted in acceptable estimates, calibrated and validated with information from BANDAS, although they highlighted the reduced quantity and quality of the measurements. In recent years, Salas-Aguilar and Paz-Pellat (2018) generated a base with hydrological and physiographic data for sediment estimation in sub-basins in Mexico to address the problem that existing information presents a series of drawbacks regarding data uncertainty, gaps in the time series, and difficult access, so they synthesized the information of gauged basins so that any researcher could have access.

In this study, a methodology was proposed to estimate missing data in daily sediment time series using the historical record of the same station. The methodology was applied to the sediment transport of the Santa Cruz de Aquismón sub-basin, San Luis Potosí, Mexico. For this purpose, a model was built by means of SWAT, which considered the vegetation of 1985. After the calibration and validation of the model, the historical daily sediment data of the station were used to elaborate the ARIMAS for three months.

MATERIALS AND METHODS

Study area

This study was conducted in the Santa Cruz de Aquismón sub-basin, located in the municipalities of Aquismón, Ciudad Valles, Tanlajás, and Tancanhuitz in the Huasteca

region of the state of San Luis Potosí, Mexico. The study area is located in the priority watershed defined by SEMARNAT as the confluence of the Huastecas, which covers an area of 27 650.50 km² and belongs to the hydrological region of the Pánuco River (Figure 1).

The Santa Cruz de Aquismón sub-basin was mapped using a Digital Elevation Model (DEM) downloaded from the Alos Parsar satellite, which has an area of 329.39 km² and is located within the Sierra Madre Oriental Physiographic Province, made up of folded Mesozoic sedimentary rocks where tectonic features and morphoclimatic changes have been determinant (Palacio-Aponte and Julio-Miranda, 2018). Most of the sub-basin area is located within the physiographic sub-province called Huasteco karst and corresponds to a tropical mountain range karst, and a smaller area corresponds to the Plains and Lomerios sub-province.

The predominant climate, according to the Köppen classification modified by García, is warm-humid A(f), with an average annual temperature higher than 18 °C, precipitation in the driest month is 40 mm, and average annual precipitation varies between 500 and 3000 mm (García, 2004).

INEGI's soil and vegetation charts indicate that the predominant soils are eutrophic vertisols and calcic leptosols, which are highly erodible. The natural vegetation in the sub-basin is in various stages of plant succession and is dominated by secondary

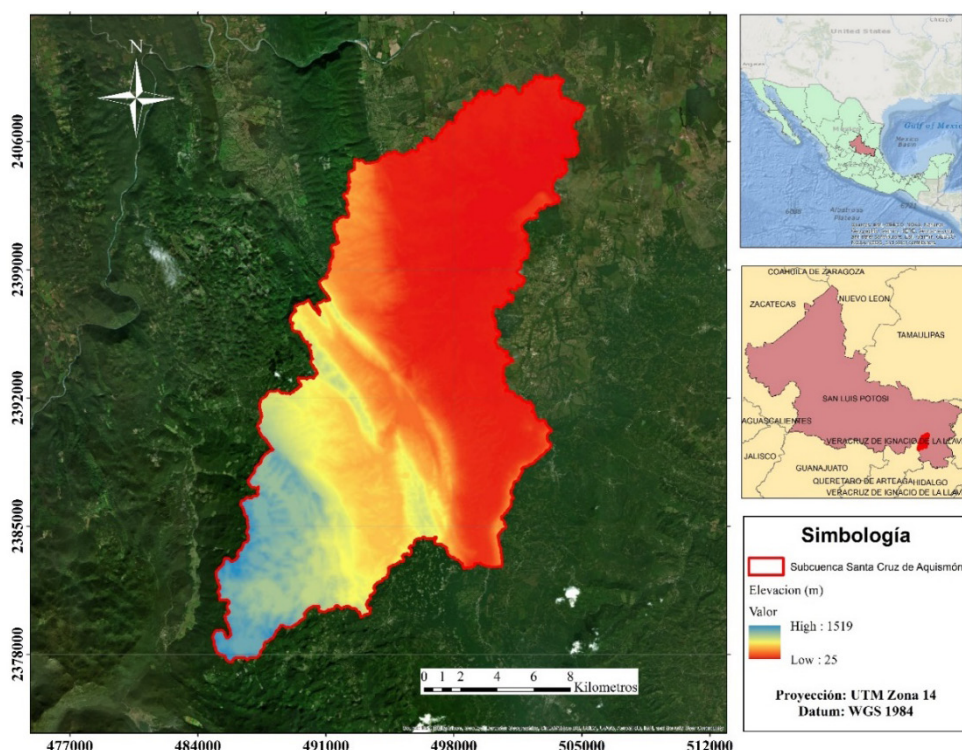


Figure 1. Location and elevation of the Santa Cruz de Aquismón sub-basin, San Luis Potosí, Mexico.

evergreen forest vegetation and secondary shrubby medium sub evergreen forest vegetation. In terms of land use, cultivated pastures predominate, followed by irrigated and rainfed agriculture. It is worth mentioning that the Huasteca region has experienced notable changes in land cover and land use, which have led to the alteration and reduction of the characteristic rainforest ecosystems (Reyes-Hernández *et al.*, 2006).

SWAT model application

Data base

The runoff and sediment model for the sub-basin was constructed from open access data. For daily precipitation, 11 meteorological stations obtained through the ERIC v 1.0 GIS platform were analyzed. Flow and sediment data were extracted from BANDAS, specifically from hydrometric station 26 241 at the outlet of the Ballesmi sub-basin (BANDAS, 2017). Finally, the natural vegetation in the sub-basin was obtained using a Landsat satellite image from 1985 with atmospheric correction corresponding to the dry period (February), to minimize the classification error due to the annual vegetation greenness present during the rainy season and low cloud cover.

ArcGIS 10.3 software with the ArcSWAT 2012 extension was used for runoff and sediment analysis. The simulation period was from March to December 1985 because this year has sufficient sediment and runoff data to evaluate this period; it is important to note that there is only sediment information from 1960 to 1997, and the months of January and February were discarded due to a lack of precipitation data. Since each climatological station analyzed contains daily data that influence a specific area of the sub-basin, Thiessen polygons were calculated to obtain the mean daily precipitation for the months of March to September for calibration and the rest for validation. The first 15 days of simulation were used as a model stabilization period and were excluded from the analysis. Runoff and sediment measurements in the sub-basin are limited by the amount of daily data available and the number of hydrometric stations. Therefore, calibration and validation were only performed with daily runoff data for the simulation period described above.

Runoff calibration and validation

The model was evaluated using the Nash-Sutcliffe efficiency coefficient (NSE), the percentage bias (PBIAS), and the root mean square error (RMSE). The NSE describes the deviation of the radius of the squared difference between the observed and simulated values and the variance of the observations. The value of this coefficient varies from $-\infty$ to 1, with $-\infty$ being a very low fit to the point of being considered unacceptable and unity a perfect fit (Equation 1). The PBIAS measures the average tendency of the simulated values to overestimate (positive sign) or underestimate (negative sign) the observed data, with 0 being the perfect fit value (Equation 2). The RMSE measures the average error magnitude, i.e., it is the representation of the data around a line with the

best possible fit, increasing with the variance of the error magnitudes (Equation 3) (da Silva *et al.*, 2015).

$$NSE = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - S_i)^2}{\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2} \quad (1)$$

$$PBIAS = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - S_i) \times 100}{\sum_{i=1}^n (O_i)} \quad (2)$$

$$RMSE = \left[\frac{\left(\sum_{i=1}^n S_i - O_i \right)^2}{n} \right]^{0.5} \quad (3)$$

where: i is the position of the time series in pairs of measured and simulated data, n the number of even data, O_i the observed data at a given time position, S_i the simulated data at a given time position, and \bar{O} is the mean of the observed data. [SRF1]

ARIMA models

There are several approaches to perform estimations that include moving averages and exponential smoothing, among which ARIMA stands out for its simplicity in understanding and application. ARIMA models are used to analyze stationary data series, based on the assumption that they follow a normal distribution and are limited by the linearity of the method. To improve this limitation, nonlinear stochastic models such as the ARIMA (p,d,q) have been proposed, where p corresponds to the autoregressive (AR), d is the differencing of the data, and q is the moving average (MA) (Box and Jenkins, 1976; Akhter *et al.*, 2019). One issue with the use of ARIMAS is the subjective order selection process. For this reason, Hyndman *et al.* (2020) include the Akaike Information Criterion (AIC) (Equation 4) in the Rstudio Forecast library to find these orders while taking into account the smallest possible data differentiation.

$$AIC = -2 \log(L) + 2(p + q + P + Q + k) \quad (4)$$

where: $k=1$ if $c \neq 0$ and 0 otherwise, L is the maximized likelihood of the model fitted to the differenced data; P and Q is the order for stationary processes (Aguado-Rodríguez *et al.*, 2016).

Sediment estimation with ARIMA

In this study, the daily sediment data obtained through modeling were used as a basis and compared to the ARIMAS calculated through the Rstudio program with the Forecast package (Hyndman *et al.*, 2020). Three 30-day data series were analyzed

for the year 1985 because this year has sufficient information for analysis and years after 1997 have a data deficit. The three series correspond to the beginning (June) and the end of the rainy season (September), and a cold dry season (November), The appropriate ARIMA function was calculated and plotted for each month. Once the ARIMA model was obtained, the estimation was performed for 10 days and the results were compared to the modeling data. Similar to the validation of the SWAT model, statistical criteria were used as proposed by Hyndman and Koehler (2006), and the RMSE and the mean absolute percentage error (MAPE) were calculated (Equation 5), since they are the most commonly used in time series.

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{S_i - O_i}{O_i} \right| \times 100 \quad (5)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Calibration and validation of the SWAT model

Hydrological runoff models have different physical conditions depending on the region analyzed and the amount of data (for the validation and calibration processes), all of which generates uncertainty in basins that are not gauged or have a deficit of information. In this part of the work, the model calibration was performed for the period from March to May 1985 (Figure 2A) using modifications in the Curve Number (NC). These modifications were applied in a range of $\pm 7\%$ with a minimum value of -6.8% for the shrubby secondary vegetation of medium sub evergreen forest. The results obtained for calibration showed that the model is considered very good, since the NSE is 0.77, the PBIAS is 0.14, and the RMSE is less than half the standard deviation of 0.39. As for the validation, the analysis period from June to December 1985 (Figure 2B) showed that the model is also considered very good, with NSE values of 0.77, PBIAS of -2.85, and RMSE of 0.45. The very good values in the calibration and validation processes agree with SWAT runoff models in Mexico elaborated by authors such as Sánchez-Galindo *et al.* (2017) and Nevárez-Favela *et al.* (2021).

Sediments

As mentioned above, the lack of daily sediment data at the hydrometric station is a limitation since recording is made on a monthly and annual basis. This agrees with what was reported by Cruz-Arévalo *et al.* (2021), where the calibration of the SWAT model could not be performed due to the lack of sediment data in the Chapingo River basin, and concluded that this condition can generate unsatisfactory results that influence its reliability. In this model, the total annual sediment recording was used, since the monthly record for January and February showed sediment loads of 0 Mg, which implies that precipitation in these months was not intense or long-lasting enough to show considerable or measurable erosion in the sub-basin. Therefore, the

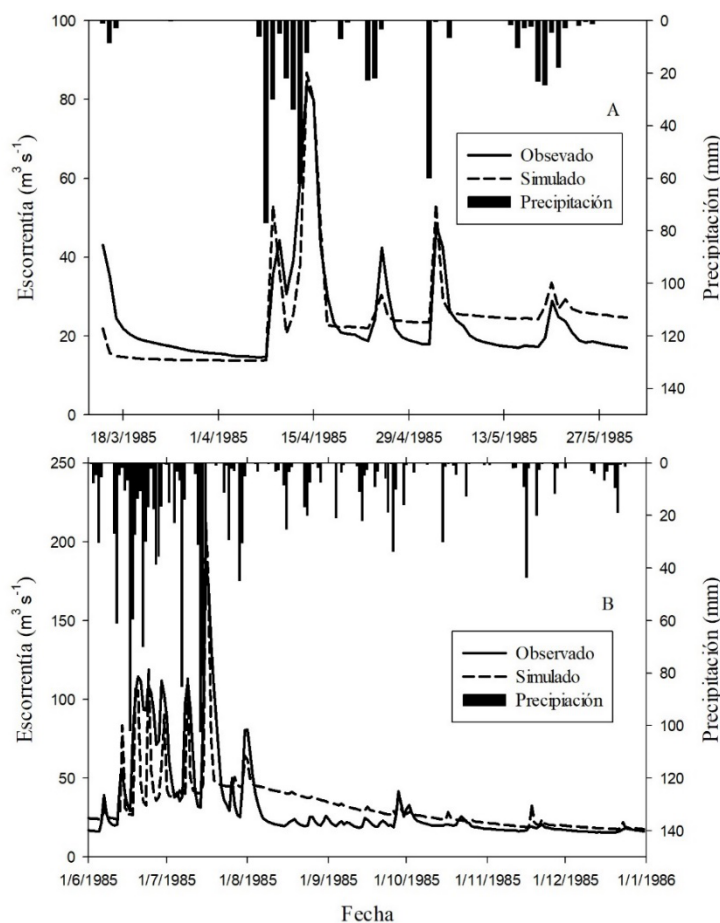


Figure 2. Comparison between observed and simulated runoff with the SWAT model in the Santa Cruz de Aquismón subwatershed, San Luis Potosí, Mexico. A: Calibration period (March-May). B: Validation period (June-December).

annual erosion observed, according to the BANDAS database, was 20 200 m³, which when affected by the relative density of the sediment, namely 1.1 Mg m⁻³ corresponding to clay soils (DOF, 2002), resulted in a measured sediment production of 22 220 Mg and that obtained with the model was 16 774. 94 Mg; that is, the model underestimates erosion by 5 445.06 Mg, which corresponds to 25.50 % of that observed.

Sediment estimation (ARIMA)

ARIMAS, in the field of hydrology and meteorology, has been applied in drought prediction, runoff coefficient determination, river flow harnessing (Thi-Thu-Hong and Nguyen, 2020), sediment concentration assessment (Rajaei and Jafari, 2020), and prediction of meteorological variables (Aguado-Rodríguez *et al.*, 2016), among others. This work focused on exploring the use of ARIMAS for sediment transport series in a

short period of time, a month, and opening up the possibility of completing historical time series or field measurements of a point of interest such as the same hydrometric station.

The first data estimation corresponding to the month of June was obtained from an ARIMA (5,1,0) with five autoregressives, one difference, and zero moving averages. An RMSE of 109.26 was obtained, which is greater than half the standard deviation, a PBIAS of -15.46, and a MAPE of 0.571, which indicated that the estimate is between good and unsatisfactory (Table 1, Figure 3A). This is due to the variability of the SWAT data, especially the last values, where there is an increase with respect to the first values, resulting in estimates with magnitudes different from those expected. This is consistent with Mora and Reyes (2013), who mention that the trend of the data defines the behavior of the ARIMA and the most intense fluctuations must be eliminated to regulate the results.

For the second series, the ARIMA (2,2,1) with two autoregressives, two differences, and a moving average corresponding to the month of September, RMSE values of 7.95 were obtained, which is greater than half the standard deviation, PBIAS of 16.02, and MAPE of 0.168, which indicated a better fit of the data, but still not a satisfactory

Table 1. SWAT, ARIMA values and 95 % confidence intervals (IC) in Mg ha⁻¹ for the months of June (Jun), September (Sep), and November (Nov).

| DAY | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| SWAT Jun. | 77.68 | 71.85 | 63.43 | 75.40 | 64.41 | 60.50 | 395.20 | 276.90 | 181.10 | 128.00 |
| ARIMA Jun. | 83.70 | 120.75 | 152.69 | 134.03 | 105.16 | 91.35 | 111.60 | 136.40 | 130.88 | 112.27 |
| IC Low 95 | -68.32 | -88.48 | -83.73 | -117.47 | -154.7 | -206.7 | -223.4 | -222.9 | -244.3 | -273.1 |
| IC High 95 | 235.72 | 329.56 | 389.12 | 385.53 | 365.09 | 389.41 | 446.57 | 495.73 | 506.02 | 497.6 |
| SWAT Sep. | 44.01 | 44.61 | 42.88 | 41.08 | 48.61 | 42.91 | 41.33 | 38.48 | 37.77 | 35.88 |
| ARIMA Sep. | 44.91 | 42.33 | 40.23 | 38.34 | 35.99 | 34.03 | 31.88 | 29.74 | 27.68 | 25.53 |
| IC Low 95 | 37.02 | 28.09 | 18.68 | 7.51 | -4.39 | -17.07 | -30.72 | -44.99 | -60.02 | -75.72 |
| IC High 95 | 52.81 | 56.57 | 61.79 | 69.17 | 76.37 | 85.13 | 94.47 | 104.48 | 115.38 | 126.78 |
| SWAT Nov. | 9.95 | 9.64 | 9.32 | 8.98 | 8.82 | 8.57 | 8.48 | 8.25 | 8.13 | 7.88 |
| ARIMA Nov. | 9.58 | 9.59 | 9.32 | 9.10 | 8.98 | 8.89 | 8.76 | 8.63 | 8.49 | 8.36 |
| IC Low 95 | -10.81 | -15.81 | -18.54 | -21.38 | -24.38 | -27.96 | -31.00 | -33.90 | -36.76 | -39.59 |
| IC High 95 | 29.98 | 34.98 | 37.19 | 39.59 | 42.64 | 45.74 | 48.39 | 51.16 | 53.74 | 56.31 |

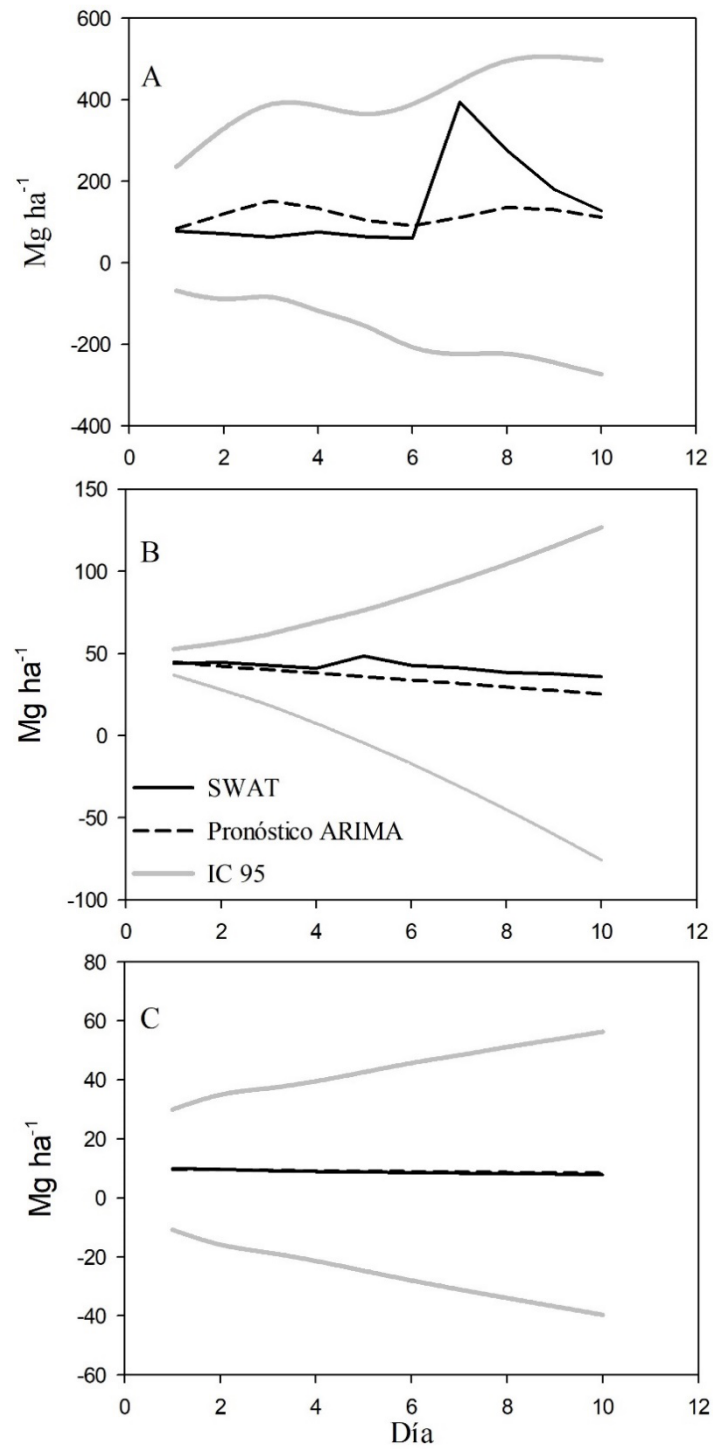


Figure 3. Comparison of SWAT values vs ARIMA forecast and 95 % confidence intervals (IC). A: ARIMA (5,1,0) of the first 10 days of June; B: ARIMA (2,2,1) of the first 10 days of September; C: ARIMA (2,2,3) of the first 10 days of November.

estimate for the RMSE. In this series, the estimates do not exceed the maximum and remain in a range with the SWAT values (Table 1, Figure 3B), which allows modeling possible maximum and minimum events, as suggested by Amaris *et al.* (2017), which allowed the calculation of annual runoff volumes.

Finally, the ARIMA (2,2,3) with two autoregressives, two differences, and three moving averages for the month of November, presented the best fit of the three months, with RMSE values of 0.293 which is less than half the standard deviation, PBIAS of -1.93, and MAPE of 0.029, and was satisfactory for each of the statistics. In this third series, the estimates result in values with a close approximation to those obtained with SWAT (Table 1, Figure 3C). As mentioned by Amaris *et al.* (2017), an adequate fit among the results is of utmost importance, since the estimates can be used to identify or forecast the variation of water resources and their behavior over short time periods.

The results show that the variability of the time series is the main limitation of the estimation; months with higher variability, such as June, are complicated to analyze. However, in seasons with lower variability and a clear trend, either positive or negative, the estimates can present minimal errors, as was the case in November. This agrees with the findings by Montari *et al.* (2000), who mentioned that in short periods of one month, the predicted data are satisfactorily approximate, but this was only tested with runoff.

CONCLUSIONS

The use of ARIMAS in the sediment domain is a fast and efficient way to make estimates to complete databases. However, the results depend on the time series that is analyzed to produce ARIMAS, which can underestimate and overestimate sediment for different periods of the estimate or can be very accurately adjusted.

In this study, the simulated sediment transport is close to the observed one, but the lack of databases, availability of information, daily data, and uncertainty in the correct records were an important limitation for the model, since the corresponding calibration for this parameter was not performed.

Finally, if there is a deficit in the available databases or if additional information is required in the short term, it is possible to make sediment forecasts with SWAT information using ARIMAS, but with time series of little variability and a trend; therefore, it is recommended for short time series and where a large amount of information is not needed, such as completing missing data series or short-term estimates.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author is thankful for the scholarship granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for his doctoral research being conducted at the Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

REFERENCES

- Aguado-Rodríguez GJ, Quevedo-Nolasco A, Castro-Popoca M, Arteaga-Ramírez R, Vázquez-Peña MA, Zamora-Morales BP. 2016. Predicción de variables meteorológicas por medio de modelos ARIMA. *Agrociencia* 50 (1): 1–13.
- Akhter S, Eibek KU, Islama S, Abu Reza M, Islama T, Chub R, Shuanghe S. 2019. Predicting spatiotemporal changes of channel morphology in the reach of Teesta River, Bangladesh using GIS and ARIMA modeling. *Quaternary International* 513: 80–94. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2019.01.022>
- Amaris G, Avila H, Guerrero T. 2017. Applying ARIMA model for annual volume time series of the Magdalena River. *Tecnura* 21: 88–101.
- BANDAS (Banco Nacional de Datos de Aguas Superficiales). 2017. SIG BANDAS v 1.0. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua y Comisión Nacional del Agua. Jiutepec, México. <http://hidrosuperf.imta.mx/bandas/> (Retrieved: Noviembre 2020).
- Box GEP, Jenkins GM. 1976. Time series analysis: forecasting and control. Holden-Day: San Francisco, CA, USA, pp: 469–471.
- Cruz-Arévalo B, Gavi-Reyes F, Martínez-Menez M, Juárez-Méndez J. 2021. SWAT applied to surface runoff prediction. *Tecnología y Ciencias del Agua* 12 (2): 157–206. <https://doi.org/10.24850/J-TYCA-2021-02-04>
- da Silva MG, de Aguiar Netto A de O, de Jesus Neves RJ, do Vasco AN, Almeida C, Faccioli GG. 2015. Sensitivity analysis and calibration of hydrological modeling of the watershed northeast Brazil. *Journal of Environmental Protection* 06 (08): 837–850. <https://doi.org/10.4236/jep.2015.68076>
- García E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) (4a edición). Larrios: México.
- Hyndman RJ, Athanasopoulos RG, Bergmeir C, Caceres G, Chhay L, O'Hara-Wild M, Petropoulos F, Razbash S, Wang E, Yasmeeen F. 2020. Forecast: forecasting functions for time series and linear models. R package version 8: 13. <http://CRAN.R-project.org/package=forecast>
- Hyndman RJ, Koehler AB. 2006. Another look at measures of forecast accuracy. *International Journal of Forecasting* 22 (4): 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.ijforecast.2006.03.001>
- Montari A, Rosso R, Taqqu MS. 2000. A seasonal fractional ARIMA model applied to the Nile River monthly flows at Aswan. *Water Resources Research* 36 (5): 1249–1259. <https://doi.org/10.1029/2000WR900012>
- Mora B, Reyes V. 2013. Análisis de tendencias y variación anual e interanual de las precipitaciones (período: 1957-2006) en la cuenca del río Boconó, estado Trujillo, Venezuela. *Revista de Investigación* 37 (80): 45–68.
- Nevárez-Favela MM, Fernández-Reynoso DS, Sánchez-Cohen I, Sánchez-Galindo M, Macedo-Cruz A, Palacios-Espinosa C. 2021. Comparison between WEAP and SWAT models in a basin at Oaxaca, Mexico. *Tecnología y Ciencias del Agua* 12 (1): 358–401.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. México, D. F.
- Palacio-Aponte G, Julio-Miranda P. 2018. Medio Abiótico. In *Procesos territoriales, económicos y socioculturales de San Luis Potosí*. Vázquez Solís V. (ed.). Universidad Autónoma de Sal Luis Potosí: San Luis Potosí, México, pp: 29–46. <https://doi.org/10.22201/ciga.9786073019620e.2018>
- Rajae T, Jafari H. 2020. Two decades on the artificial intelligence models advancement for modeling river sediment concentration: State-of-the-art. *Journal of Hydrology* 588: 125011. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125011>
- Reyes-Hernández H, Aguilar-Robledo M, Aguirre-Rivera JR, Trejo-Vázquez I. 2006. Cambios en la cubierta vegetal y uso del suelo en el área del proyecto Pujal-Coy, San Luis Potosí, México, 1973-2000. *Investigaciones Geográficas* 59: 26–42. <https://doi.org/10.14350/rig.30019>
- Rivera-Toral F, Pérez-Nieto S, Ibáñez-Castillo LA, Hernández-Saucedo FR. 2012. Aplicabilidad del modelo SWAT para la estimación de la erosión hídrica en las cuencas de México. *Agrociencia* 46 (2): 101–105.

- Salas-Aguilar VM, Paz-Pellat F. 2018. Base de datos para la estimación de sedimentos en subcuencas de México. *Elementos para Políticas Públicas* 2: 85–92.
- Salas-Martínez R, Ibáñez-Castillo LA, Arteaga-Ramírez R, Martínez-Menes MR, Fernández-Reynoso DS. 2014. Modelado hidrológico de la cuenca del Río Mixteco en el Estado de Oaxaca, México. *Agrociencia* 48 (1): 1–15.
- Sánchez-Galindo M, Fernández-Reynoso DS, Martínez-Menes M, Rubio-Granados E, Ríos-Berber JD. 2017. Modelo hidrológico de la cuenca del río Sordo, Oaxaca, México, con SWAT. *Tecnología y Ciencias del Agua* 8 (5): 141–156. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2017-05-10>
- Shujiang P, Xiaoyan W, Melching CS, Karl-Heinz F. 2020. Development and testing of a modified SWAT model based on slope condition and precipitation intensity. *Journal of Hydrology* 588: 125098. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125098>
- Song X, Zhang J, Zhan C, Xuan Y, Ye M, Xu C. 2015. Global sensitivity analysis in hydrological modeling: Review of concepts, methods, theoretical framework, and applications. *Journal of Hydrology* 523 (225): 739–757. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.02.013>
- Thi-Thu-Hong P, Nguyen XH. 2020. Combining statistical machine learning models with ARIMA for water level forecasting: The case of the Red river. *Advances in Water Resources* 142: 103656. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2020.103656>
- Wong H, Wai-cheung I, Zhang R, Xia J. 2007. Non-parametric time series models for hydrological forecasting. *Journal of Hydrology* 332 (3–4): 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2006.07.013>

ESTIMACIÓN DEL TRANSPORTE DE SEDIMENTOS A PARTIR DE MODELOS HIDROLÓGICOS Y AUTORREGRESIVOS

Samuel **Rodríguez-Flores**¹, José Antonio **Quevedo-Tiznado**^{2*}, Carlos **Muñoz-Robles**³, Patricia **Julio-Miranda**¹

¹ Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales 1. Av. Dr. Nava No. 221, Col. Lomas Los Filtros, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. C. P. 78210.

² Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Paseo Cuauhnáhuac No. 8532, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, México. C. P. 62550.

³ Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Instituto de Investigación de Zonas Desérticas. Altair No. 200, Col. Del Llano, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. C. P. 78377.

* Autor para correspondencia: jose_quevedo@tlaloc.imta.mx

RESUMEN

La modelación hidrológica permite la simulación de procesos de escorrentía y sedimentos, que se aplican en el manejo integral de cuencas, nutrientes del suelo y agua, entre otros. Sin embargo, estos modelos requieren considerables cantidades de datos de entrada. Para los datos de sedimento, muchas veces no cuentan con la cantidad y calidad necesaria, lo cual provoca una incertidumbre en los modelos hidrológicos. El objetivo del estudio fue proponer una alternativa metodológica con base en las series de tiempo de sedimentos en la subcuenca Santa Cruz de Aquismón, SLP, México, por medio de modelos autorregresivos integrados de media móvil (ARIMA) y el modelo Soil and Water Assessment Tool (SWAT). El modelo SWAT se calibró y validó con caudales medidos del Banco Nacional de Datos de Aguas Superficiales (BANDAS) de la estación 26 241 (Ballesmi). El desempeño de la calibración y validación del modelo se efectuó con el Coeficiente de Nash-Sutcliffe (NSE), el sesgo porcentual (PBIAS), la raíz del error medio cuadrático (RMSE). El ajuste del modelo SWAT se clasificó como muy bueno. Los resultados del modelo hidrológico se compararon con la estimación de sedimentos diarios para tres meses del año 1985 (junio, septiembre y noviembre) obtenido a partir de modelos ARIMA, y el error porcentual medio absoluto (MAPE) fue de 0.571, 0.168 y 0.029, respectivamente. Los resultados indicaron que el uso del modelo ARIMA para estimación de sedimentos resulta útil cuando se tienen series de tiempo cortas, con información escasa, dado que permite completar series de datos faltantes o estimaciones a corto plazo.

Palabras clave: ArcSWAT, escorrentía, series de tiempo, ARIMA.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de los sedimentos por medio de modelos se utiliza en estudios para conocer la estructura, la función o los problemas en el manejo de las cuencas. También, para modelar escorrentía y erosión, así como para estimar la influencia del uso de suelo y el cambio climático en el balance hidrológico. Para mejorar la evaluación de los sedimentos, es necesario implementar metodologías que utilicen enfoques como la

Citation: Rodríguez-Flores S, Quevedo-Tiznado JA, Muñoz-Robles C, Julio-Miranda P. 2023. Estimación del transporte de sedimentos a partir de modelos hidrológicos y autorregresivos. *Agrociencia* 57(5): 1071-1094. doi.org/ 10.47163/agrociencia.v57i5.2433

Editor in Chief:
Dr. Fernando C. Gómez Merino

Received: May 21, 2021.
Approved: May 14, 2023.
Published in Agrociencia:
July 27, 2023.

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



optimización de parámetros, la gestión operativa y la distribución espacial, entre otros (Song *et al.*, 2015). Sin embargo, su aplicación depende de la cantidad y calidad de datos disponibles; esto es, sin valores faltantes y que su magnitud sea coherente. En el caso de tener una deficiencia de valores faltantes, algunas metodologías no se podrían aplicar y disminuyen las opciones de análisis. Respecto a las magnitudes, los resultados obtenidos se deberán de verificar para asegurar homogeneidad en los datos.

Uno de los modelos que más se utilizan en el ámbito global es el modelo Soil and Water Assessment Tool (SWAT), que incluye un módulo hidrológico de sedimentos, nutrientes, crecimiento de cultivos y prácticas agrícolas, que permite incluso, analizar servicios ecosistémicos (Shujiang *et al.*, 2020). Una desventaja de este modelo es la cantidad de datos completos que requiere de entrada, que repercute en la calidad de los resultados y haciendo necesaria una validación de escurrimiento y sedimentos.

En México, gran parte de las estaciones hidrométricas presentan datos diarios incompletos sobre escurrimiento y sedimentos, lo que dificulta la toma de decisiones enfocadas en problemática de cuencas, erosión y agricultura, entre otros, por lo que se hacen necesarias metodologías para subsanar los datos ausentes. Existe una gran diversidad de métodos para estimar datos faltantes de escurrimiento, pero pocas sobre sedimentos, por lo que muchas veces es una limitante en la construcción de un modelo físico como SWAT. Por lo anterior, los modelos que más se usan en hidrología para realizar estimaciones de series de tiempo univariadas son los ARIMA, aplicados por lo regular en el cálculo del flujo sobre cauces (Wong *et al.*, 2007).

Rivera-Toral *et al.* (2012) analizaron el funcionamiento del modelo SWAT para la estimación de la erosión en cuencas de México y concluyeron que es adecuado, pero hacen énfasis en el factor topográfico (LS) con un cálculo independiente y una corrección en pendientes mayores al 25 %, pero sin realizar una calibración de sedimentos por carencia de datos. Por su parte Salas-Martínez *et al.* (2014) y Sánchez-Galindo *et al.* (2017) utilizaron el modelo hidrológico SWAT para la predicción de biomasa, escurrimiento y sedimentos, lo que resultó en estimaciones aceptables, calibradas y validadas con información del BANDAS, pero resaltan la reducida cantidad y calidad de las mediciones. En los últimos años, Salas-Aguilar y Paz-Pellat (2018) generaron una base con datos hidrológicos y fisiográficos para la estimación de sedimentos en subcuencas de México, para abordar la problemática de que la información existente presenta una serie de inconvenientes con respecto a la incertidumbre de los datos, huecos en las series de tiempo y difícil acceso, de tal manera que sintetizaron la información de cuencas aforadas para que cualquier investigador tuviera acceso.

En este estudio se propuso una metodología para estimar datos faltantes en series de tiempo de sedimentos diarios por medio del registro histórico de la misma estación. La metodología se aplicó para el transporte de sedimentos de la subcuenca Santa Cruz de Aquismón, SLP, México. Para ello se construyó un modelo por medio de SWAT, el cual, considera la vegetación del año 1985. A partir de la calibración y validación del modelo, se usaron los datos diarios de sedimentos diarios históricos de la estación y con ello elaborar los ARIMAS para tres meses.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente trabajo se realizó en la subcuenca Santa Cruz de Aquismón, que en términos administrativos se localiza en los municipios de Aquismón, Ciudad Valles, Tanlajás y Tancanhuitz en la región Huasteca del estado de San Luis Potosí, México. El área de estudio se ubica en la cuenca prioritaria definida por la SEMARNAT como confluencia de las Huastecas, cuya extensión es de 27 650.50 km², que pertenece a la región hidrológica del río Pánuco (Figura 1).

La subcuenca Santa Cruz de Aquismón, se trazó a partir de un Modelo Digital de Elevaciones (MDE) descargado del satélite Alos Parsar, tiene un área de 329.39 km² y está ubicada dentro de la Provincia Fisiográfica de la Sierra Madre Oriental, constituida por rocas sedimentarias plegadas del Mesozoico en cuya configuración morfológica han sido determinantes los rasgos tectónicos y los cambios morfoclimáticos (Palacio-Aponte and Julio-Miranda, 2018). La mayor parte del área de la subcuenca se localiza dentro de la sub-provincia fisiográfica denominada karst Huasteco y corresponde a un karst de sierras tropical, una menor área corresponde a la sub-provincia Llanuras y Lomeríos.

El clima predominante, de acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García, es cálido húmedo A(f), con una temperatura media anual mayor a 18 °C, la

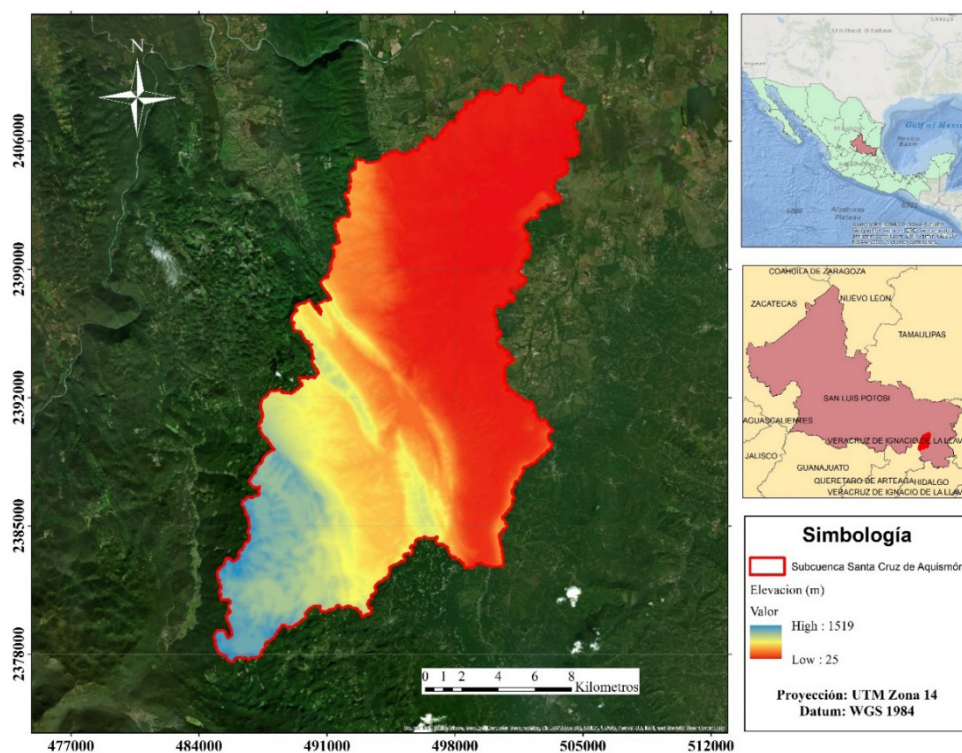


Figura 1. Localización y elevación de la subcuenca Santa Cruz de Aquismón, S.L.P, México.

precipitación en el mes más seco es de 40 mm y la precipitación media anual varía entre los 500 y 3000 mm (García, 2004).

Las cartas de tipo suelo y vegetación del INEGI indican suelos predominantes de tipo vertisoles éutricos y leptosoles cálcicos, que tienen un alto grado de erosionabilidad. La vegetación natural en la subcuenca, se encuentra en diferentes estados de sucesión vegetal y predomina la vegetación secundaria de selva perennifolia y secundaria arbustiva de selva mediana subperennifolia. En cuanto al uso de suelo, predominan los pastizales cultivados, seguidos de la agricultura de riego y de temporal cabe mencionar que la región Huasteca ha experimentado cambios notables en la cobertura y uso del suelo, mismos que han ocasionado la alteración y reducción de los ecosistemas de selva característicos (Reyes Hernández *et al.*, 2006).

Aplicación del modelo SWAT

Base de datos

El modelo de escorrentía y sedimentos para la subcuenca se construyó a partir de datos de acceso abierto. Para el caso de la precipitación diaria, se analizaron 11 estaciones meteorológicas obtenidas a través de la plataforma SIG ERIC v 1.0. Los datos de caudal y sedimentos se extrajeron del BANDAS, en específico de la estación hidrométrica 26 241 a la salida de la subcuenca denominada Ballesmi (BANDAS, 2017). Por último, la vegetación natural en la subcuenca se obtuvo por medio de una imagen de satélite Landsat para el año 1985 con corrección atmosférica correspondiente al periodo seco (febrero), para minimizar el error de clasificación por el verdor de vegetación anual presente en época de lluvia y por la baja cobertura de nubes.

Para el análisis de la escorrentía y sedimentos se utilizó el software ArcGIS 10.3 con la extensión ArcSWAT 2012. El periodo de simulación fue de marzo a diciembre de 1985 debido a que este año posee datos de sedimentos y escorrentía suficientes para evaluar dicho periodo; siendo importante remarcar que sólo existe información de sedimentos del año 1960 a 1997, y descartando los meses de enero y febrero por falta de datos de precipitación. Debido a que cada estación climatológica analizada contiene datos diarios que tienen influencia sobre un área específica de la subcuenca, se calcularon polígonos de Thiessen para obtener la precipitación media diaria de los meses de marzo a septiembre para la calibración y el resto para la validación. Los primeros 15 días de simulación fueron utilizados como un periodo de estabilización del modelo y se excluyeron del análisis. Las mediciones de escorrentía y sedimentos en la subcuenca se encuentran limitadas por la cantidad de datos diarios disponibles y el número de estaciones hidrométricas. Por lo que, la calibración y validación solo se realizó con datos de escorrentía diaria para el periodo de simulación antes descrito.

Calibración y validación de la escorrentía

El modelo se evaluó mediante el coeficiente de eficiencia Nash-Sutcliffe (NSE), el sesgo porcentual (PBIAS) y el error medio cuadrático (RMSE). El NSE describe la desviación

del radio de la diferencia al cuadrado entre los valores observados y simulados y la varianza de las observaciones. El valor de este coeficiente varía de $-\infty$ a 1, siendo $-\infty$ un ajuste muy bajo al punto de considerarse inaceptable y la unidad un ajuste perfecto (Ecuación 1). El PBIAS mide la tendencia promedio de los valores simulados a sobreestimar (signo positivo) o subestimar (signo negativo) los datos observados, siendo 0 el valor de ajuste perfecto (Ecuación 2). El RMSE mide el promedio de la magnitud del error, es decir es la representación de los datos alrededor de una línea con el mejor ajuste posible, aumentando con la varianza de las magnitudes del error (Ecuación 3) (da Silva *et al.*, 2015).

$$NSE = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - S_i)^2}{\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2} \quad (1)$$

$$PBIAS = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - S_i) \times 100}{\sum_{i=1}^n (O_i)} \quad (2)$$

$$RMSE = \left[\frac{\left(\sum_{i=1}^n S_i - O_i \right)^2}{n} \right]^{0.5} \quad (3)$$

donde: i es la posición de la serie de tiempo en pares de datos medidos y simulados, n el número de datos pares, O_i el dato observado en una posición de tiempo dada, S_i el dato simulado en una posición de tiempo dada y \bar{O} es la media de los datos observados.

Modelos ARIMA

Existen varios enfoques para realizar estimaciones que incluyan medias móviles y suavizados exponenciales, entre los que destaca, por su simplicidad en comprensión y aplicación el ARIMA. Los modelos ARIMA se utilizan para analizar series de datos estacionarios, con base en el supuesto de que sigue una distribución normal y tiene como limitante la linealidad del método.

Para mejorar esta limitante, se han propuesto modelos estocásticos no lineales como el ARIMA (p,d,q), donde la p corresponde al autorregresivo (AR), d es la diferenciación de los datos y q es la media móvil (MA) (Box y Jenkins, 1976; Akhter *et al.*, 2019). Una cuestión para el uso de ARIMAS, es el proceso de selección del orden que es de manera subjetiva. Por esta razón, Hyndman *et al.* (2020) en la librería Forecast de Rstudio incluye el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Ecuación 4) para encontrar estos órdenes y toma en cuenta la menor diferenciación posible de los datos.

$$AIC = -2 \log(L) + 2(p + q + P + Q + k) \quad (4)$$

donde: $k=1$ si $c \neq 0$ y 0 de otra manera, L es la probabilidad maximizada del modelo ajustado a los datos diferenciados; P y Q es el orden para procesos estacionarios (Aguado-Rodríguez *et al.*, 2016).

Estimación de sedimentos con ARIMA

Para este trabajo, se tomaron como base los datos de sedimentos diarios obtenidos por medio de la modelación y se compararon con los ARIMAS calculados a través del programa Rstudio con el paquete Forecast (Hyndman *et al.*, 2020). Se analizaron tres series de datos de 30 días para el año 1985 debido a que este año posee información suficiente para realizar su análisis y en años posteriores a 1997 existe un déficit de datos. Las tres series corresponden al inicio de la temporada de lluvias (junio), el final de la temporada (septiembre) y una temporada seca fría (noviembre), se calculó y graficó la función ARIMA adecuada para cada mes. Una vez obtenido el modelo ARIMA, se realizó la estimación para 10 días y los resultados se compararon con los datos de la modelación. De manera similar a la validación del modelo SWAT, se utilizaron criterios estadísticos como lo propone Hyndman y Koehler (2006), y se calcularon el RMSE y el error porcentual medio absoluto (MAPE) ya que son los más utilizados en series de tiempo (Ecuación 5).

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{(S_i - O_i)}{O_i} \right| \times 100 \quad (5)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calibración y validación del modelo SWAT

Los modelos hidrológicos de escorrentía tienen distintas condiciones físicas que dependen de la región analizada, cantidad de datos (para los procesos de validación y calibración) lo que genera una incertidumbre en cuencas no aforadas o con déficit de información. En esta parte del trabajo, la calibración del modelo se realizó para el periodo de marzo a mayo del año 1985 (Figura 2A) por medio de modificaciones en el Número de Curva (NC). Estas modificaciones se aplicaron en un rango de $\pm 7\%$ con un valor mínimo de -6.8% para la vegetación secundaria arbustiva de selva mediana subperennifolia. Los resultados obtenidos para la calibración mostraron que el modelo es muy bueno, ya que el NSE es 0.77, PBIAS de 0.14 y el RMSE es menor que la mitad de la desviación estándar de 0.39. En cuanto a la validación, el periodo de análisis fue de junio a diciembre de 1985 (Figura 2B). Los resultados de la validación mostraron que el modelo se considera como muy bueno, en virtud de que posee valores del NSE de 0.77, PBIAS de -2.85 , el RMSE es 0.45. Los valores de muy bueno en la calibración y validación concuerdan con modelos de escorrentía SWAT en México elaborados por autores como Sánchez-Galindo *et al.* (2017) y Nevárez-Favela *et al.* (2021).

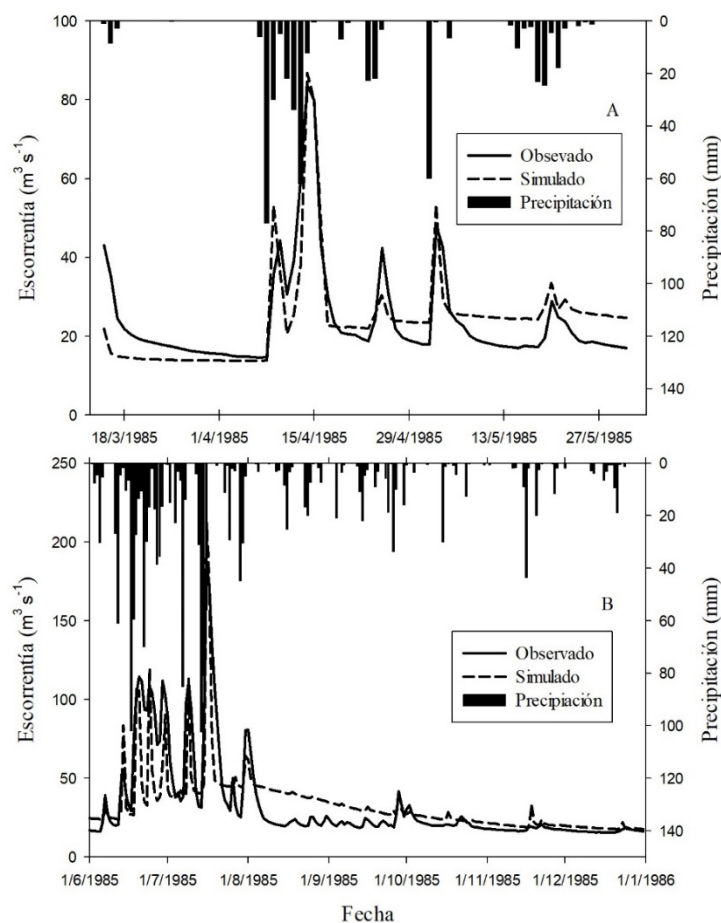


Figura 2. Comparación entre escorrentía observada y simulada con el modelo SWAT en la sub-cuenca Santa Cruz de Aquismón, S.L.P, México. A: Periodo de calibración (marzo-mayo). B: Periodo de validación (junio- diciembre).

Sedimentos

Como se mencionó, la falta de datos diarios de sedimentos en la estación hidrométrica es una limitante que se debe a que el registro se realiza de manera mensual y anual. Esto concuerda con lo reportado por Cruz-Arévalo *et al.* (2021), donde la calibración del modelo SWAT no se pudo realizar por inexistencia de datos de sedimentos en la cuenca del Río Chapingo y concluye que esta condición puede generar resultados poco satisfactorios que influyen en la confiabilidad del modelo.

En este modelo se utilizó el registro total de sedimentos anuales, en virtud de que en el registro mensual de los meses de enero y febrero se presentaron acarreo de sedimentos de 0 Mg, lo que implica que las precipitaciones en estos meses no fueron intensas o duraderas para presentar erosión considerable o medible en la subcuenca. Con esto en cuenta, la erosión anual observada en la subcuenca de acuerdo con la base de datos BANDAS es de 20 200 m^3 , la cual, al afectarse por la densidad relativa del sedimento, a saber, 1.1 Mg m^{-3} correspondiente a suelos arcillosos (DOF, 2002), resulta en una

producción de sedimentos medida de 22 220 Mg y la obtenida con el modelo fue de 16 774. 94 Mg; es decir, el modelo subestima la erosión en 5 445.06 Mg, lo que corresponde a un 25.50 % con respecto a la observada.

Estimación de sedimentos (ARIMA)

El uso de ARIMAS en el ámbito de la hidrología y la meteorología se ha aplicado en la predicción de sequías, determinación de coeficientes de escorrentía, obtención de tirantes de ríos (Thi-Thu-Hong y Nguyen, 2020), evaluación de concentración de sedimentos (Rajaei y Jafari, 2020) y predicción de variables meteorológicas (Aguado-Rodríguez *et al.*, 2016), entre otros. En este trabajo se enfocó en explorar el uso de ARIMAS para serie de transporte de sedimentos en tiempo corto, un mes, y abrir la posibilidad de completar series de tiempo históricas o mediciones en campo de un punto de interés como lo puede ser la misma estación hidrométrica.

La primera estimación de datos que corresponde al mes de junio se obtuvo a partir de un ARIMA (5,1,0) con cinco autorregresivos, una diferencia y cero medias móviles. Se obtuvo un RMSE de 109.26, que es mayor a la mitad de la desviación estándar, PBIAS de -15.46 y un MAPE de 0.571, lo que indicó que la estimación está entre bueno y no satisfactorio (Cuadro 1 y Figura 3A). Esto se debe a la variabilidad de los datos de

Cuadro 1. Valores de SWAT, ARIMA e intervalos de confianza al 95 % (IC) en Mg ha⁻¹ para los meses de junio (jun), septiembre (sep) y noviembre (nov).

| Día | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| SWAT Jun. | 77.68 | 71.85 | 63.43 | 75.40 | 64.41 | 60.50 | 395.20 | 276.90 | 181.10 | 128.00 |
| ARIMA Jun. | 83.70 | 120.75 | 152.69 | 134.03 | 105.16 | 91.35 | 111.60 | 136.40 | 130.88 | 112.27 |
| IC Bajo 95 | -68.32 | -88.48 | -83.73 | -117.47 | -154.7 | -206.7 | -223.4 | -222.9 | -244.3 | -273.1 |
| IC Alto 95 | 235.72 | 329.56 | 389.12 | 385.53 | 365.09 | 389.41 | 446.57 | 495.73 | 506.02 | 497.6 |
| SWAT Sep. | 44.01 | 44.61 | 42.88 | 41.08 | 48.61 | 42.91 | 41.33 | 38.48 | 37.77 | 35.88 |
| ARIMA Sep. | 44.91 | 42.33 | 40.23 | 38.34 | 35.99 | 34.03 | 31.88 | 29.74 | 27.68 | 25.53 |
| IC Bajo 95 | 37.02 | 28.09 | 18.68 | 7.51 | -4.39 | -17.07 | -30.72 | -44.99 | -60.02 | -75.72 |
| IC Alto 95 | 52.81 | 56.57 | 61.79 | 69.17 | 76.37 | 85.13 | 94.47 | 104.48 | 115.38 | 126.78 |
| SWAT Nov. | 9.95 | 9.64 | 9.32 | 8.98 | 8.82 | 8.57 | 8.48 | 8.25 | 8.13 | 7.88 |
| ARIMA Nov. | 9.58 | 9.59 | 9.32 | 9.10 | 8.98 | 8.89 | 8.76 | 8.63 | 8.49 | 8.36 |
| IC BAjo 95 | -10.81 | -15.81 | -18.54 | -21.38 | -24.38 | -27.96 | -31.00 | -33.90 | -36.76 | -39.59 |
| IC Alto 95 | 29.98 | 34.98 | 37.19 | 39.59 | 42.64 | 45.74 | 48.39 | 51.16 | 53.74 | 56.31 |

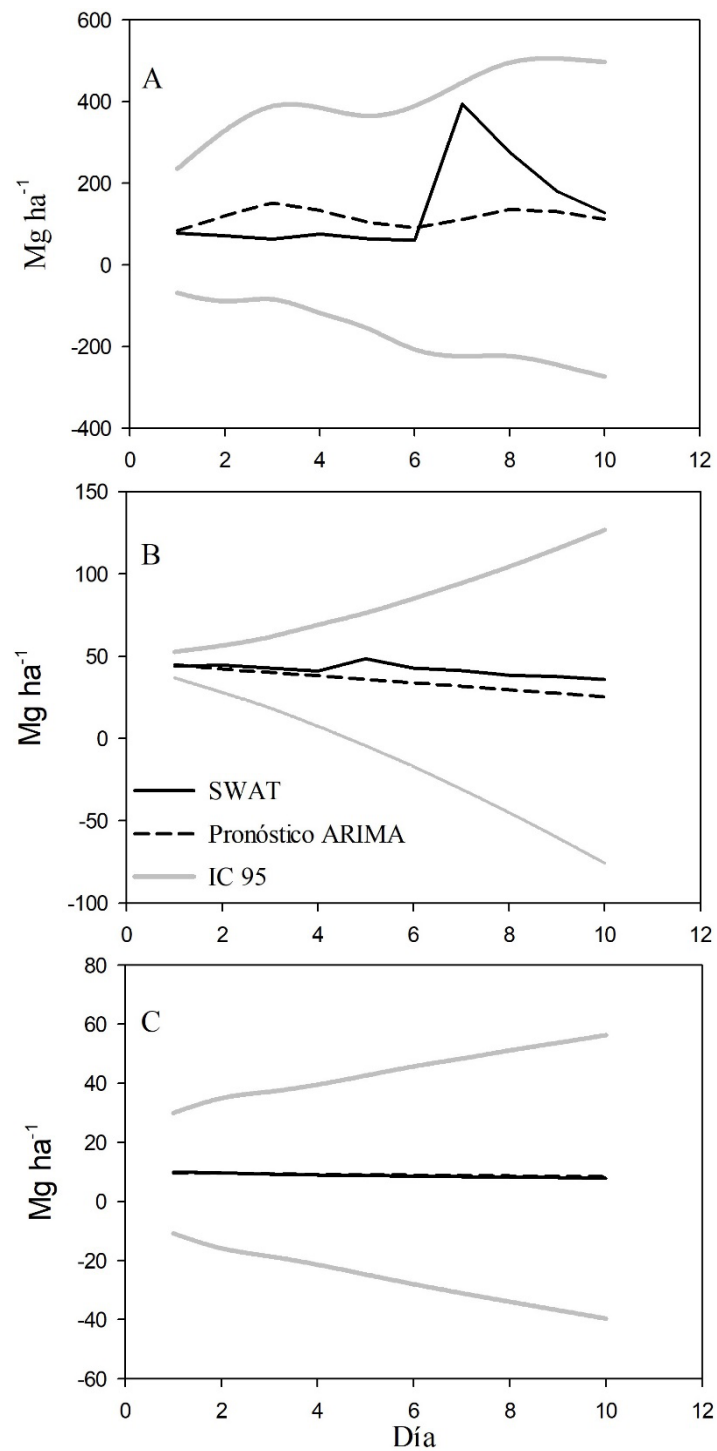


Figura 3. Comparación de valores SWAT vs pronóstico ARIMA e intervalos de confianza al 95 % (IC). A: ARIMA (5,1,0) de los primeros 10 días del mes de junio; B: ARIMA (2,2,1) de los primeros 10 días del mes de septiembre; C: ARIMA (2,2,3) de los primeros 10 días del mes de noviembre.

SWAT, en especial los últimos valores, donde presenta un incremento con respecto a los primeros valores, lo que resulta en estimaciones con magnitudes distintas a las esperadas (Cuadro 1 y Figura 3B). Siendo consistente con lo reportado por Mora y Reyes (2013), quienes mencionan que la tendencia de los datos define el comportamiento del ARIMA y se debe eliminar las fluctuaciones más intensas para regular los resultados. Para la segunda serie, el ARIMA (2,2,1) con dos autorregresivos, dos diferencias y una media móvil correspondiente al mes de septiembre. Se obtuvo valores de RMSE de 7.95, que es mayor a la mitad de la desviación estándar, PBIAS de 16.02 y MAPE de 0.168, lo cual indicó un mejor ajuste de los datos, pero todavía sin ser una estimación satisfactoria para el RMSE. En esta serie, las estimaciones no sobrepasan el máximo y se mantienen en un rango con los valores de SWAT (Cuadro 1 y Figura 3B), lo que permite modelar posibles eventos máximos y mínimos; tal como lo sugiere Amaris *et al.* (2017), que permitió el cálculo de volúmenes anuales de escorrentía.

Por último, el ARIMA (2,2,3) con dos autorregresivos, dos diferencias y tres medias móviles para el mes de noviembre, presentó el mejor ajuste de los tres meses, con valores de RMSE de 0.293 que es menor a la mitad de la desviación estándar, PBIAS de -1.93 y MAPE de 0.029, y fue satisfactorio para cada uno de los estadísticos. En lo que respecta a esta tercera serie, las estimaciones resultan en valores con una aproximación cercana a los obtenidos con SWAT (Cuadro 1, Figura 3C). En este caso como lo mencionan Amaris *et al.* (2017) un adecuado ajuste entre los resultados es de suma importancia, puesto que las estimaciones pueden ser empleadas para identificar o prever la variación de los recursos hídricos y su comportamiento para periodos cortos de tiempo.

Los resultados muestran que la variabilidad de la serie de tiempo es la principal limitante de la estimación, meses como junio cuya variabilidad es mayor, son complicados de analizar. Sin embargo, en temporadas donde la variabilidad es menor y existe una clara tendencia ya sea positiva o negativa, las estimaciones pueden presentar errores mínimos como fue el caso del mes de noviembre. Esto concuerda con lo encontrado por Montari *et al.* (2000), los cuales mencionaron que, en periodos cortos de un mes, los datos pronosticados se aproximan de manera satisfactoria, pero esto sólo se probó con la escorrentía.

CONCLUSIONES

El uso de ARIMAS en el ámbito de sedimentos es una manera rápida y eficaz de realizar estimaciones para completar bases de datos. Sin embargo, los resultados dependen de la serie de tiempo que se analizó para elaborar los ARIMAS, esta puede subestimar y sobreestimar los sedimentos para diferentes periodos de la estimación o puede ajustarse de forma muy precisa.

En este trabajo, el transporte de sedimento simulado es cercano al observado, pero la falta de bases de datos, disponibilidad de información, datos diarios y la incertidumbre en los registros correctos fue una limitante importante para el modelo, puesto que no se realizó la calibración correspondiente para este parámetro.

Por último, en caso de existir un déficit en las bases de datos disponibles o requerir información extra a corto plazo es posible realizar pronósticos de sedimentos con información de SWAT por medio de ARIMAS, pero con series de tiempo con poca variabilidad y una tendencia; por lo que se recomienda para series de tiempo cortas y donde no se necesite una gran cantidad de información, como lo sería completar series de datos faltantes o estimaciones a corto plazo.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor recibe una beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y desempeña sus labores de investigación en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

REFERENCIAS

- Aguado-Rodríguez GJ, Quevedo-Nolasco A, Castro-Popoca M, Arteaga-Ramírez R, Vázquez-Peña MA, Zamora-Morales BP. 2016. Predicción de variables meteorológicas por medio de modelos ARIMA. *Agrociencia* 50 (1): 1–13.
- Akhter S, Eibek KU, Islama S, Abu Reza M, Islama T, Chub R, Shuanghe S. 2019. Predicting spatiotemporal changes of channel morphology in the reach of Teesta River, Bangladesh using GIS and ARIMA modeling. *Quaternary International* 513: 80–94. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2019.01.022>
- Amaris G, Avila H, Guerrero T. 2017. Applying ARIMA model for annual volume time series of the Magdalena River. *Tecnura* 21: 88–101.
- BANDAS (Banco Nacional de Datos de Aguas Superficiales). 2017. SIG BANDAS v 1.0. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua y Comisión Nacional del Agua. Jiutepec, México. <http://hidrosuperf.imta.mx/bandas/> (Recuperado: noviembre 2020).
- Box GEP, Jenkins GM. 1976. *Time series analysis: forecasting and control*. Holden-Day: San Francisco, CA, USA, pp: 469–471.
- Cruz-Arévalo B, Gavi-Reyes F, Martínez-Menez M, Juárez-Méndez J. 2021. SWAT applied to surface runoff prediction. *Tecnología y Ciencias del Agua* 12 (2): 157–206. <https://doi.org/10.24850/J-TYCA-2021-02-04>
- da Silva MG, de Aguiar Netto A de O, de Jesus Neves RJ, do Vasco AN, Almeida C, Faccioli GG. 2015. Sensitivity analysis and calibration of hydrological modeling of the watershed northeast Brazil. *Journal of Environmental Protection* 06 (08): 837–850. <https://doi.org/10.4236/jep.2015.68076>
- García E. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)* (4a edición). Larrios: México.
- Hyndman RJ, Athanasopoulos RG, Bergmeir C, Caceres G, Chhay L, O'Hara-Wild M, Petropoulos F, Razbash S, Wang E, Yasmeeen F. 2020. *Forecast: forecasting functions for time series and linear models*. R package version 8: 13. <http://CRAN.R-project.org/package=forecast>
- Hyndman RJ, Koehler AB. 2006. Another look at measures of forecast accuracy. *International Journal of Forecasting* 22 (4): 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.ijforecast.2006.03.001>
- Montari A, Rosso R, Taqqu MS. 2000. A seasonal fractional ARIMA model applied to the Nile River monthly flows at Aswan. *Water Resources Research* 36 (5): 1249–1259. <https://doi.org/10.1029/2000WR900012>
- Mora B, Reyes V. 2013. Análisis de tendencias y variación anual e interanual de las precipitaciones (período: 1957-2006) en la cuenca del río Boconó, estado Trujillo, Venezuela. *Revista de Investigación* 37 (80): 45–68.
- Nevárez-Favela MM, Fernández-Reynoso DS, Sánchez-Cohen I, Sánchez-Galindo M, Macedo-Cruz A, Palacios-Espinosa C. 2021. Comparison between WEAP and SWAT models in a basin at Oaxaca, Mexico. *Tecnología y Ciencias del Agua* 12 (1): 358–401.

- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. México, D. F.
- Palacio-Aponte G, Julio-Miranda P. 2018. Medio Abiótico. *In* Procesos territoriales, económicos y socioculturales de San Luis Potosí. Vázquez Solís V. (ed.). Universidad Autónoma de San Luis Potosí: San Luis Potosí, México, pp: 29–46. <https://doi.org/10.22201/ciga.9786073019620e.2018>
- Rajaei T, Jafari H. 2020. Two decades on the artificial intelligence models advancement for modeling river sediment concentration: State-of-the-art. *Journal of Hydrology* 588: 125011. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125011>
- Reyes-Hernández H, Aguilar-Robledo M, Aguirre-Rivera JR, Trejo-Vázquez I. 2006. Cambios en la cubierta vegetal y uso del suelo en el área del proyecto Pujal-Coy, San Luis Potosí, México, 1973-2000. *Investigaciones Geográficas* 59: 26–42. <https://doi.org/10.14350/rig.30019>
- Rivera-Toral F, Pérez-Nieto S, Ibáñez-Castillo LA, Hernández-Saucedo FR. 2012. Aplicabilidad del modelo SWAT para la estimación de la erosión hídrica en las cuencas de México. *Agrociencia* 46 (2): 101–105.
- Salas-Aguilar VM, Paz-Pellat F. 2018. Base de datos para la estimación de sedimentos en subcuencas de México. *Elementos para Políticas Públicas* 2: 85–92.
- Salas-Martínez R, Ibáñez-Castillo LA, Arteaga-Ramírez R, Martínez-Menes MR, Fernández-Reynoso DS. 2014. Modelado hidrológico de la cuenca del Río Mixteco en el Estado de Oaxaca, México. *Agrociencia* 48 (1): 1–15.
- Sánchez-Galindo M, Fernández-Reynoso DS, Martínez-Menes M, Rubio-Granados E, Ríos-Berber JD. 2017. Modelo hidrológico de la cuenca del río Sordo, Oaxaca, México, con SWAT. *Tecnología y Ciencias del Agua* 8 (5): 141–156. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2017-05-10>
- Shujiang P, Xiaoyan W, Melching CS, Karl-Heinz F. 2020. Development and testing of a modified SWAT model based on slope condition and precipitation intensity. *Journal of Hydrology* 588: 125098. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125098>
- Song X, Zhang J, Zhan C, Xuan Y, Ye M, Xu C. 2015. Global sensitivity analysis in hydrological modeling: Review of concepts, methods, theoretical framework, and applications. *Journal of Hydrology* 523 (225): 739–757. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.02.013>
- Thi-Thu-Hong P, Nguyen XH. 2020. Combining statistical machine learning models with ARIMA for water level forecasting: The case of the Red river. *Advances in Water Resources* 142: 103656. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2020.103656>
- Wong H, Wai-cheung I, Zhang R, Xia J. 2007. Non-parametric time series models for hydrological forecasting. *Journal of Hydrology* 332 (3–4): 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2006.07.013>

Agrociencia



