

VOL IX

AGRÁRIAS

PESQUISA E INOVAÇÃO NAS CIÊNCIAS QUE
ALIMENTAM O MUNDO

EDUARDO EUGÊNIO
SPERS
(Organizador)

 EDITORA
ARTEMIS

2023

VOL IX

AGRÁRIAS

PESQUISA E INOVAÇÃO NAS CIÊNCIAS QUE
ALIMENTAM O MUNDO

EDUARDO EUGÊNIO
SPERS
(Organizador)

 EDITORA
ARTEMIS

2023



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

Editora Chefe	Prof. ^a Dr. ^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^a Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^a Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizador	Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers
Imagem da Capa	Shutterstock
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^a Dr.^a Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia
Prof.^a Dr.^a Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba
Prof.^a Dr.^a Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru
Prof.^a Dr.^a Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso
Prof.^a Dr.^a Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof.^a Dr.^a Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^a Dr.^a Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México
Prof.^a Dr.^a Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão
Prof.^a Dr.^a Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará
Prof.^a Dr.^a Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México
Prof.^a Dr.^a Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil
Prof.^a Dr.^a Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México



Prof.^ª Dr.^ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*
Prof.^ª Dr.^ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*
Prof.^ª Dr.^ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*
Prof.^ª Dr.^ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*
Prof.^ª Dr.^ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío, Chile*
Prof.^ª Dr.^ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil
Prof. Me. Javier Antonio Alborno, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. José Cortez Godinez, Universidad Autónoma de Baja California, México
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Diaz, Instituto Politécnico Nacional, México
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodríguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^ª Dr.^ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal



Prof.^ª Dr.^ª Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana*, Cuba
Prof.^ª Dr.^ª Mauriceia Silva de Paula Vieira, *Universidade Federal de Lavras*, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Ninfa María Rosas-García, *Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional*, México
Prof.^ª Dr.^ª Odara Horta Boscolo, *Universidade Federal Fluminense*, Brasil
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*, Peru
Prof.^ª Dr.^ª Patrícia Vasconcelos Almeida, *Universidade Federal de Lavras*, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Paula Arcoverde Cavalcanti, *Universidade do Estado da Bahia*, Brasil
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, *Universidade Federal do Pará*, Brasil
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, *Universidade Federal do Piauí*, Brasil
Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, *Universidade Federal do Piauí*, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, *Universidade Federal de Uberlândia*, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Sílvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina
Prof.^ª Dr.^ª Solange Kazumi Sakata, *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo (USP)*, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University*, Russia
Prof.^ª Dr.^ª Teresa Cardoso, *Universidade Aberta de Portugal*
Prof.^ª Dr.^ª Teresa Monteiro Seixas, *Universidade do Porto*, Portugal
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, *Universidade Federal de Viçosa*, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Vanessa Bordin Viera, *Universidade Federal de Campina Grande*, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, *Universidade Tecnológica Federal do Paraná*, Brasil
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca*, Colômbia
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León*, Espanha

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

A277 Agrárias [livro eletrônico] : pesquisa e inovação nas ciências que alimentam o mundo IX / Organizador Eduardo Eugênio Spers. – Curitiba, PR: Artemis, 2023.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilíngue

ISBN 978-65-87396-79-8

DOI 10.37572/EdArt_260223798

1. Ciências agrárias – Pesquisa. 2. Agronegócio. 3. Sustentabilidade. I. Spers, Eduardo Eugênio.

CDD 630

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



APRESENTAÇÃO

As Ciências Agrárias são um campo de estudo multidisciplinar por excelência, e um dos mais profícuos em termos de pesquisas e aprimoramento técnico. A demanda mundial por alimentos e a crescente degradação ambiental impulsionam a busca constante por soluções sustentáveis de produção e por medidas visando à preservação e recuperação dos recursos naturais.

A obra **Agrárias: Pesquisa e Inovação nas Ciências que Alimentam o Mundo** compila pesquisas atuais e extremamente relevantes, apresentadas em linguagem científica de fácil entendimento. Na coletânea, o leitor encontrará textos que tratam dos sistemas produtivos em seus diversos aspectos, além de estudos que exploram diferentes perspectivas ou abordagens sobre a planta, o meio ambiente, o animal, o homem e a sociedade no ambiente rural.

É uma obra que fornece dados, informações e resultados de pesquisas tanto para pesquisadores e atuantes nas diversas áreas das Ciências Agrárias, como para o leitor que tenha a curiosidade de entender e expandir seus conhecimentos.

Este Volume IX traz 16 trabalhos de estudiosos de diversos países, divididos em dois eixos temáticos: *Eficiência e tecnologia na produção agrícola* e *Meio ambiente e produtividade agrícola*.

Desejo a todos uma proveitosa leitura!

Eduardo Eugênio Spers

SUMÁRIO

EFICIÊNCIA E TECNOLOGIA NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA

CAPÍTULO 1..... 1

USO EFICIENTE DA ÁGUA DE REGA EM OLIVAIS DE ELEVADA DENSIDADE: UMA VISÃO GERAL

Alexandra Tomaz

Justino Sobreiro

Manuel Patanita

Maria Isabel Patanita

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237981

CAPÍTULO 2..... 13

LOGICIELS POUR LA GESTION DE PLANTATIONS FORESTIÈRES

Edilson Batista de Oliveira

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237982

CAPÍTULO 3..... 42

DEVELOPMENT AND TEST OF A LOW-COST TUNNEL SPRAYER FOR VINEYARDS

Antonio Odair Santos

Cláudio Alves Moreira

Antônio Carlos Loureiro Lino

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237983

CAPÍTULO 4..... 57

CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS Y SOCIOECONÓMICAS DE LA PRODUCCIÓN DE MAÍZ EN UNIDADES DE PRODUCCIÓN FAMILIAR DE OAXACA, MÉXICO

Rafael Rodríguez Hernández

Pedro Cadena Iñiguez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237984

CAPÍTULO 5..... 69

EFEECTO DEL AGROPLASMA EN EL CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO DE LA KIWICHA, *AMARANTHUS CAUDATUS* VAR. OSCAR BLANCO

Roger Veneros-Terrones

Claudia Díaz-Fernández

Lisi Cerna-Rebaza

Luis Felipe Gonzales-Llontop

Vito Quilcat-León

Julio Chico- Ruiz

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237985

CAPÍTULO 6..... 84

ESTUDIO DE INFECCIÓN DE *CALIGUS ROGERCRESSEYI* EN SALMÓNIDOS DE CULTIVO POR MEDIO DE TÉCNICAS DE MACHINE LEARNING

Patricio R. de los Ríos-Escalante

Juan Barile

Eriko Carreño

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237986

CAPÍTULO 7 93

DESARROLLO DE UN LENGUAJE DE INTERCOMUNICACIÓN PARA LA INTEGRACIÓN COLABORATIVA ENTRE DISPOSITIVOS HARDWARE HETEROGÉNEOS Y COMPONENTES SOFTWARE EN EL DOMINIO DE LA GANADERÍA DE PRECISIÓN EN MONOGÁSTRICOS

Vicente López Sacanell

Jesús Pomar Gomá

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237987

MEIO AMBIENTE E PRODUTIVIDADE AGRÍCOLA

CAPÍTULO 8..... 101

DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO COMO ENSAYO DE IDENTIDAD PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE UN REMEDIO HERBOLARIO

Guadalupe Yáñez Ibarra

Gabriela Victoria Ruiz Castillo

Ana María Hanan Alipi

Roberto Hernández Villarreal

Gabriela Ávila Villarreal

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237988

CAPÍTULO 9.....112

PRESENCIA DEL SUGARCANE YELLOW LEAF VIRUS EN *Saccharum* SPP. EN MÉXICO Y FILOGENIA DE UN AISLADO DE COLIMA

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán

María Inés Barbosa Villa

Karina de la Paz García Mariscal

Claudia Yared Michel López

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2602237989

CAPÍTULO 10..... 127

CHARACTERIZATION OF PHENOLOGICAL STAGES AND GRAPE QUALITY OF NINETEEN PORTUGUESE GRAPEVINE VARIETIES PRESENT IN THE DOURO REGION

Ivo Fartouce

Joana Amaral Pinto

Paula Cristina Oliveira

Elza Amaral

Rosa Matias

João Paulo Moura

Aureliano Malheiro

Ana Alexandra Oliveira

 https://doi.org/10.37572/EdArt_26022379810

CAPÍTULO 11..... 146

INFLUENCIA DE LAS BRISAS DE TIERRA Y MAR SOBRE EL MICROCLIMA DE LA CANOPIA

Gerardo Echeverría Grotiuz

Nicolás Demetriuk

 https://doi.org/10.37572/EdArt_26022379811

CAPÍTULO 12 161

CAPTURA DE CARBONO EN EL SUELO CON PRÁCTICAS DE MANEJO AGRONÓMICO EN MAÍZ PARA GRANO DE TEMPORAL

Hugo Ernesto Flores-López





Gloria Vidrio-Llamas

Irma Julieta González-Acuña

Celia de la Mora-Orozco

Humberto Ramírez-Vega

 https://doi.org/10.37572/EdArt_26022379812

CAPÍTULO 13	169
RECURSOS GENÉTICOS DEL MAÍZ DESPOJO Y RESISTENCIA	
Yolanda Cristina Massieu Trigo	
 https://doi.org/10.37572/EdArt_26022379813	
CAPÍTULO 14	179
INSUMOS AGROECOLÓGICOS PARA MANEJO DEL AMARILLAMIENTO EN NARANJA VALENCIA TARDÍA (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck) EN VERACRUZ, MÉXICO	
Manuel Ángel Gómez Cruz	
Laura Gómez Tovar	
María de los Ángeles Hernández-Andrade	
Asunción Gálvez-Mendoza	
Luis Enrique Ortiz-Martínez	
 https://doi.org/10.37572/EdArt_26022379814	
CAPÍTULO 15	185
ANTIOXIDANTES <i>IN VITRO</i> : EFECTOS SOBRE VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN TRUCHA ARCOÍRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Walbaum, 1792)	
Eliana Ibáñez-Arancibia	
Iván Valdebenito Isler	
Jorge G. Farías	
 https://doi.org/10.37572/EdArt_26022379815	
CAPÍTULO 16	196
USE OF A PCR-RFLP MOLECULAR TEST FOR THE DIFFERENTIATION OF <i>Babesia bovis</i> AND <i>Babesia bigemina</i> IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE BABESIOSIS	
José Juan Lira Amaya	
Diego Jesús Polanco Martínez	
Rebeca Montserrat Santamaría Espinosa	
Grecia Martínez García	
Carmen Rojas Martínez	
Jesús Antonio Álvarez Martínez	
Julio Vicente Figueroa Millán	
 https://doi.org/10.37572/EdArt_26022379816	
SOBRE O ORGANIZADOR	208
ÍNDICE REMISSIVO	209

CAPÍTULO 1

USO EFICIENTE DA ÁGUA DE REGA EM OLIVAIS DE ELEVADA DENSIDADE: UMA VISÃO GERAL

Data de submissão: 11/01/2023

Data de aceite: 30/01/2023

Maria Isabel Patanita

Instituto Politécnico de Beja

Escola Superior Agrária

R. Pedro Soares, 7800-295

Beja, Portugal

GeoBioTec

Nova School of Science and Technology

Campus da Caparica, 2829-516

Caparica, Portugal

<https://orcid.org/0000-0002-6664-4883>

Alexandra Tomaz

Instituto Politécnico de Beja

Escola Superior Agrária

R. Pedro Soares, 7800-295

Beja, Portugal

GeoBioTec

Nova School of Science and Technology

Campus da Caparica, 2829-516

Caparica, Portugal

<https://orcid.org/0000-0001-9129-112X>

Justino Sobreiro

Instituto Politécnico de Beja

Escola Superior Agrária

R. Pedro Soares, 7800-295

Beja, Portugal

<https://orcid.org/0000-0001-8871-7409>

Manuel Patanita

Instituto Politécnico de Beja

Escola Superior Agrária

R. Pedro Soares, 7800-295

Beja, Portugal

GeoBioTec

Nova School of Science and Technology

Campus da Caparica, 2829-516

Caparica, Portugal

<https://orcid.org/0000-0002-2122-9950>

RESUMO: A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma cultura tradicionalmente de sequeiro, bem-adaptada aos ambientes Mediterrânicos, onde, em anos recentes, a rega foi introduzida para aumentar o rendimento em olivais de maior densidade. De facto, a rega possibilita plantações de maior densidade, levando a uma maior produtividade, uma exigência que os produtores devem enfrentar devido às maiores necessidades de abastecimento de alimentos. Apesar de os olivais regados de elevada densidade serem exemplos de sucesso em várias regiões mediterrânicas, a sua sustentabilidade implica o conhecimento das necessidades hídricas da oliveira e da forma como a água é usada ao longo do seu ciclo de desenvolvimento. Este conhecimento permite a adoção de práticas culturais que possam garantir uma melhor eficiência no uso de recursos hídricos limitados, como é o caso das estratégias de rega deficitária.

PALAVRAS-CHAVE: Olivais de elevada densidade. Olivais de regadio. Rega deficitária. Eficiência no uso da água.

EFFICIENT USE OF IRRIGATION IN HIGH DENSITY OLIVE ORCHARDS: AN OVERVIEW

ABSTRACT: The olive tree (*Olea europaea* L.) is a traditionally non-irrigated crop, well adapted to Mediterranean environments, where irrigation was introduced in recent years to increase yields in higher density orchards. In fact, irrigation enables high density plantings, leading to higher productivity which is also a requirement that growers must face due to higher needs of food supply. Despite that high-density irrigated olive orchards are examples of success in several Mediterranean regions, its sustainability implies the knowledge of the water requirements of the olive tree and the way in which water is used throughout its development cycle. This knowledge allows for the adoption of crop management practices that can ensure better efficiency in the use of limited water resources, as is the case of deficit irrigation strategies.

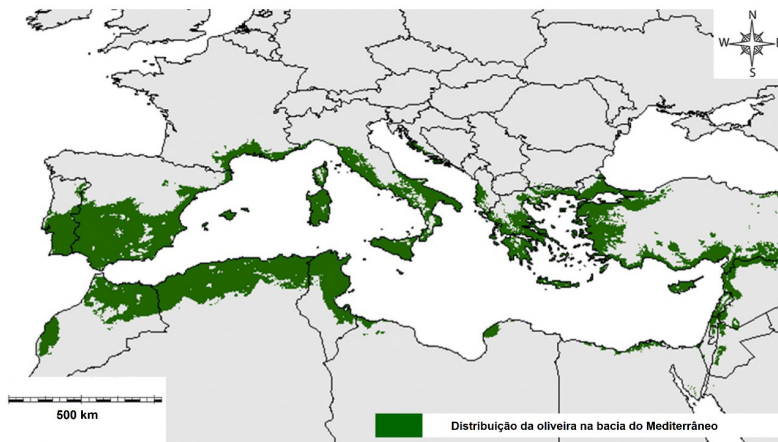
KEYWORDS: High density olive orchards. Irrigated olive orchards. Deficit irrigation. Water use efficiency.

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, a oliveira tem sido cultivada na região circundante do Mediterrâneo, sobretudo como uma cultura de sequeiro, com baixa produtividade, resultante do ambiente seco desta região (Figura 1). A bacia do Mediterrâneo caracteriza-se por apresentar uma baixa razão entre a precipitação anual e a evapotranspiração potencial, relação conhecida como Índice de Aridez (AI) da UNEP (*United Nations Environmental Programme*) (UNEP, 1992), com valores predominantemente nos intervalos 0.50 – 0.65 (Clima Sub-húmido seco) e 0.20 – 0.50 (Clima Semiárido) (GAO; GIORGI, 2008).

Nos últimos anos, a expansão na produção de azeite e de azeitona de mesa tem sido alcançada através do aumento da área plantada e também da intensificação (dentro e fora dos países mediterrânicos), através do aumento da densidade dos olivais e da introdução do regadio (CARR, 2013).

Figura 1. Distribuição da oliveira na bacia do Mediterrâneo. Adaptado do original “Examining Potential Environmental Consequences of Climate Change and Other Driving Forces on the Sustainability of Spanish Olive Groves under a Socio-Ecological Approach”, de RODRÍGUEZ SOUSA et al. (2020), usado sob CC BY 4.0.



De facto, nas últimas duas décadas, têm-se desenvolvido olivais mais densos, vulgarmente chamados intensivos (200 a 600 árvores ha⁻¹) e superintensivos (1000 a 2500 árvores ha⁻¹) que designaremos, respetivamente, olivais em vaso e olivais em sebe. O principal objetivo deste aumento de densidade de plantação é reduzir os custos de mão-de-obra através da utilização de máquinas de colheita. A redução dos compassos nestes sistemas leva a uma redução do volume de solo disponível para cada árvore e ao aumento das necessidades em água pelo que a rega é geralmente necessária (CONNOR, 2005; P. STEDUTO, T. HSIAO, E. FERERES, D. RAES, 2012).

O aumento da área deste tipo de olivais de maior densidade tem levado a mudanças relevantes da paisagem de algumas regiões, como o é o caso do Sul de Portugal. Este desenvolvimento tem sido acompanhado de um aumento da pressão da opinião pública relacionado com perceções frequentemente pouco fundamentadas sobre os impactos negativos desta intensificação agrícola no ambiente. Por outro lado, a escassez de água nas regiões olivícolas tradicionais, a par da atual e esperada diminuição dos recursos hídricos, consequência da mudança climática, implicam a necessidade de reduzir a utilização de água para rega das culturas nestas regiões.

Tendo em consideração o acima exposto, neste trabalho pretende-se dar uma perspetiva geral acerca: (i) do uso da água pela oliveira e (ii) das estratégias que se podem adotar para mitigar as necessidades em rega e aumentar a eficiência no uso da água em olivais de elevada densidade de plantação.

2 NECESSIDADES HÍDRICAS DA OLIVEIRA

2.1 CONCEITOS

As necessidades hídricas (CWR – *Crop Water Requirements*) definem-se como a quantidade de água necessária para fazer face àquela que é perdida por evapotranspiração de uma cultura livre de doenças ou pragas, crescendo em áreas extensas, sem limitações de água e nutrientes, alcançando o pleno potencial produtivo nestas condições agroambientais. Esta perda de água corresponde à Evapotranspiração Cultural (ET_c) sob condições padrão, dada por:

$$ET_c = ET_0 \times K_c \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde ET_0 é a evapotranspiração de referência de uma cultura tipo relva e K_c é o coeficiente cultural (ALLEN et al., 1998; DOORENBOS; PRUITT, 1977). Efetivamente, a ET_0 corresponde a um índice de procura climática, representativo do poder evaporante

da atmosfera, e o K_c representa a influência das características específicas da cultura (PEREIRA; ALVES, 2005). No caso de oliveais em condições climáticas e agronômicas padrão, os valores de K_c recomendados pela FAO variam entre 0.65, na fase inicial, e 0.70, nas fases intermédia e final do ciclo de desenvolvimento da oliveira (ALLEN et al., 1998). Valores mensais de K_c propostos por PASTOR; ORGAZ (1994) para oliveais variam entre 0.45, nos meses de julho e agosto, e 0.65, em março e em maio (Quadro 1).

Para atender à redução da fração de solo coberta por vegetação, ou fração de área sombreada (C , em %) em oliveais (FERERES; CASTEL, 1981) propuseram que a ET_c se estimasse fazendo:

$$ET_c = ET_0 \times K_c \times K_r \quad (\text{Eq. 2})$$

onde K_r deve ser usado quando a fração de cobertura é inferior a 50% e corresponde a um coeficiente de redução, sendo dado por:

$$K_r = \frac{2 \cdot C}{100} \quad (\text{Eq. 3})$$

Quadro 1. Coeficientes culturais para oliveais (PASTOR; ORGAZ, 1994)

Mês	K_c
Jan	0.50
Fev	0.50
Mar	0.65
Abr	0.60
Mai	0.65
Jun	0.50
Jul	0.45
Ago	0.45
Set	0.55
Out	0.60
Nov	0.65
Dez	0.50

Em culturas regadas, deve ainda considerar-se o conceito de necessidades em água de rega (IWR – *Irrigation Water Requirements*), correspondentes ao volume de água a aplicar na rega necessário para satisfazer as necessidades hídricas da cultura, quando a precipitação, reserva de água disponível no solo e/ou reserva de água subterrânea são insuficientes (PEREIRA; ALVES, 2005).

2.2 NECESSIDADES HÍDRICAS AO LONGO DO CICLO

As necessidades de água das oliveiras são uma função das características da variedade, da gestão agronómica e das exigências ambientais. As oliveiras resistem a longos períodos de seca e podem sobreviver em plantações muito esparsas, mesmo em climas com precipitação anual muito baixa. Intervalos de valores de precipitação total anual para a produção de azeite encontrados na literatura são variados e, até, díspares, referindo-se desde a mínimos requeridos para que a oliveira produza até valores necessários para olivais de elevada densidade de árvores adultas (Quadro 2).

No que respeita a dotações de rega tipicamente aplicadas em olivais em Portugal continental, DUARTE [s.d.] refere intervalos de valores de 1950 a 3490 m³ ha⁻¹ e de 3010 a 5190 m³ ha⁻¹, respetivamente, para olivais em vaso e em sebe.

As oliveiras são árvores perenifólias que utilizam água durante todo o ano, mas, independentemente das condições de cultura que afetam o uso sazonal da água, têm uma sensibilidade variável ao défice hídrico, dependendo da sua fase de desenvolvimento.

Quadro 2. Alguns valores de precipitação total anual (P) durante o ciclo da oliveira encontrados na literatura.

Referência	P (mm)	Observações
P. STEDUTO, T. HSIAO, E. FERERES, D. RAES (2012)	150 – 200	Valores mínimos para obtenção de produção
CARR (2013)	200-250	Valores mínimos para obtenção de produção,
CARR (2013)	≥ 600	Valores para uma produção economicamente viável, em conjunto com solos com boa capacidade de armazenamento de água
BEEDE; GOLDHAMER (2005)	950	Para oliveiras maduras em pomares plantados com 60% ou mais de área sombreada

Embora o stress hídrico durante o período de formação dos gomos florais possa levar a um número reduzido de flores, afetando assim o rendimento do ano corrente, quando ocorre durante os períodos de lançamento dos ramos, pode afetar o rendimento do próximo ano, que é formado nos rebentos com um ano de idade (BEEDE; GOLDHAMER, 2005; LIGHTLE; CONNELL, 2018; SBITRI; SERAFINI, 2007).

Para a produção de azeite, a fase de frutificação deve ser gerida de forma a maximizar a extração e a qualidade do azeite. Vários estudos têm reportado que níveis intermédios de rega, em associação com a adoção de rega deficitária, durante certas fases do desenvolvimento dos frutos podem aumentar a qualidade das azeitonas e do azeite (BERENQUER et al., 2004; FREIHAT; SHANNAG; ALKELANI, 2021; GÓMEZ-DEL-CAMPO, 2013; GRATTAN et al., 2006). Adicionalmente, o abrandamento do desenvolvimento dos

frutos – conhecido como fase de endurecimento do caroço – é considerado como o período em que as oliveiras são menos sensíveis ao déficit hídrico, sendo possível nesta fase reduzir ou interromper a rega, sem uma redução significativa do rendimento ou da qualidade do azeite (PALESE et al., 2010; SIAKOU et al., 2021; ZELEKE et al., 2012).

3 ESTRATÉGIAS DE REGA EM OLIVAIIS DE ELEVADA DENSIDADE

A gestão da rega em oliveiras seguindo regimes hídricos para otimizar a produtividade da água pode ser uma opção eficaz para equilibrar o desenvolvimento vegetativo, o rendimento e a qualidade das azeitonas, simultaneamente, garantindo a conservação da água (FERNANDES-SILVA et al., 2010; FERNÁNDEZ et al., 2018; MORIANA et al., 2003). Estes regimes de rega incluem a rega de suplemento (SI – *Supplemental Irrigation*) e estratégias de rega deficitária (DI – *Deficit Irrigation*).

3.1 REGA DE SUPLEMENTO

A SI pode ser definida como a aplicação de uma quantidade limitada de água de rega para aumentar e estabilizar o rendimento das culturas quando a precipitação não fornece água suficiente para o crescimento das plantas (OWEIS, 1997). A SI é maioritariamente utilizada em condições de sequeiro, através da distribuição da rega em fases fenológicas selecionadas, com os objetivos de alcançar o máximo rendimento e eliminar as flutuações interanuais de produção causadas por défices hídricos (DEBAEKE; ABOUDRARE, 2004; FERNÁNDEZ et al., 2018). Os estudos relativos ao efeito da SI nas respostas produtivas das oliveiras, envolvem principalmente olivais tradicionais, de baixa densidade, em condições semiáridas (ATTALLA et al., 2011; DRAIE; ALHAJ-RABIE; AL-MAHMOUD, 2020; FREIHAT; SHANNAG; ALKELANI, 2021; LODOLINI et al., 2016).

3.2 REGA DEFICITÁRIA

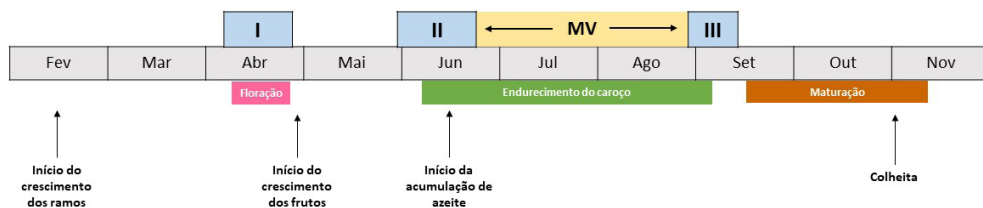
A DI é amplamente adotada noutras culturas resistentes à seca, sendo o exemplo mais relevante a vinha (MCCARTHY et al., 2000). As estratégias de DI baseiam-se em fornecer volumes de rega inferiores às necessidades da cultura em condições de crescimento não limitantes, ou seja, abaixo da ET_c potencial, permitindo poupança de água em regiões com recursos hídricos limitados, sem comprometer a produção (FERERES; SORIANO, 2006).

Podem considerar-se três estratégias de rega deficitária: (i) Rega deficitária sustentada (SDI – *Sustained Deficit Irrigation*); (ii) rega deficitária controlada (RDI – *Regulated Deficit Irrigation*); (iii) rega parcial de raízes (PRD – *Partial Root-zone Drying*).

Na SDI, as dotações de rega utilizadas em qualquer momento durante o ciclo de desenvolvimento são menores que a evapotranspiração da cultura, com base na ideia de distribuir uniformemente o défice de água ao longo do ciclo (GALINDO et al., 2018). Desta forma, o défice da água aumenta progressivamente à medida que o ciclo avança devido à combinação da aplicação uniforme de uma quantidade reduzida de água e do esgotamento da água do solo disponível. Isto permite que o stress hídrico se desenvolva lentamente e que as plantas se adaptem ao défice, quando os solos apresentam uma capacidade significativa de armazenamento de água (FERERES; SORIANO, 2006). Estudos de destaque sobre os efeitos da SDI em oliveais de elevada densidade foram publicados por GOLDHAMER; DUNAL; FERGUSON (1994), GRATTAN et al., (2006) ou FERNANDES-SILVA et al. (2010). Outros estudos sobre a estratégia SDI aplicada em oliveais de elevada e muito elevada densidade, geralmente, consistem em comparações com outras estratégias, como a RDI, e os resultados obtidos apontam para respostas de rendimento semelhantes (INIESTA et al., 2009; MORIANA et al., 2003; SIAKOU et al., 2021).

A RDI consiste na redução ou interrupção da rega durante períodos específicos de ciclo de desenvolvimento da oliveira, manipulando as respostas vegetativas e reprodutivas da cultura (DRY et al., 2001). O período de menor sensibilidade da oliveira ao défice de água é o de meados do verão, coincidindo parcialmente com a fase de endurecimento do caroço, altura em que é possível reduzir ou interromper a rega sem que tal provoque uma redução significativa do rendimento nem uma diminuição da qualidade do azeite (FERNÁNDEZ et al., 2013; LIGHTLE; CONNEL, 2018; PALESE et al., 2010) (Figura 2). No entanto, durante determinadas fases do ciclo de crescimento, as dotações de rega aplicadas devem equilibrar ou estar próximos das necessidades da água da cultura (Quadro 3).

Figura 2. I, II e III são os períodos em que as oliveiras são mais sensíveis ao stress hídrico. MV é o período de meados do verão, quando é normalmente possível reduzir ou interromper a rega, sob estratégias de rega deficitária controlada (adaptado de FERNÁNDEZ et al. (2013).



Os estudos relativos à aplicação de estratégias de RDI em oliveais em vaso e em sebe baseiam-se geralmente nas fases de interrupção ou redução da rega durante o

meio do verão e/ou imediatamente antes e depois deste período (FERNÁNDEZ et al., 2013; GÓMEZ-DEL-CAMPO, 2013, p.; INIESTA et al., 2009; MORIANA et al., 2003).

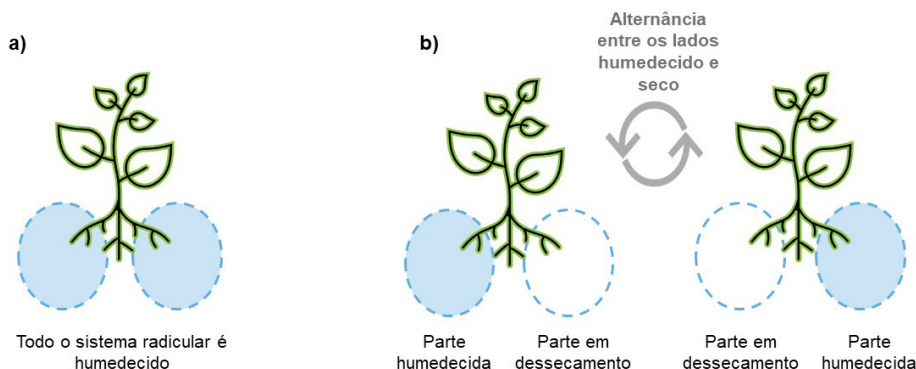
Quadro 3. Fases do ciclo em que as oliveiras são mais sensíveis ao stress hídrico (FERNÁNDEZ et al., 2013).

Fase	Fase de sensibilidade ao stress hídrico
I	Desde as últimas fases do desenvolvimento floral até à floração completa, normalmente em abril, quando o stress hídrico pode afetar a fertilização das flores.
II	A partir do final da primeira fase de desenvolvimento da azeitona, normalmente em junho, quando o stress hídrico provoca a redução do tamanho dos frutos.
III	Após o período de meados do verão, normalmente desde o final de agosto até meados de setembro, quando ocorre um aumento acentuado da acumulação de azeite.

Normalmente, são testadas diferentes percentagens de redução dos volumes de rega com o objetivo de compreender o limiar em que a redução do rendimento dos frutos causada pelo stress hídrico pode ser compensada pela manutenção/aumento da percentagem e qualidade de azeite extraído (FERNÁNDEZ et al., 2013; GÓMEZ-DEL-CAMPO, 2013, p.; VOSSEN et al., 2008). Além disso, o estado hídrico das oliveiras pode ser monitorizado e estas medições são usadas para definir limiares para a aplicação da rega. Os parâmetros fisiológicos mais utilizados são: (i) o potencial hídrico foliar (ψ) ou dos ramos (ψ_{Stem}), medido em diferentes horas do dia, normalmente, de madrugada ou ao meio-dia solar (AHUMADA-ORELLANA et al., 2017; BEN-GAL et al., 2021, p.; FERNANDES-SILVA et al., 2010; FERNÁNDEZ et al., 2013; MARINO et al., 2018); (ii) as trocas gasosas ao nível dos estomas, nomeadamente, a condutância estomática (g_s), as taxas de fotossíntese (A_N) e de evapotranspiração (E) (FERNÁNDEZ et al., 2006; MARINO et al., 2018).

A estratégia de PRD requer que aproximadamente metade do sistema radicular se mantenha em dessecação enquanto a outra metade é humedecida pela rega, alternando-se as partes regadas e não regadas periodicamente (Figura 3). O enquadramento teórico desta estratégia é o de que a rega de parte das raízes mantém a parte aérea das culturas em condições hídricas favoráveis, enquanto a falta de água no sistema radicular remanescente promove sinais químicos que são transportados para a parte superior das plantas, induzindo a redução da condutância estomática e do crescimento dos ramos (CHAVES et al., 2002; DODD et al., 2006; JOVANOVIC; STIKIC, 2018). O objetivo do PRD será então o de reduzir as perdas de água por transpiração sem afetar o rendimento.

Figura 3. Representação esquemática do padrão de humedecimento do sistema radicular em a) rega de conforto hídrico e b) rega parcial de raízes (PRD).



Em geral, os trabalhos sobre os efeitos da estratégia de PRD em oliveiras de elevada densidade desenvolvendo-se em condições semiáridas têm em comum uma ligeira redução do rendimento, embora com elevada produtividade da água e manutenção do rendimento em azeite (ABBOUD et al., 2019; GHRAB et al., 2013; WAHBI et al., 2005).

4 CONCLUSÃO

A expansão na produção oleícola em muitas regiões do Mediterrâneo tem sido alcançada através do aumento da área plantada, da introdução do regadio e do aumento da densidade dos oliveiros, levando ao aumento das necessidades em água para rega dos mesmos. A utilização de estratégias como a rega deficitária sustentada, a rega deficitária controlada ou a rega parcial de raízes, é hoje comum em diversas culturas bem-adaptadas a ambientes Mediterrânicos, resistentes à seca, e a oliveira não é exceção. O recurso a estas opções de gestão da rega nos oliveiros modernos pode ser uma forma eficiente de utilizar o recurso água, cuja escassez se prevê que aumente como resultado da mudança climática e da pressão pelo seu uso exercida por outros setores de produção ou económicos.

5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho é uma contribuição para o projeto GeoBioTec (UIDB/04035/2020), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

REFERÊNCIAS

ABBOUD, S. et al. Differential agro-physiological responses induced by partial root-zone drying irrigation in olive cultivars grown in semi-arid conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 167, p. 103863, 2019.

- ADU, M. O. et al. Meta-analysis of crop yields of full, deficit, and partial root-zone drying irrigation. **Agricultural Water Management**, v. 197, p. 79–90, 2018.
- AHUMADA-ORELLANA, L. E. et al. Yield and Water Productivity Responses to Irrigation Cut-off Strategies after Fruit Set Using Stem Water Potential Thresholds in a Super-High Density Olive Orchard. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- ALLEN, R. G. et al. **Crop evapotranspiration - Guidelines for computing crop water requirements**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998.
- BEEDE, R. H.; GOLDHAMER, D. A. Olive irrigation management. Em: SIBBETT, G. S.; FERGUSON, L. (Eds.). **Olive Production Manual**. University of California Publication. [s.l.] UCANR Publications, 2005. p. 61–69.
- BEN-GAL, A. et al. Evaluation of regulated deficit irrigation strategies for oil olives: A case study for two modern Israeli cultivars. **Agricultural Water Management**, v. 245, p. 106577, 2021.
- BERENQUER, M. J. et al. Irrigation management to optimize olive growth, production and sensorial oil quality. **Acta Horticulturae**, p. 79–85, dez. 2004.
- CARR, M. The water relations and irrigation requirements of olive (*Olea europaea* L.): A review. **Experimental Agriculture**, v. 49, out. 2013.
- CHAVES, M. M. et al. How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 907–916, 15 jun. 2002.
- CONNOR, D. Adaptation of olive (*Olea europaea* L.) to water-limited environments. **Australian Journal of Agricultural Research - AUST J AGR RES**, v. 56, 1 jan. 2005.
- DEBAEKE, P.; ABOUDRARE, A. Adaptation of crop management to water-limited environments. **European Journal of Agronomy**, v. 21, n. 4, p. 433–446, 2004.
- DODD, I. C. et al. Alternation of wet and dry sides during partial rootzone drying irrigation alters root-to-shoot signalling of abscisic acid. **Functional Plant Biology**, v. 33, n. 12, p. 1081–1089, 2006.
- DOORENBOS, J.; PRUITT, W. O. **Guidelines for predicting crop water requirements**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1977.
- DRY, P. R. et al. Strategic irrigation management in Australian vineyards. **OENO One**, v. 35, n. 3, p. 129–139, 30 set. 2001.
- DUARTE, A. C. **Guia Boas Práticas para o Uso Eficiente da Água no Setor Olivícola**. [s.l.: s.n.].
- FERERES, E.; CASTEL, J. R. **Drip irrigation management**. [s.l.] Division of Agricultural Sciences, University of California, 1981.
- FERERES, E.; SORIANO, M. A. Deficit irrigation for reducing agricultural water use. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 147–159, nov. 2006.
- FERNANDES-SILVA, A. A. et al. Influence of different irrigation regimes on crop yield and water use efficiency of olive. **Plant and Soil**, v. 333, n. 1, p. 35–47, 1 ago. 2010.
- FERNÁNDEZ, J. E. et al. Water relations and gas exchange in olive trees under regulated deficit irrigation and partial rootzone drying. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1, p. 273–291, 1 jun. 2006.

- FERNÁNDEZ, J. E. et al. A regulated deficit irrigation strategy for hedgerow olive orchards with high plant density. **Plant and Soil**, v. 372, n. 1, p. 279–295, 1 nov. 2013.
- FERNÁNDEZ, J. E. et al. Chapter 9 - Precision Irrigation in Olive (*Olea europaea* L.) Tree Orchards. Em: GARCÍA TEJERO, I. F.; DURÁN ZUAZO, V. H. (Eds.). **Water Scarcity and Sustainable Agriculture in Semiarid Environment**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 179–217.
- FREIHAT, N. M.; SHANNAG, H. K.; ALKELANI, M. A. Effects of supplementary irrigation on performance of 'Nabali' and 'Grossa de Spain' olives under semi-arid conditions in Jordan. **Scientia Horticulturae**, v. 275, p. 109696, 2021.
- GALINDO, A. et al. Deficit irrigation and emerging fruit crops as a strategy to save water in Mediterranean semiarid agrosystems. **Agricultural Water Management**, v. 202, p. 311–324, 2018.
- GAO, X.; GIORGI, F. Increased aridity in the Mediterranean region under greenhouse gas forcing estimated from high resolution simulations with a regional climate model. **Global and Planetary Change**, v. 62, n. 3, p. 195–209, 2008.
- GHRAB, M. et al. Water relations and yield of olive tree (cv. Chemlali) in response to partial root-zone drying (PRD) irrigation technique and salinity under arid climate. **Agricultural Water Management**, v. 123, p. 1–11, 2013.
- GOLDHAMER, D. A.; DUNAI, J.; FERGUSON, L. F. **Irrigation requirements of olive trees and responses to sustained deficit irrigation**. Acta Horticulturae. **Anais...International Society for Horticultural Science (ISHS)**, Leuven, Belgium, 1 jan. 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.356.36>>
- GÓMEZ-DEL-CAMPO, M. Summer deficit-irrigation strategies in a hedgerow olive orchard cv. 'Arbequina': effect on fruit characteristics and yield. **Irrigation Science**, v. 31, n. 3, p. 259–269, 1 maio 2013.
- GRATTAN, S. et al. Olive oil production as influenced by different quantities of applied water. **Agricultural Water Management**, v. 85, p. 133–140, set. 2006.
- INIESTA, F. et al. The effects of regulated and continuous deficit irrigation on the water use, growth and yield of olive trees. **European Journal of Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 258–265, 2009.
- JOVANOVIĆ, Z.; STIKIĆ, R. Partial Root-Zone Drying Technique: from Water Saving to the Improvement of a Fruit Quality. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 1, 2018.
- LIGHTLE, D.; CONNELL, J. Drought Tip: Drought Strategies for Table and Oil Olive Production. **ANR Publication**, n. 8538, p. 5 pp., 2018.
- MARINO, G. et al. Gas Exchanges and Stem Water Potential Define Stress Thresholds for Efficient Irrigation Management in Olive (*Olea europea* L.). **Water**, v. 10, n. 3, 2018.
- MCCARTHY, M. et al. Regulated deficit irrigation and partial rootzone drying as irrigation management techniques for grapevines. **Deficit Irrigation Practices**, v. 22, p. 79–87, 1 jan. 2000.
- MORIANA, A. et al. Yield Responses of a Mature Olive Orchard to Water Deficits. **Journal of the American Society for Horticultural Science jashs**, v. 128, n. 3, p. 425–431, 2003.
- OWEIS, T. **Supplemental Irrigation: A Highly Efficient Water-Use Practice**. Aleppo, Syria: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), 1997.

P. STEDUTO, T. HSIAO, E. FERERES, D. RAES. **Crop yield response to water**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012.

PALESE, A. M. et al. Effects of water deficit on the vegetative response, yield and oil quality of olive trees (*Olea europaea* L., cv Coratina) grown under intensive cultivation. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 222–229, 2010.

PASTOR, M.; ORGAZ, F. Riego deficitario del olivar: los programas de recorte de riego en olivar. **Agricultura**, v. 746, p. 768–776, 1994.

PEREIRA, L. S.; ALVES, I. Crop Water Requirements. Em: HILLEL, D. (Ed.). **Encyclopedia of Soils in the Environment**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 322–334.

RODRÍGUEZ SOUSA, A. A. et al. Examining Potential Environmental Consequences of Climate Change and Other Driving Forces on the Sustainability of Spanish Olive Groves under a Socio-Ecological Approach. **Agriculture**, v. 10, n. 11, 2020.

SBITRI, M. O.; SERAFINI, F. **Production techniques in olive growing**. [s.l.] International Olive Council, 2007.

SIAKOU, M. et al. Effects of deficit irrigation on ‘Koroneiki’ olive tree growth, physiology and olive oil quality at different harvest dates. **Agricultural Water Management**, v. 258, p. 107200, 1 dez. 2021.

UNEP. **World Atlas of Desertification**. [s.l.: s.n.].

VOSSSEN, P. M. et al. **The influence of different levels of irrigation on the chemical and sensory properties of olive oil**. Acta Horticulturae. **Anais...** International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, 30 jun. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.791.66>>

WAHBI, S. et al. Effects of partial rootzone drying (PRD) on adult olive tree (*Olea europaea*) in field conditions under arid climate: I. Physiological and agronomic responses. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 106, n. 2, p. 289–301, 2005.

ZELEKE, K. et al. Oil content and fruit quality of nine olive (*Olea europaea* L.) varieties affected by irrigation and harvest times. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 40, n. 4, p. 241–252, 1 dez. 2012.

CAPÍTULO 2

LOGICIELS POUR LA GESTION DE PLANTATIONS FORESTIÈRES

Data de submissão: 04/01/2023

Data de aceite: 03/02/2023

Edilson Batista de Oliveira

Embrapa Florestas - Colombo, PR

Empresa Brasileira de

Pesquisa Agropecuária

Ministério da Agricultura

Pecuária e Abastecimento – BRASIL

Sponsor pour l'édition en Français

Agência Brasileira de

Cooperação (ABC)

Ministério das Relações

Exteriores do Brasil

edilson.oliveira@embrapa.br

<http://lattes.cnpq.br/5631628199397955>

RÉSUMÉ: Logiciels développés par l'Embrapa Forêts dénommés Sis, suivi du nom populaire de l'espèce forestière ou du genre botanique (SisEucalypto, SisPinus, SisTeca, etc.), décrivent la façon dont la forêt se développe et produit, conformément aux régimes de gestion que l'utilisateur lui-même indique. L'objectif est de guider le producteur à l'aide de technologies pour la gestion et la planification forestière, en fournissant des informations qui permettent d'optimiser la production tout en augmentant les revenus. Les utilisateurs peuvent à travers les logiciels tester chaque condition de climat et de sol, ainsi que toutes les options de gestion de la forêt, rendre des pronostics de

productions actuelles et futures, effectuer des analyses économiques, puis ne choisir que la meilleure alternative afin de la mettre en œuvre sur le terrain.

MOTS CLÉS: Production forestière. Assortiment. Arbres. Éclaircie. Économie.

SOFTWARES PARA O MANEJO DE PLANTAÇÕES FLORESTAIS

RESUMO: Softwares desenvolvidos pela Embrapa Florestas denominados Sis, seguido do nome popular da espécie florestal ou gênero botânico (SisEucalypto, SisPinus, SisTeca, etc.), descrevem como a plantação florestal cresce e produz, de acordo com os regimes de manejo que o próprio usuário indica. O objetivo é orientar o produtor utilizando tecnologias para o manejo e planejamento florestal, fornecendo informações que otimizem a produção e aumentem a renda. Os usuários podem, através dos softwares, testar para cada clima e condição de solo, todas as opções de manejo florestal, fazer previsões de produções atuais e futuras, realizar análises econômicas e, em seguida, escolher a melhor alternativa para implementar no campo.

PALAVRAS-CHAVE: Produção florestal. Sortimento. Árvores. Desbaste. Economia.

1 INTRODUCTION

Les logiciels présentés sont le résultat de près de trois décennies de recherche

scientifique et ont été conçus dans le but de répondre à une forte demande émanant des producteurs forestiers, conscients que les forêts administrées sans base scientifique mèneront très certainement à une grande perte de ressources économiques et environnementales.

Le travail a reçu le soutien précieux des entreprises forestières, qui étaient à la recherche d'une technologie afin de définir des régimes de gestion appropriés pour leurs plantations, et qui ont collaboré en fournissant les bases de données des inventaires de croissance et de production de leurs forêts.

Les logiciels dénommés **Sis**, suivi du nom populaire de l'espèce forestière ou du genre botanique (**SisAraucaria**, **SisPinus**, **SisTeca**, etc.), décrivent la façon dont la forêt se développe et produit, conformément aux régimes de gestion que l'utilisateur lui-même indique.

L'objectif est de guider le producteur à l'aide de technologies pour la gestion et la planification forestière, en fournissant des informations qui permettent d'optimiser la production tout en augmentant les revenus.

Les utilisateurs peuvent à travers les logiciels tester chaque condition de climat et de sol, ainsi que toutes les options de gestion de la forêt, rendre des pronostics de productions actuelles et futures, effectuer des analyses économiques, puis ne choisir que la meilleure alternative afin de la mettre en œuvre sur le terrain.

Les logiciels disposent d'un processus agile d'entrée et d'intégration de données. Ils peuvent simuler des éclaircies des forêts avec une prévision de la croissance du peuplement et de l'assortiment du bois par classe diamétrique pour des usages multiples des arbres provenant des éclaircies et de la coupe définitive.

En quantifiant le bois produit par type d'usage industriel, le producteur peut gérer ses forêts pour une production de bois orientée vers une utilisation plus rentable.

Logiciels	Espèces
SisAcacia	<i>Acacia meamsii</i>
SisAraucaria	<i>Araucaria angustifolia</i>
SisBracatinga	<i>Mimosa scabrella</i>
SisCedro	<i>Toona ciliata</i>
SisEucalipto	<i>E. dunnii, E. grandis, E. saligna, E. urograndis</i>
SisMogno	<i>Khaya spp</i>
SisPinus	<i>P. caribaea, P. elliottii, P. taeda</i>
SisTeca	<i>Tectona grandis</i>
Planin	Analyse économique

Logiciels gratuits: <https://www.cnpf.embrapa.br/software/>

2 QUI UTILISE LES SYSTÈMES?

- Entreprises/Institutions exerçant de diverses activités, notamment dans la gestion et la planification stratégique de la forêt.
- Entreprise d'assistance technique rurale, les instituts environnementaux, les coopératives, les secrétariats municipaux, les syndicats et les associations ont utilisé les systèmes pour apporter une assistance technique et aider à la mise en œuvre d'actions pour encourager le reboisement.
- Universités et Centres Technologiques, dans des activités d'enseignement, recherche et vulgarisation.
- Professionnels indépendants.
- Producteurs ruraux, de façon indépendante ou par une assistance technique.

3 GESTION FORESTIÈRE

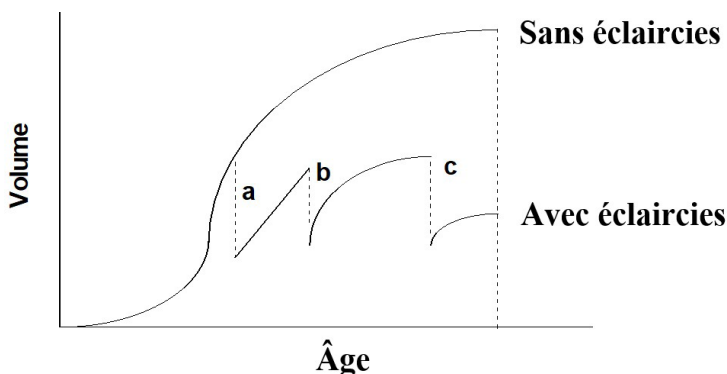
Les forêts, contrairement aux cultures agricoles, n'ont pas de systèmes de production fixes. Chaque peuplement a besoin d'une gestion spécifique, qui implique divers traitements tels que les éclaircies de différentes sortes, les intensités et périodes et les variations dans l'âge de la coupe définitive. Ces traitements peuvent varier selon des facteurs, tels que: l'objectif industriel de la production, la qualité du lieu (sol, climat), le matériel génétique, l'espacement et leur densité. Il suffit qu'un seul de ces facteurs soit modifié, pour que le régime idéal de gestion diffère lui aussi.

L'importance de ces facteurs est due à la raison suivante: au fur et à mesure que les arbres poussent dans un reboisement, la concurrence entre eux augmente concernant l'eau, la lumière et les nutriments. De ce fait, l'on procède à des éclaircies non seulement afin de réduire la concurrence excessive, mais aussi afin de prévoir un revenu anticipé au producteur. La méthode la plus répandue consiste à retirer les arbres de mauvaise qualité (e.g. les individus dominés, endommagés, blessés et/ou malades). Lorsque la compétition est plus intense, de nouvelles éclaircies doivent être réalisées, en supprimant certaines lignes et/ou des arbres, en conservant les meilleurs.

4 LES LOGICIELS

Pour opérationnaliser les simulateurs «**Sis**», l'utilisateur doit fournir les données d'inventaire de la forêt et les logiciels prévoient la croissance et la production, en indiquant la quantité de bois que la forêt produit, à n'importe quel âge. Ils sont capables de simuler des éclaircies et de tester n'importe quel régime de gestion forestière que l'on souhaite appliquer au niveau des peuplements .

Schéma de l'accroissement en volume en fonction de l'âge, d'une forêt avec éclaircies (a, b et c) et sans éclaircies.



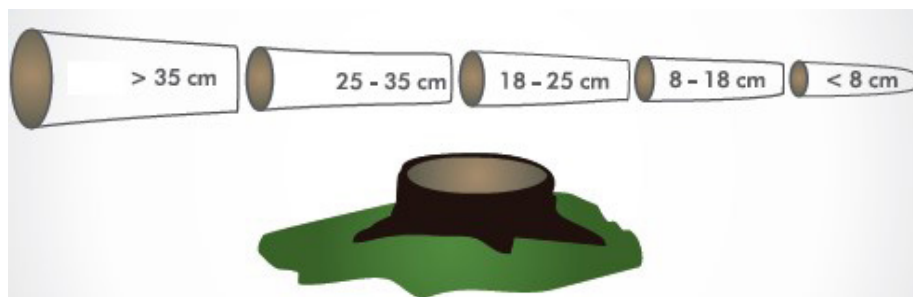
Le système aide à la prise de décision sur:

quand, combien et comment éclaircir,
et quand procéder à la coupe définitive.

Le système indique:

L'accroissement et la production de la forêt,
la production par classes diamétriques
et le volume de bois par type d'utilisation industrielle

Tronc avec assortiment en fonction des types de Billons.



Les logiciels permettent de calculer la biomasse et le carbone des compartiments des arbres, en fonction des équations que l'utilisateur introduit. Il est possible, par exemple, dans le cas de l'acacia noir d'estimer le poids de l'écorce.

Pour terminer, un logiciel nommé **Planin** a été conçu. Il incorpore des méthodes d'analyse économique permettant d'obtenir une vision commune des variables biologiques et économiques, ce qui permet une configuration rapide de scénarios pour la planification de la production forestière avec une optimisation de la production de bois en plus des rendements financiers.

Le **Planin** permet de calculer des paramètres de l'évaluation économique et financière ainsi que l'analyse de sensibilité de la rentabilité à différents taux d'attractivité. Il tient compte des divers segments des coûts opérationnels de mise en œuvre, d'entretien et d'exploitation forestière. Comme résultats, il fournit des flux de trésorerie, une analyse de sensibilité et des critères d'analyse économique-financière les plus utilisés. En outre, il permet à l'utilisateur de suivre ses coûts, en publiant des rapports avec des dépenses annuelles.

4.1 DONNÉES NÉCESSAIRES POUR LES SIMULATIONS

- **Configuration minimale:** Indice de station, nombre d'arbres par hectare et l'âge de la forêt.
- **Configuration complète:** Indice de station, nombre d'arbres par hectare, l'âge de la forêt et le diamètre moyen ou la surface terrière par hectare.

4.2 HAUTEUR DOMINANTE ET INDICE DE STATION

La croissance des arbres est directement affectée par les caractéristiques du LIEU ou de la STATION (sol et climat). Par conséquent, l'indice de station est une mesure de la productivité potentielle de la station, c'est-à-dire, la capacité d'un espace à pouvoir permettre la croissance d'une espèce particulière.

La qualité de la **station** peut être évaluée à l'aide de la croissance en hauteur des arbres dominants (Hauteur Dominante).

La définition la plus courante est celle qui prend en considération la hauteur moyenne arithmétique des 100 plus gros bois par hectare. Une autre définition prend en compte la hauteur moyenne des 100 bois les plus hauts du peuplement ou bien la Moyenne de la hauteur de 20% des arbres possédant les diamètres le plus importants ou les plus hauts du peuplement. Dans la pratique, il est assez commun de considérer comme Hauteur Dominante, la hauteur Moyenne des quatre arbres les plus hauts ou les plus gros dans une parcelle d'échantillonnage de 400 m².

En sciences forestières, l'indice de Station (S) a été la méthode la plus pratiquée et la plus répandue dans la détermination des classifications de qualité grâce à l'utilisation de la hauteur dominante dans un âge de référence (par exemple 15 ans). Ainsi, plus le « S » est élevé, plus la capacité de production du lieu est importante. Pour obtenir le «S» on utilise des graphiques tels que celui représenté dans la Figure 3 ou des Tableaux de Station comme dans le Tableau 1 pour le *Tectona grandis*, basé sur l'équation:

$$H = S * \exp(-4.6433 * (\text{Âge}^{-0.56} - 15^{-0.56}))$$

dans laquelle H représente la Hauteur Dominante et S l'Indice de Station.

Par exemple, au vu des informations de la croissance de *Pinus taeda*, si la Hauteur Dominante à 5 ans est de 9,0 mètres, l'Index de Station (15 ans) sera de 21,5 mètres. Si la Hauteur Dominante à 8 ans est de 12 mètres, l'IS (15 ans) sera de 18,5 m.

Tableau de classifications de station pour le *Pinus taeda*.

SISPINUS		<i>Pinus taeda</i>																									
		$S^{*exp}(-4,6433*(A^{\wedge}-0,56-15^{\wedge}-0,56))$																									
Âge	Indice de Station (m)																										
	$H_{dom}=IS^{*EXP}(-4,6433*(Age^{\wedge}-0,56-15^{\wedge}-0,56))$																										
	15,0	15,5	16,0	16,5	17,0	17,5	18,0	18,5	19,0	19,5	20,0	20,5	21,0	21,5	22,0	22,5	23,0	23,5	24,0	24,5	25,0	25,5	26,0				
2	1,8	1,8	1,9	2,0	2,0	2,1	2,1	2,2	2,3	2,3	2,4	2,4	2,5	2,6	2,6	2,7	2,7	2,8	2,9	2,9	3,0	3,0	3,1				
3	3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	4,1	4,2	4,3	4,4	4,5	4,6	4,7	4,8	5,0	5,1	5,2	5,3	5,4	5,5	5,6	5,7	5,9				
4	4,9	5,1	5,2	5,4	5,6	5,7	5,9	6,1	6,2	6,4	6,5	6,7	6,9	7,0	7,2	7,4	7,5	7,7	7,9	8,0	8,2	8,3	8,5				
5	6,3	6,5	6,7	6,9	7,1	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4	8,6	8,8	9,0	9,3	9,5	9,7	9,9	10,1	10,3	10,5	10,7	10,9				
6	7,6	7,8	8,1	8,3	8,6	8,8	9,1	9,3	9,6	9,8	10,1	10,4	10,6	10,9	11,1	11,4	11,6	11,9	12,1	12,4	12,6	12,9	13,1				
7	8,7	9,0	9,3	9,6	9,9	10,2	10,5	10,8	11,0	11,3	11,6	11,9	12,2	12,5	12,8	13,1	13,4	13,7	14,0	14,2	14,5	14,8	15,1				
8	9,8	10,1	10,4	10,7	11,1	11,4	11,7	12,0	12,4	12,7	13,0	13,3	13,7	14,0	14,3	14,6	15,0	15,3	15,6	15,9	16,3	16,6	16,9				
9	10,7	11,1	11,4	11,8	12,1	12,5	12,8	13,2	13,6	13,9	14,3	14,6	15,0	15,3	15,7	16,1	16,4	16,8	17,1	17,5	17,8	18,2	18,6				
10	11,6	12,0	12,3	12,7	13,1	13,5	13,9	14,3	14,7	15,0	15,4	15,8	16,2	16,6	17,0	17,4	17,7	18,1	18,5	18,9	19,3	19,7	20,1				
11	12,4	12,8	13,2	13,6	14,0	14,4	14,8	15,2	15,7	16,1	16,5	16,9	17,3	17,7	18,1	18,5	19,0	19,4	19,8	20,2	20,6	21,0	21,4				
12	13,1	13,5	14,0	14,4	14,8	15,3	15,7	16,2	16,6	17,0	17,5	17,9	18,3	18,8	19,2	19,6	20,1	20,5	21,0	21,4	21,8	22,3	22,7				
13	13,8	14,2	14,7	15,2	15,6	16,1	16,5	17,0	17,5	17,9	18,4	18,8	19,3	19,7	20,2	20,7	21,1	21,6	22,1	22,5	23,0	23,4	23,9				
14	14,4	14,9	15,4	15,9	16,3	16,8	17,3	17,8	18,3	18,7	19,2	19,7	20,2	20,7	21,1	21,6	22,1	22,6	23,1	23,5	24,0	24,5	25,0				
15	15,0	15,5	16,0	16,5	17,0	17,5	18,0	18,5	19,0	19,5	20,0	20,5	21,0	21,5	22,0	22,5	23,0	23,5	24,0	24,5	25,0	25,5	26,0				
16	15,6	16,1	16,6	17,1	17,6	18,1	18,7	19,2	19,7	20,2	20,7	21,3	21,8	22,3	22,8	23,3	23,8	24,4	24,9	25,4	25,9	26,4	27,0				
17	16,1	16,6	17,1	17,7	18,2	18,7	19,3	19,8	20,4	20,9	21,4	22,0	22,5	23,0	23,6	24,1	24,6	25,2	25,7	26,2	26,8	27,3	27,9				
18	16,6	17,1	17,7	18,2	18,8	19,3	19,9	20,4	21,0	21,5	22,1	22,6	23,2	23,7	24,3	24,8	25,4	25,9	26,5	27,0	27,6	28,2	28,7				
19	17,0	17,6	18,2	18,7	19,3	19,9	20,4	21,0	21,6	22,1	22,7	23,3	23,8	24,4	25,0	25,5	26,1	26,7	27,2	27,8	28,4	28,9	29,5				
20	17,5	18,0	18,6	19,2	19,8	20,4	20,9	21,5	22,1	22,7	23,3	23,9	24,4	25,0	25,6	26,2	26,8	27,3	27,9	28,5	29,1	29,7	30,3				
21	17,9	18,5	19,1	19,7	20,3	20,8	21,4	22,0	22,6	23,2	23,8	24,4	25,0	25,6	26,2	26,8	27,4	28,0	28,6	29,2	29,8	30,4	31,0				
22	18,3	18,9	19,5	20,1	20,7	21,3	21,9	22,5	23,1	23,7	24,3	25,0	25,6	26,2	26,8	27,4	28,0	28,6	29,2	29,8	30,4	31,0	31,7				
23	18,6	19,3	19,9	20,5	21,1	21,7	22,4	23,0	23,6	24,2	24,8	25,5	26,1	26,7	27,3	28,0	28,6	29,2	29,8	30,4	31,1	31,7	32,3				
24	19,0	19,6	20,3	20,9	21,5	22,2	22,8	23,4	24,1	24,7	25,3	26,0	26,6	27,2	27,9	28,5	29,1	29,8	30,4	31,0	31,6	32,3	32,9				
25	19,3	20,0	20,6	21,3	21,9	22,6	23,2	23,8	24,5	25,1	25,8	26,4	27,1	27,7	28,3	29,0	29,6	30,3	30,9	31,6	32,2	32,9	33,5				
26	19,7	20,3	21,0	21,6	22,3	22,9	23,6	24,2	24,9	25,5	26,2	26,9	27,5	28,2	28,8	29,5	30,1	30,8	31,4	32,1	32,8	33,4	34,1				
27	20,0	20,6	21,3	22,0	22,6	23,3	24,0	24,6	25,3	26,0	26,6	27,3	27,9	28,6	29,3	29,9	30,6	31,3	31,9	32,6	33,3	33,9	34,6				
28	20,3	20,9	21,6	22,3	23,0	23,6	24,3	25,0	25,7	26,3	27,0	27,7	28,4	29,0	29,7	30,4	31,1	31,7	32,4	33,1	33,8	34,4	35,1				
29	20,5	21,2	21,9	22,6	23,3	24,0	24,7	25,3	26,0	26,7	27,4	28,1	28,8	29,4	30,1	30,8	31,5	32,2	32,9	33,6	34,2	34,9	35,6				
30	20,8	21,5	22,2	22,9	23,6	24,3	25,0	25,7	26,4	27,1	27,8	28,5	29,1	29,8	30,5	31,2	31,9	32,6	33,3	34,0	34,7	35,4	36,1				

Les logiciels ont des Equations de Station remplaçables par l'utilisateur par d'autres qui sont disponibles dans la littérature ou qu'il peut lui même développer. Elles représentent les comportements moyens de la dynamique d'accroissement de chaque espèce dans les régions de plantation au Brésil. Cela ne signifie pas production moyenne car la même équation peut aussi bien décrire des petites valeurs de croissance que des valeurs élevées en fonction de l'Index de Station.

Les Tableaux de Classification de Station correspondants aux équations des logiciels sont présentés à la fin de manuel.

4.3 EQUATIONS DE VOLUME

Les équations les plus simples afin d'estimer le volume des arbres ou des plantations forestières sont basées sur le diamètre à 1,3 m du sol, ou DHP diamètre à

la hauteur de la poitrine (D), sur la hauteur de l'arbre (H) et sur le coefficient de forme (f), qui est obtenu à travers la division du volume réel de l'arbre par le volume d'un cylindre de diamètre D et de longueur H. Ainsi donc, le modèle d'une équation de volume (v) est: $V = 0,7854 \cdot f \cdot D^2 H$

Plus le tronc est cylindrique, plus proche de 1,0 se trouve le coefficient de forme. Sur un araucaria d'âge avancé, il peut excéder 0,80. Comme le coefficient de forme a tendance à augmenter avec l'âge, les logiciels permettent d'inclure cette variation. Dans le SisAraucaria l'expression consacrée est $V = 0,7854 \cdot (0,35 + 0,004 \cdot \hat{\text{Age}}) \cdot D^2 H$. Dans ce cas, le coefficient de forme qui à 20 ans était de 0,43, pourra être de 0,51 à 40 ans.

4.4 EQUATIONS D'ASSORTIMENT

Les équations d'assortiment (ou équations de défilement du fût) décrivent de façon mathématique le profil longitudinal d'un tronc. Elles permettent de construire des tables de volume pour les différentes dimensions de billes imposées par le marché. Il est possible à l'aide de ces tables, de calculer séparément par des méthodes mathématiques d'intégration partielle, le volume pour la stratification, la scierie, la cellulose et l'énergie, selon les diamètres et longueurs que l'utilisateur spécifie pour les billes.

Le modèle suivant est largement utilisé pour le calcul du volume de billes de plantations forestières:

$$\frac{d_i}{D} = b_1 \left(\frac{h_i}{H} \right) + b_2 \left(\frac{h_i}{H} \right)^2 + b_3 \left(\frac{h_i}{H} \right)^3 + b_4 \left(\frac{h_i}{H} \right)^4$$

Dans lequel:

$\frac{d_i}{D}$ = diamètre relatif et $\frac{h_i}{H}$ = hauteur relative

D = DHP ou diamètre à hauteur de poitrine ($D_{1,3m}$) et H = hauteur totale de l'arbre

d_i = diamètre mesuré à la hauteur h_i du fût

b_1 à b_4 = coefficients.

Sur l'écran de l'Equation d'Assortiment est sollicitée l'intégrale de celle-ci élevée au carré. Pour obtenir cette intégrale, entrer l'élément "**Autres**" présenté sur la barre supérieure du logiciel, solliciter l'option "**Equation d'Assortiment**" et un tableau préconfiguré sera disponible pour ce calcul.

Dans la deuxième barre d'édition, appelée "**Expression**", l'équation devra être insérée et la lettre D (représentant le DHP) devra figurer en multipliant toute l'expression, comme dans l'écran précédent.

4.5 ECLAIRCIES

Les éclaircies permettent de réduire le nombre d'arbres par parcelle ou zone au fur et à mesure que le peuplement nécessite plus d'espacement entre les arbres. L'une des façons de pratiquer l'éclaircie consiste à maintenir les meilleurs arbres, tout en éliminant ceux ayant subi des dégâts, les arbres malades ou endommagés ainsi que ceux ayant subi des attaques intenses de ravageurs. Une éclaircie bien planifiée et exécutée peut augmenter la garantie d'obtenir un produit final de meilleure qualité, une augmentation de la rentabilité économique du peuplement ainsi que de prévoir un bénéfice économique pour le producteur.

Les éclaircies peuvent être:

- **Systématiques:** Lorsque l'on supprime les arbres d'un système fixe choisi, selon la disposition du peuplement. Par exemple, le retrait d'une rangée entière d'arbres, intercalée avec d'autres rangées qui elles demeurent intactes;
- **Sélectives:** consiste à retirer les arbres de petit diamètre du peuplement (éclaircie «par le bas»). Aussi bien le diamètre que la hauteur peuvent être utilisés comme variable lors du choix des arbres devant être retirés;
- **Mixtes:** l'on nomme de cette façon l'éclaircie durant laquelle on procède en premier lieu à une éclaircie systématique puis à une éclaircie sélective au niveau des rangées restantes.

Durant le processus de l'éclaircie, on doit promouvoir une bonne utilisation des espaces disponibles dans le peuplement, en évitant la formation de clairières. Dans ce cas, il faut maintenir les arbres les plus petits et qui présentent un potentiel de croissance. Lors de la décision à prendre quant à l'âge, au type d'intensité de l'éclaircie à appliquer, on doit prendre en compte plusieurs facteurs et, notamment, les objectifs de production et la maximisation de la rentabilité économique. Chaque peuplement peut requérir une gestion particulière y compris au niveau des éclaircies et des variations de l'âge de la coupe définitive. La gestion la plus appropriée, par le biais d'éclaircies, varie en fonction de facteurs, tels que : a) la qualité de la station (sol, climat); b) le matériel génétique planté; c) l'espacement initial du semis; d) la densité actuel; et e) l'objectif de la production. Lorsque l'un de ces facteurs est modifié, le régime idéal de gestion change également.

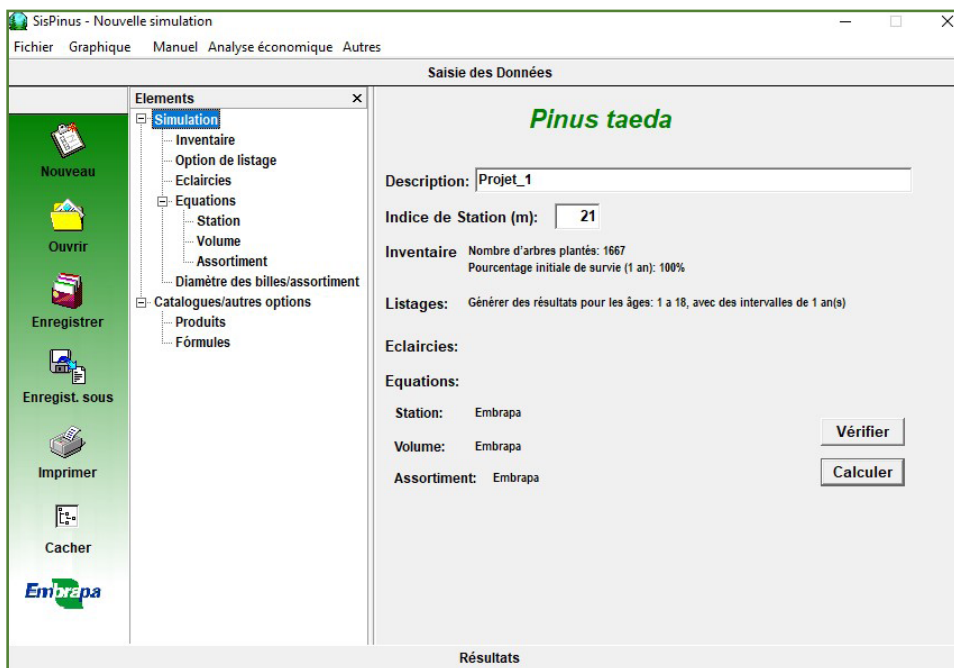
5 LES LOGICIELS: ÉTAPE PAR ÉTAPE

5.1 SIMULATION

En ouvrant le logiciel apparaît l'écran **Simulation** présentant un résumé des informations qui seront traitées. Il contient des éléments qui permettent d'accéder à tous les écrans de saisie de données.

Situé en haut et à gauche de l'écran, la barre d'outils possède pratiquement toutes les commandes de menu et simplifie la réalisation des tâches les plus fréquentes. Elle est sensible au contexte et en fonction de celui-ci, peut avoir certains de ses boutons cachés.

Les boutons positionnés horizontalement permettent un échange rapide entre les contextes **Saisie des Données** Saisissez **Résultat**. Un clic sur le bouton correspondant effectue le changement immédiatement.



La première étape pour la saisie des données consiste à informer **L'indice de Station»** dans la zone de texte correspondante. Cet **indice** est la base de l'encadrement du logiciel par rapport au potentiel de production de la forêt, pour générer des résultats corrects, aussi bien au niveau des mauvaises stations que des bonnes.

Il est possible d'établir une brève description en vue de l'identification du travail. Le bouton **Vérifier**, à droite de l'écran, permet d'effectuer une vérification des données, en informant si elles sont correctes même avant qu'elles ne soient pas traitées. Le bouton **Calculer** procède à la vérification et aux calculs.

Dans la partie inférieure de l'écran, la barre **Résultats** génère les tableaux et graphiques issus des données introduites.

5.2 INVENTAIRE

L'élément **Inventaire** se trouve tout de suite en dessous de **Simulation**.

Informez les données du peuplement, à partir desquels l'on souhaite réaliser la simulation ainsi que le niveau d'homogénéité de celui-ci.

The screenshot shows the 'SisPinus - Nouvelle simulation' window. The 'Saisie des Données' (Data Entry) section is active, with the 'Inventaire' (Inventory) option selected in the left-hand menu. The main area displays three radio button options for inventory data entry:

- Nombre d'arbres plantés par hectare
Densité (arbres par hectare): []
Pourcentage initiale de survie: []
- Nombre d'arbres par hectare à un âge déterminé
Densité (arbres par hectare): []
Âge de l'inventaire: []
- Nombre d'arbres par hectare et surface ou diamètre quadratique moyen
Densité (arbres par hectare): [1520]
Âge de l'inventaire: [5]
 Surface terrier []
 Diamètre quadratique moyen: [15]

Below these options, the 'Niveau d'homogénéité des arbres (1 à 10):' is set to [5]. The radio button options are:

- Homogénéité faible = 1 à 4
- Homogénéité moyenne = 5 à 9
- Homogénéité haute = 8 à 10

The 'Résultats' (Results) section is visible at the bottom of the window.

On doit choisir l'une des trois formes de l'inventaire disponible. L'Indice de Station est toujours essentiel.

- **Nombre d'arbres plantés par hectare» :**

Cette option suppose que les données fournies correspondent à une forêt nouvellement plantée, c'est-à-dire, qu'elle n'a pas encore subi de processus de croissance. Saisir le nombre d'arbres plantés par hectare et le pourcentage de survie durant la première année de vie. Ce dernier paramètre a un effet uniquement sur le nombre initial d'arbres et n'a aucune implication directe à d'autre moment de la vie de la forêt.

- **Nombre d'arbres par hectare à un âge déterminé» :**

Les données d'inventaire disponibles sont: nombre d'arbres par hectare et l'âge du peuplement. En utilisant cette option, l'option antérieure sera désactivée.

- **Nombre d'arbres par hectare et surface terrière ou diamètre quadratique moyen à un âge déterminé**

Les données d'inventaire disponibles sont : nombre d'arbres par hectare, âge du peuplement et la surface terrière ou diamètre quadratique moyen. Cette option est la plus complète donnant lieu à des pronostics d'une plus grande précision et d'exactitude.

- **Indice d'homogénéité du semis:**

Varie de 1 à 10. Il s'agit d'un paramètre qui permet la flexibilité dans la méthode à utiliser pour la description de l'homogénéité. Il peut reposer sur des mesures statistiques (par exemple, variance et coefficient de variation) ou toute mesure empirique, comme les notes de 1 à 10. Les semis clonaux n'ont pas toujours valeur 10 car l'index comporte en plus de la variabilité génotypique, la variabilité dans la station.

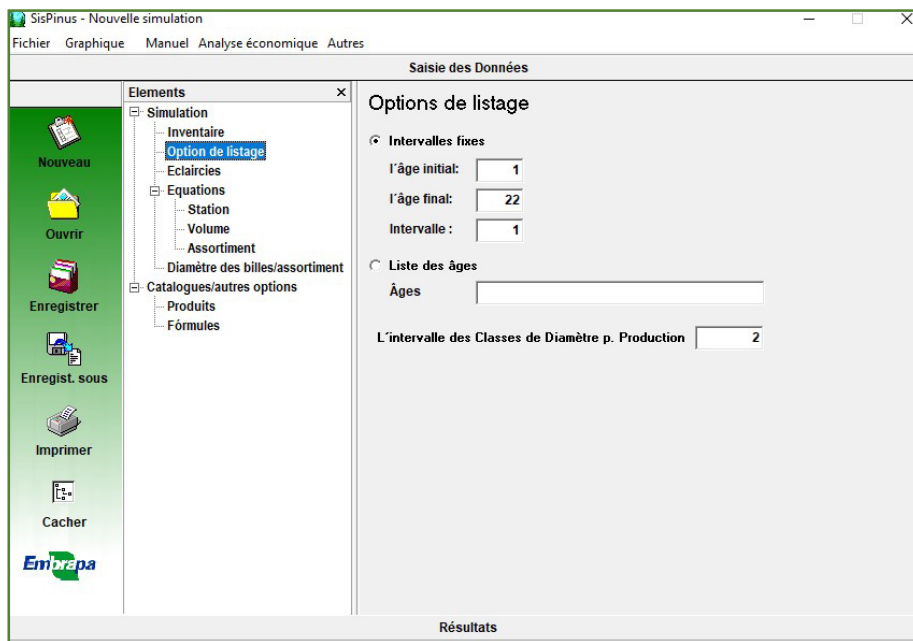
5.3 OPTIONS DE LISTAGE

Sur cet écran, il faut informer les âges pour lesquels vous souhaitez obtenir des résultats.

Deux options pour la génération du listage sont disponibles. Dans la première option, informez L' **Âge initial** (ou de l'inventaire) et l' **Âge Final**. (Récolte finale). Le début du listage sera toujours à partir de l'âge de l'inventaire ce qui veut dire que le logiciel ne montrera pas les âges précédents.

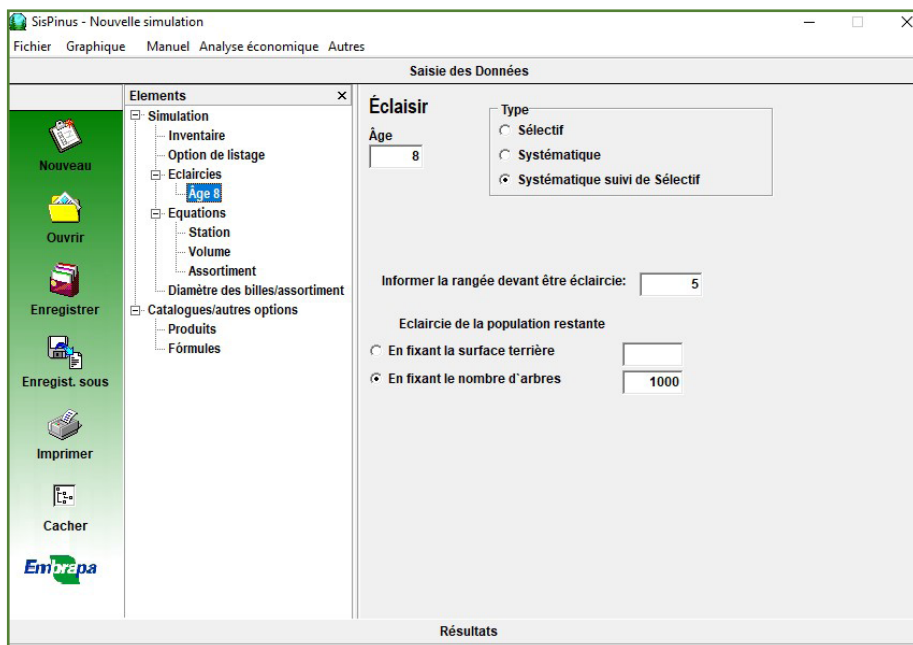
Dans l'écran qui apparaît dans la séquence, sont sollicités les Résultats qui vont du semis (Âge initial = 1) à la récolte finale (Âge Final = 22), d'année en année (**Intervalle =1**). Au cas où l'on souhaiterait obtenir des intervalles plus importants comme par exemple tous les trois ans, informer (Intervalle = 3) Pour obtenir des Résultats d'âges isolés, utiliser l'option "**Liste des âges**" et indiquer les âges en les séparant par des espace ou bien une virgule.

Sur le même Ecran, indiquer **L'intervalle des Classes de Diamètre pour la Production**. La valeur informée définira les classifications de DHP du Tableau d'Assortiment de la Production de l'élément "**Résultat**". La valeur "2" indique que des tableaux d'assortiment par classification de DPH seront générés tous les 2 cm.



5.4 ECLAIRCIES

Sur l'écran "**Eclaircies**" apparaissent pour la première fois les fonctions de navigations qui seront utilisées également sur d'autres écrans du logiciel en relation avec des formulaires ou des listes de registres.



Informar l'Âge, le Type et l'Intensité de l'éclaircie souhaitée.

L'indication de l'intensité de l'éclaircie peut être faite par **"Surface Terrière"**, ou **"Nombre d'Arbres par Hectare"**. Dans les deux cas, indiquer ce qui doit rester après l'éclaircie, c'est-à-dire, informer de ce qui devra rester et non pas ce qui devra être éclairci.

Si l'option du **"Type de l'éclaircie"** est **"Systématique suivi de sélectif"**, en premier lieu **"Informar la rangée devant être éclaircie"**. Puis informer ce qui devra rester après l'application de l'éclaircie sélective sur les rangées qui n'ont pas été retirées. Sur l'écran précédent, la valeur 5 indique l'éclaircie d'une rangée entière toutes les cinq rangées. La valeur 1000 représente le chiffre des arbres restants, soit ceux qui ne seront pas éclaircis.

Après la réalisation du traitement, si l'éclaircie est modifiée, un résumé des résultats de l'éclaircie précédente sera présenté sur le même écran.

Pour inclure les autres éclaircies, revenir sur l'écran précédent et cliquer à nouveau sur **"+"** et pour exclure sur **"-"**.

5.5 EQUATIONS

Dans cet élément, il faut spécifier les équations que vous souhaitez utiliser dans les calculs.

Les boutons à droite de chaque équation vous permettent d'accéder aux équations stockées dans le **"Catalogue des Formules"**

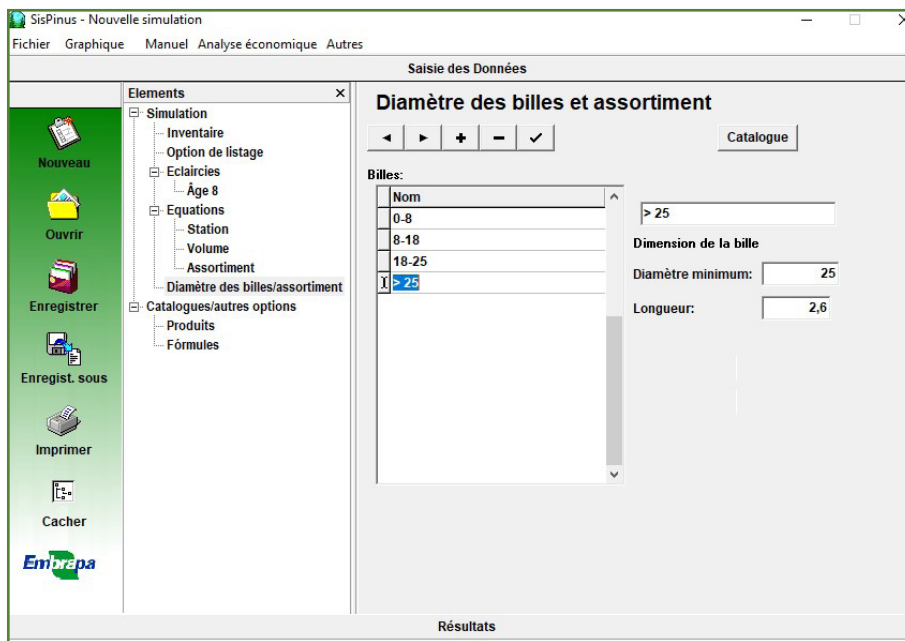
Pour vérifier ou modifier le modèle qui est utilisé, cliquer avec la souris sur le bouton à droite de chaque élément, et les écrans suivants seront affichés:

5.6 DIAMÈTRE DES BILLES DE BOIS ET L'ASSORTIMENT

Cet élément permet que la production des éclaircies et de la récolte finale soient classées à travers la segmentation des arbres en billes pour de différents produits, avec les dimensions indiquées par l'utilisateur.

Pour ajouter ou retirer les **"types de billes"**, utiliser le navigateur en cliquant sur **"+"** ou sur **"-"**, comme expliqué dans l'élément **"Eclaircies"**.

Indiquer les noms des produits que vous souhaitez (Ex: laminage, scierie, cellulose, énergie) et les dimensions de chacun des souhaits: **"Diamètre de l'Extrémité la plus petite (cm)"**, et **"Longueur de la bille (mètre)"**.



Si l'un des types de bille ne possède pas de contrainte dimensionnelle (habituellement Energie), mettre la valeur 0 (Zéro) dans les champs du **“Diamètre et Longueur de la Bille”**. Si ce n'est spécifié, le logiciel ne présentera pas la production de la « pointe » de l'arbre, mais cela sera toujours inclus dans la production totale présentée dans les tableaux d'éclaircies et de la récolte finale.

Le bouton **“Catalogue”**, dans le coin supérieur droit, offre des options pour importer **“Types de bille”**, d'un catalogue précédemment enregistré. En cliquant dessus, vous pouvez voir une liste avec les noms de tous les types disponibles. Pour importer un type, il suffit de sélectionner parmi la liste et cliquer sur «OK». Pour l'importation de tous en une seule opération, il suffit de cliquer **“Tous”**.

Pour toute modification à enregistrer, vous devez cliquer sur **“enregistrer”** ou **“enregistrer sous”**. Dans le cas contraire, elle sera supprimée lorsque le logiciel sera finalisé.

5.7 CATALOGUES

L'élément **“Catalogues”** permet d'insérer et de modifier **“Formules”** et **“Produits”** en maintenant les mêmes enregistrées afin qu'elle soient rapidement accessibles et utilisées dans les traitements. Cet enregistrement constitue une méthode organisée et souple pour travailler avec beaucoup de produits et d'équations. Un nombre illimité d'options peut être maintenu, pour satisfaire aux conditions spécifiques de chaque œuvre de simulation.

Les changements dans le catalogue ne sont pas utilisés dans la simulation actuelle. Pour qu'elles apparaissent dans la simulation, il est nécessaire de recourir au bouton **“Catalogue”**, mentionné dans les éléments précédents.

Les procédures pour insérer, exclure et modifier les produits et formules dans cet élément sont semblables à ceux de l'élément.

5.8 CARBONE

Les logiciels présentent la quantification du Carbone issue des équations publiées dans des travaux scientifiques et techniques (tableau ci-dessous). En outre, l'utilisateur peut appliquer les nouvelles équations, principalement parce que le tableau de la croissance présente des variables comme le DHP et la hauteur des arbres, qui font habituellement partie des modèles.

Logiciel et Espèce	Equations pour l'estimation de C (tC) Facteur de Conversion de C pour CO ₂ = 3,6667
SisAcacia <i>Acacia mearnsii</i> De Wild	(Vol+33%).(Biomasse sèche: 0,41).(C:0,4248) Basé sur Saidelles et al., 2009
SisAraucaria <i>Araucária angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	(Vol+53%).(Biomasse sèche 0,41).(C:0,43) Basé sur Watzlawick et al., 2003
SisBracatinga <i>Mimosa scabrella</i> Benth	(Vol+43%).(Biomasse sèche: 0,48).(C:0,44) Basé sur Machado et al., 2006
SisEucalipto <i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden	(Vol+25%)x(DB: 0,49)x(C: 0,42) Basé sur Silva, 1996
SisPinus <i>Pinus taeda</i> L.	(0,0001-0,0040.D+0,0193.D ² H+0,5728 I).(C:0,41) Corte et Sanquetta, 2007
SisTeca <i>Tectona grandis</i> L.F.	(Vol+30%) x (DB:0,53)x(C:0,41) Basé sur Rondon, 2006, Gouveia et Ângelo, 2002

Vol. = Volume du tronc avec écorce; C = Teneur en Carbone (tC); D = DHP (cm), H = Hauteur totale (m); I = Âge (années), DB: Densité Basale.

5.9 RÉSULTATS

Cliquer sur l'option **“Résultats”** présentée sur la partie inférieure de l'écran pour générer les simulations. Para revenir, cliquer sur **“Saisie des Données”** sur la partie supérieure de l'Ecran.

- **Exemple 1 – Pinus taeda**

Compte tenu de l'écran suivant, se référant au semis de 1667 arbres par hectare, l'Indice de Station de 22 mètres, pour une récolte à 22 ans.

Pour calculer la production résultante, on utilise une classe de diamètre de 2 cm, en distribuant le bois qui en résulte parmi les produits suivants:

Destinação do bois	Longueur (m)	Diamètre minimum (cm)
Scierie I	2,6	25
Scierie II	2,6	18
Cellulose	2,6	8
Energie	Sans restriction	Sans restriction

Les résultats montrent les variables qui décrivent la structure de la plantation forestière. Tous les résultats sont à un hectare. La Surface terrière se réfère à la somme des domaines transversaux de tous les arbres, compte tenu des DHP pour les calculs. L'À.A.M est l'accroissement annuel moyen, obtenu en divisant la production totale par L'âge. Cette production prend en compte la somme du volume de l'âge du calcul avec les volumes déjà éclaircis.

SisPinus - Nouvelle simulation

Fichier Graphique Manuel Analyse économique Autres

Saisie des Données

Résultats

TABLEAU DE CROISSANCE ET PRODUCTION (Pinus taeda)

Description: Projet_2
 Indice de Station: 22,0
 Densité (arbres par hectare): 1667
 Pourcentage de survie (1^{er} an): 95 %

Âge	Hauteur Domin.	Arbres/Ha	Diamètre Moyen	Hauteur Moyen	Surface Terrière	Volume	L.M.A.	IC02
1	0,6	1584	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
2	2,6	1584	2,4	2,2	0,7	0,7	0,3	0,4
3	4,9	1584	5,8	4,2	4,2	7,6	2,5	5,0
4	7,1	1584	9,0	6,2	10,0	26,8	6,7	17,7
5	9,1	1584	11,6	8,0	16,8	58,1	11,6	38,3
6	10,9	1583	13,8	9,7	23,7	98,4	16,4	64,8
7	12,6	1582	15,6	11,1	30,2	144,5	20,6	95,2
8	14,1	1581	17,1	12,5	36,2	194,2	24,3	127,9
9	15,5	1578	18,3	13,7	41,7	245,6	27,3	161,8
10	16,8	1574	19,4	14,8	46,7	297,6	29,8	196,1
11	18,0	1568	20,4	15,9	51,2	349,2	31,7	230,0
12	19,1	1560	21,2	16,8	55,3	399,6	33,3	263,3
13	20,2	1550	22,0	17,7	58,9	448,3	34,5	295,4
14	21,2	1539	22,7	18,5	62,1	495,0	35,4	326,1
15	22,1	1526	23,3	19,3	65,0	539,3	36,0	355,3
16	23,0	1511	23,8	20,0	67,5	581,1	36,3	382,8
17	23,8	1496	24,4	20,7	69,7	620,2	36,5	408,6
18	24,6	1479	24,8	21,4	71,5	656,8	36,5	432,7
19	25,4	1461	25,2	22,0	73,1	690,7	36,4	455,0
20	26,1	1442	25,6	22,5	74,5	722,0	36,1	475,6
21	26,8	1422	26,0	23,1	75,6	750,8	35,8	494,6
22	27,4	1403	26,4	23,6	76,5	777,2	35,3	512,0

ASSORTIMENT DE ARBRES - RÉCOLTE FINALE (22 ANS)

Classes DHP	Arb./Ha	Hauteur Moyen	Volume	> 25 cm	18-25 cm	8-18 cm	< 8 cm
14,0-16,0	2	17,1	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0
16,0-18,0	15	18,6	2,8	0,0	0,0	2,5	0,3
18,0-20,0	56	19,9	13,6	0,0	0,0	12,8	0,8
20,0-22,0	127	21,0	39,5	0,0	11,2	25,0	3,2
22,0-24,0	209	22,1	81,5	0,0	39,4	39,1	3,0
24,0-26,0	269	23,0	129,3	0,0	82,3	40,6	6,4
26,0-28,0	279	23,9	162,5	41,2	81,6	36,4	3,2
28,0-30,0	231	24,8	160,3	70,5	65,1	20,2	4,5
30,0-32,0	144	25,8	117,7	69,0	28,6	19,0	1,2
32,0-34,0	59	26,7	56,4	32,1	18,3	5,0	0,9
34,0-36,0	12	27,7	12,9	8,8	2,5	1,3	0,3
Total		23,6	777,2	221,6	329,0	202,0	24,0

Salvar

Imprimir

Embrapa

- **Enregistrer**

Les résultats peuvent être sauvegardés dans un fichier texte, dans l'extension «rtf», compatible avec le logiciel d'édition de texte. Il suffit de cliquer simplement sur le bouton approprié dans la barre verte.

En vérifiant le tableau des résultats, compléter ou en partie, vous pouvez copier et coller dans les fichiers de l'édition ou les tableaux de calcul. Chaque valeur reste dans une cellule, permettant la réalisation de calculs supplémentaires.

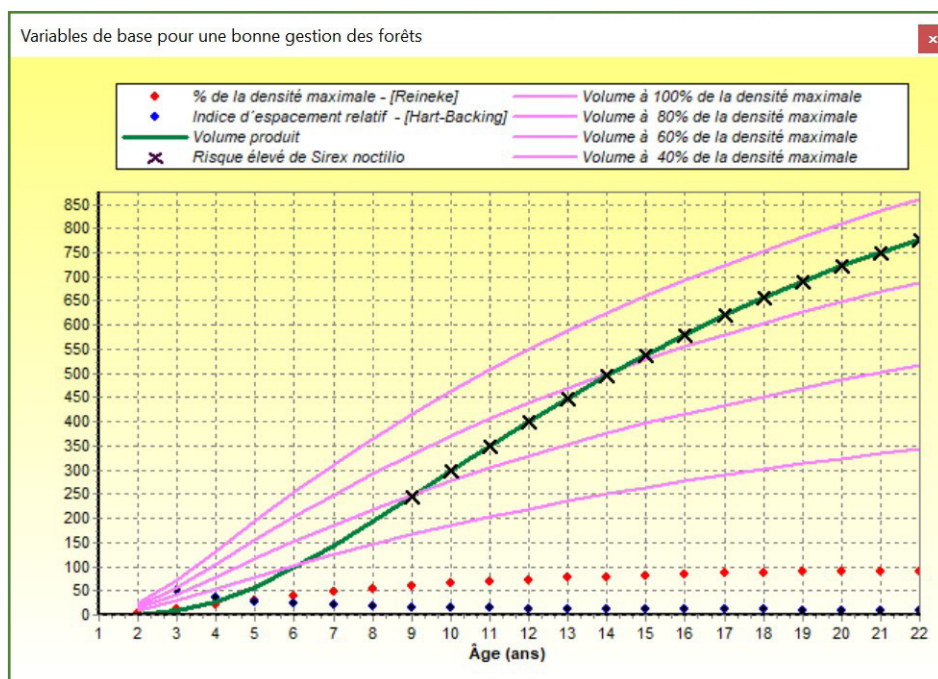
- **Imprimer**

Pour imprimer, il suffit de cliquer sur le bouton de l'imprimante dans la barre verte.

5.10 GRAPHIQUE

Un **“Graphique”** avec d'autres variables peut être obtenu en cliquant sur l'élément situé dans la partie supérieure de l'écran. Les lignes de croissances et les indices présentés ont pour fonction d'aider à la définition de la gestion optimale de la forêt. Pour l'imprimer, utiliser la touche «Print Screen» et coller dans le fichier du logiciel qui permet d'éditer le texte.

Le modèle de graphique généré par SisPinus, compte tenu de l'exemple, sans éclaircie et avec coupe définitive à 22 ans sera:



- **Lignes roses** = volumes potentiels à 40, 60, 80 et 100% de la densité maximale.
 - **Ligne verte** = Volume total produit.
 - **Points rouges** = Pourcentage de la densité maximale qui peut être atteinte par le peuplement - (Modèle de Reineke);
 - **Points bleus** = Indice d'espacement relatif (Indice de Hart-Becking);
 - Marquages sur X = indication du risque élevé de dommages causés par la guêpe perce-bois (Disponible sur SisPinus).
- **Indice de Hart-Becking ou Indice d'Espacement Relatif – (%)**

L'Indice de Hart-Becking ($S\%$) est le rapport entre l'espacement moyen entre les arbres (EM) et la hauteur dominante (H):

$$S(\%) = 100 \cdot \frac{EM}{H}$$

L'espacement moyen entre les arbres (EM) peut être calculé à l'aide de l'expression:

$$EM = \sqrt{\frac{10000}{N}}$$

dans lequel N représente le nombre d'arbres par hectare.

L'indice $S(\%)$ possède une grande application dans la détermination des poids dans les éclaircies, dans la gestion pour la prévention d'incendies de forêt et les ravageurs ainsi que dans la structuration de systèmes d'Intégration Agriculture-élevage-Forêt.

- **Pourcentage de la Densité Maximale du Peuplement – (Reineke)**

Le modèle de Reineke, ajusté pour les plantations surstockées dans les régions productrices du Brésil, génère une courbe qui représente la densité maximale que le peuplement aura dans une condition d'occupation complète ou stock complet. Le graphique généré par les logiciels décrits ci-après présente le pourcentage d'occupation du site du peuplement analysé. Une valeur de 100 % indique que le site est totalement stocké, c'est-à-dire avec la capacité de production maximum. Au niveau du graphique généré pour l'exemple, on observe qu'à 6 ans, le peuplement occupe 46 % du site et continue d'augmenter dans les âges suivants. À 9 ans, l'occupation a atteint 70 %, cependant, à partir de cet âge, le programme révèle l'existence d'un risque élevé d'attaque de guêpe perce-bois, ce qui amène à recommander la réalisation de d'éclaircies préventives. Le risque d'attaque de la guêpe perce-bois repose sur les caractéristiques de peuplement favorables à l'insecte, comme la concurrence excessive entre les arbres qui provoque un affaiblissement prononcé et la mortalité des dominés.

- **Diagramme de Gestion de la Densité de Peuplement - DGDP**

Le DGDP présente des interconnexions mathématiques entre les différentes variables du peuplement forestier, impliquant, en fait, le nombre d'arbres par hectare, la surface terrière et le diamètre moyen des arbres. Ils permettent le suivi de la densité de la population, en fonction de l'ampleur des variables de croissance. Ce suivi permet de définir des intensités et époques optimales d'éclaircie, l'adéquation des niveaux de compétition en fonction des objectifs de la production de bois, ce qui permet d'optimiser l'utilisation du site. Il y a des modèles qui comprennent, en outre, la hauteur dominante.

Un Diagramme de Gestion de la Densité est construit et fondé sur une courbe de densité maximale et à partir de celle-ci d'autres courbes par proportion, qui serviront de références pour l'occupation du site par les arbres.

Pour la définition de la courbe de densité maximale, et ce malgré toutes les avancées en biométrie, la méthode de Reineke (1933) reste une référence. Pour sa mise en œuvre, la courbe de densité maximale doit être calculée à partir des mensurations de peuplements avec densité pleine. Le modèle est :

$$N = \text{Exp} (a + \text{Ln}(Dg))$$

Dans lequel N est le nombre d'arbres par hectare et Dg représente le diamètre quadratique moyen.

La courbe de densité maximale permet d'initier la construction du diagramme, à partir des variations des diamètres quadratiques de référence.

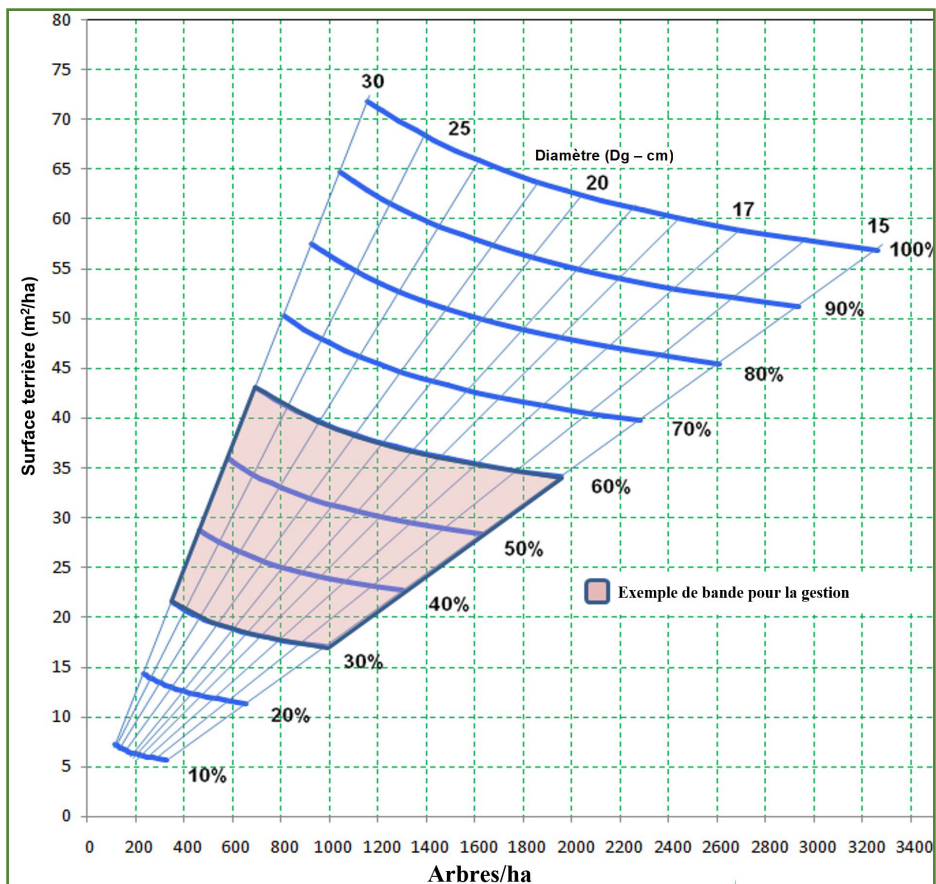
Dans SisPinus, pour le Pinus taeda, l'équation utilisée a été obtenue à partir de divers peuplements ayant donné lieu à la construction du logiciel sachant que:

$$N = \text{Exp} (12,1333 - 1,4933\text{Ln}(Dg))$$

Qui se traduit par le diagramme suivant. L'Indice de Densité de la Plantation (Indice de Reineke), qui est obtenu à travers l'utilisation du Dg de 25 cm, a été de 1520.

La bande de gestion recommandée par différents auteurs, pour la production de grumes, prédomine avec des valeurs proches de 60% du stock maximum allant jusqu'à une limite inférieure fixée à 30% du stock maximum. En maintenant le peuplement dans cette gamme de densité, les arbres posséderont des caractéristiques des dominants donc grands et avec un fût bien formé.

On considère qu'au-dessus de la bande, il y a une compétition excessive et qu'en dessous il reste de l'espace avec un gaspillage conséquent des ressources du site. Au sein de la bande, l'option pour éclaircir la ligne supérieure ou inférieure dépendra de l'objectif de la production. Si l'objectif est d'avoir une plus petite production de billes avec des rotations plus courtes, les éclaircies devront être maintenues plus proche de la ligne de 60 %.

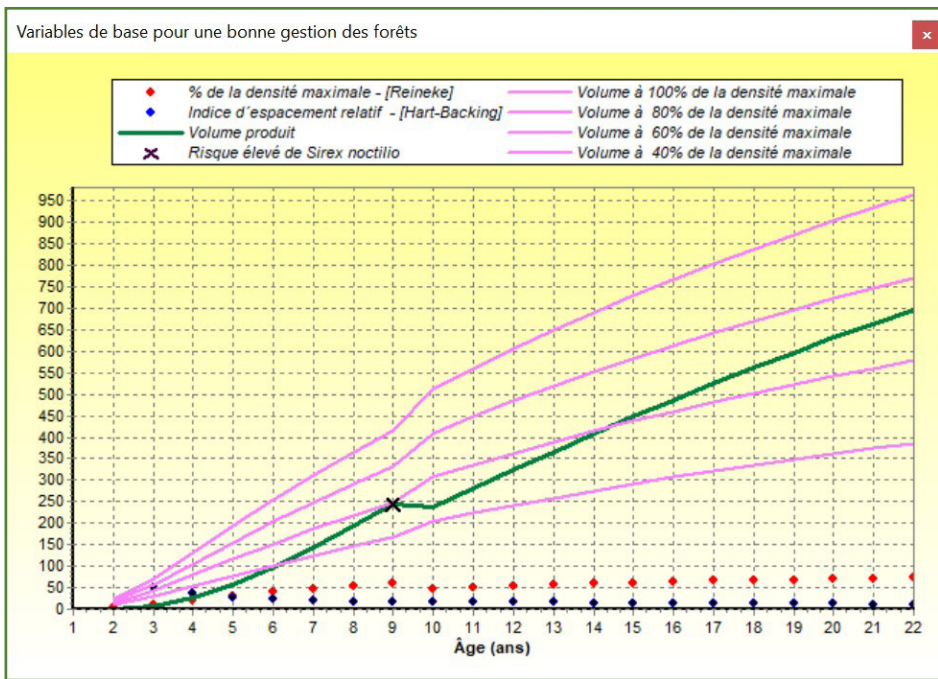


- **DGDP dans les Logiciels**

L'intégration du DGDP avec les simulateurs décrits dans ce manuel permet que les variables présentes dans le diagramme soient traitées conjointement avec d'autres variables de croissance et de production qui ont une grande influence sur la densité du peuplement, en particulier la Hauteur Dominante et la Hauteur Moyenne. Avec cela, la dynamique et les interactions des différentes variables peuvent être suivies pour chaque âge, accompagnant le pronostic de croissance et de production.

Le DGDP va donc prendre en compte la Hauteur dominante et la Hauteur moyenne, la Mortalité, le Diamètre moyen, la Surface terrière et le Volume. En outre, les logiciels fournissent tout déploiement de bois récolté par classes de diamètre et classes de hauteur, ainsi que l'assortiment à usage industriel.

En considérant, par exemple, une éclaircie sélective à 9 ans, laissant 1000 arbres, le graphique généré par le simulateur sera:



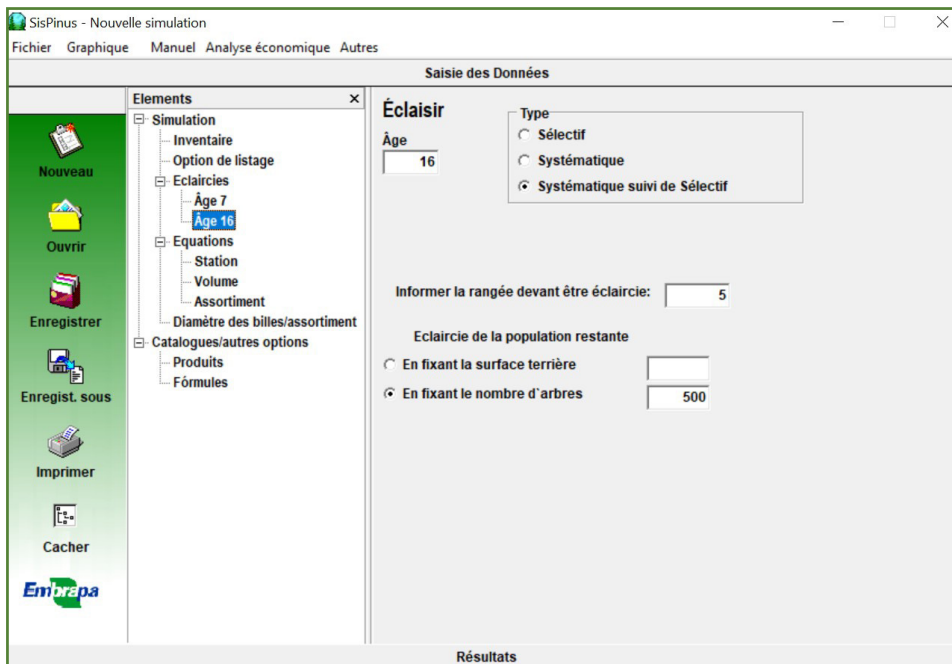
Avec l'éclaircie, l'Accroissement Annuel Moyen (AAM) sera réduit de 2,55% (35,3m² à 34,4m²). Cependant, les billes au-dessus de 25cm de diamètre auront une augmentation de 42,1% (221,6m³ à 314,8m³).

- **Exemple 2**

Cet exemple utilisera des données d'un inventaire au lieu de données de semis telles qu'utilisées dans l'exemple 1. L'espèce est le *Pinus taeda* avec 5 ans d'âge. La hauteur dominante est de 10,0 mètres ce qui selon le tableau de classification de station (page 45), donne lieu à un indice de station de 21,5m. Le nombre d'arbres par hectare est de 1500, le diamètre quadratique moyen est de 13cm et le niveau d'homogénéité du semis est de 5.

On souhaite effectuer une première éclaircie mixte à neuf ans d'âge, systématique soit une toute les cinq lignes suivi d'une éclaircie sélective jusqu'à ce qu'il ne reste que 1.000 arbres. Une seconde éclaircie sera sélective à 13 ans, laissant 400 arbres et la récolte finale à 22 ans.

Les deux figures ci-dessous montrent comment seront les données de l'inventaire et les éclaircies.



Les résultats sont présentés dans les figures à suivre.

Âge	Hauteur Domin.	Arbres/ha	Diamètre Moyen	Hauteur Moyen	Surface Terrière	Volume	I.M.A.	tCO2
5	9,7	1500	13,0	8,7	19,9	74,0	14,8	48,8
6	11,7	1499	15,2	10,4	27,2	121,8	20,3	80,2
7	13,4	1498	17,0	12,0	34,0	175,6	25,1	115,7

Éclaircir 498 arbres.

Âge	Hauteur Domin.	Arbres/ha	Diamètre Moyen	Hauteur Moyen	Surface Terrière	Volume	I.M.A.	tCO2
8	15,5	999	20,0	14,1	31,5	190,9	28,7	125,8
9	17,0	998	21,5	15,4	36,2	239,8	30,9	158,0
10	18,4	997	22,8	16,6	40,5	289,3	32,8	190,6
11	19,7	995	23,9	17,7	44,5	338,9	34,3	223,3
12	20,9	992	24,8	18,8	48,1	388,0	35,6	255,6
13	22,0	989	25,7	19,7	51,4	436,2	36,5	287,4
14	23,1	985	26,5	20,7	54,4	483,2	37,3	318,3
15	24,1	981	27,2	21,5	57,1	528,7	37,8	348,3
16	25,1	976	27,9	22,3	59,6	572,7	38,2	377,3

Éclaircir une rangée d'arbres tous les 5 rangs. Puis,
Éclaircir 280 arbres.

Âge	Hauteur Domin.	Arbres/ha	Diamètre Moyen	Hauteur Moyen	Surface Terrière	Volume	I.M.A.	tCO2
17	25,9	500	30,0	24,4	35,2	369,1	37,5	243,2
18	26,8	499	30,9	25,1	37,3	403,4	37,4	265,8
19	27,7	499	31,7	25,9	39,3	436,8	37,1	287,7
20	28,5	498	32,4	26,6	41,0	469,2	36,9	309,1
21	29,3	498	33,1	27,3	42,7	501,0	36,7	330,1
22	30,0	497	33,7	28,0	44,3	532,1	36,4	350,6

SisPinus - Nouvelle simulation

Fichier Graphique Manuel Analyse économique Autres

Saisie des Données

Résultats

ÉCLAIRCIES

Âge	Volume retiré	tCO2	Volume restant
7	38,7	25,5	136,9
16	230,1	151,6	342,6

ASSORTIMENT DE ARBRES - ÉCLAIRCIE (7 ANS)

Classes DHP	Arb./Ha	Hauteur Moyen	Volume	> 25 cm	18-25 cm	8-18 cm	< 8 cm
5,0-10,0	3	9,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
10,0-15,0	320	10,9	21,8	0,0	0,0	17,5	4,3
15,0-20,0	174	12,1	16,7	0,0	0,0	15,6	1,1
20,0-25,0	1	12,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0
Total		11,4	38,7	0,0	0,1	33,2	5,5

ASSORTIMENT DE ARBRES - ÉCLAIRCIE (16 ANS)

Classes DHP	Arb./Ha	Hauteur Moyen	Volume	> 25 cm	18-25 cm	8-18 cm	< 8 cm
15,0-20,0	1	28,2	0,3	0,0	0,0	0,2	0,0
20,0-25,0	214	20,5	79,7	0,0	40,8	33,1	5,7
25,0-30,0	209	22,3	108,4	29,2	56,5	18,4	4,4
30,0-35,0	50	23,9	39,7	24,5	9,5	4,8	0,8
35,0-40,0	2	26,3	2,1	1,7	0,2	0,2	0,0
Total		22,3	230,1	55,4	107,0	56,7	11,0

ASSORTIMENT DE ARBRES - RÉCOLTE FINALE (22 ANS)

Classes DHP	Arb./Ha	Hauteur Moyen	Volume	> 25 cm	18-25 cm	8-18 cm	< 8 cm
25,0-30,0	40	25,7	30,7	7,3	18,1	4,1	1,1
30,0-35,0	315	28,0	311,0	171,3	100,9	31,2	7,6
35,0-40,0	134	29,0	175,6	135,5	26,8	11,6	1,8
40,0-45,0	9	30,1	14,8	12,4	1,7	0,6	0,1
Total		28,0	532,1	326,5	147,6	47,5	10,6

6 LA BASE STATISTIQUE DES LOGICIELS

Les systèmes ont été construits en se basant sur des distributions probabilistes. Ainsi, au lieu de modèles de régression classique, on a travaillé sur une projection d'année par année de la structure de chaque forêt, impliquant plusieurs paramètres simultanément.

Les distributions probabilistes utilisées ont été S_B et S_B bivariée (S_{BB}). La distribution S_B décrit la distribution marginale de la variable diamètre ou hauteur des arbres d'un peuplement à des différents âges et S_{BB} décrit la distribution conjointe de ces variables.

Les données du champ proviennent de parcelles d'inventaires continus grâce à des partenariats établis avec des producteurs forestiers, ce qui a permis d'obtenir des estimations des paramètres de la distribution pour chaque espèce, selon les différentes conditions du sol, l'âge et l'espacement entre les arbres.

La fonction de distribution S_B est exprimée par:

$$f(x) = \frac{\delta\lambda}{\sqrt{2\pi}(x-\xi)(\xi+\lambda-x)} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left[\gamma + \delta \ln\left(\frac{(x-\xi)}{(\xi+\lambda-x)}\right)\right]^2\right\},$$

La construction de la distribution S_{BB} est basée sur la distribution S_B , avec la distribution Normale bivariée.

Compte tenu D et H la DHP et la hauteur totale des arbres, respectivement, on obtient:

$$z_D = \gamma_D + \delta_D \ln\left(\frac{x_D - \xi_D}{\lambda_D + \xi_D - x_D}\right) \quad \text{et} \quad z_H = \gamma_H + \delta \ln\left(\frac{x_H - \xi_H}{\lambda_H + \xi_H - x_H}\right)$$

Dans laquelle z_D e z_H ont une Distribution Normale bivariée avec corrélation ρ .

$$f(z_D, z_H) = \left[2\pi(1 - \rho^2)^{1/2}\right]^{-1} \exp\left[-\frac{1}{2}(1 - \rho^2)^{-1}(z_D^2 - 2\rho z_D z_H + z_H^2)\right],$$

Les paramètres ξ_D et ξ_H représentent, respectivement, les valeurs minimales de D et H dans la population; λ_D et λ_H représentent les amplitudes de D et H. Les paramètres $\gamma_D, \gamma_H, \delta_D$ et δ_H ne peuvent pas être liée à des caractéristiques individuelles du boisement, mais à travers des expressions:

$$\hat{\delta} = \frac{\lambda}{4\sigma_x} \quad \hat{\gamma} = \frac{2x_m - \xi - \lambda}{\lambda\delta} - \delta \ln\left(\frac{x_m - \xi}{\lambda + \xi - x_m}\right)$$

dans laquelle:

σ_x = écart type de x (x = H ou D) et x_m = mode de x.

La valeur de X_m est définie par la valeur de x qui satisfait l'expression:

$$\frac{2(x - \xi)}{\lambda} - 1 = \delta \left[\gamma + \delta \ln\left(\frac{x - \xi}{\lambda + \xi - x}\right) \right]$$

Pour l'élaboration du modèle de croissance et de production, les estimations des paramètres ont été associées par le biais de fonctions au nombre d'arbres par hectare (S) et à la hauteur dominante (H_D) ou l'âge du peuplement, à l'aide du modèle de Richards:

$$\text{Paramètre d'intérêt} = f_1(S) \{1 - \exp[H_D f_2(S)]\}^{f_3(S)}$$

Equations pour l'estimation des paramètres de la distribution S_{BB} .

1. $H_D = \exp\left\{a_1\left[(1/A)^{b_1} - (1/15)^{b_1}\right]\right\}IS$
2. $H_m = H_D(a_2 + b_2A)$
3. $H_1 = H_D a_3 [1 - \exp(-b_3A)]$
4. $s_H = a_4 [1 - \exp(-b_4A)]^{c_4}$
5. $D_D = a_5 [1 - \exp(-b_5H_D)]^{c_5}$
6. $D_m = D_D a_6 [1 - \exp(-b_6H_D)]$
7. $D_1 = D_D a_7 [1 - \exp(-b_7H_D)]^{c_7}$
8. $s_D = a_8 [1 - \exp(-b_8H_D)]^{c_8}$
9. $\rho(Z_D, Z_H) = a_9 + b_9 \cos(c_9 H_D) + d_9 H_D$

IS = Indice de station, A = Âge du peuplement

H_D = Hauteur dominante, D_D = Diamètre dominante

H_m e D_m = mode des hauteurs et des diamètres

H_1 e D_1 = hauteur minimum et diamètre minimum

s_H e s_D = écarts-types des hauteurs et des diamètres

a_i, b_i e c_i ($i = 1,2...9$) Il s'agit d'équations pour chaque paramètres qui ont comme variable dépendante, le nombre d'arbres par hectare (S).

Distribution S_D (Z_D et Z_H) et Distribution S_{bb} (Z_D, Z_H)

$$Z_D = \gamma_D + \delta_D \ln \left(\frac{X_D - \varepsilon_D}{\lambda_D + \varepsilon_D - X_D} \right) \dots Z_H = \gamma_H + \delta_H \ln \left(\frac{X_H - \varepsilon_H}{\lambda_H + \varepsilon_H - X_H} \right)$$

Mode des Diamètres
Diamètre minimum
Mode des Hauteurs
Hauteur minimum

Écart-type des Diamètres
Amplitude des Diamètres
Écart-type des Hauteurs
Amplitude des Hauteurs

$$f(Z_D, Z_H) = \left[2\pi(1-\rho^2)^{1/2} \right]^{-1} \exp \left[-\frac{1}{2}(1-\rho^2)^{-1} (Z_D^2 - 2\rho Z_D Z_H + Z_H^2) \right]$$

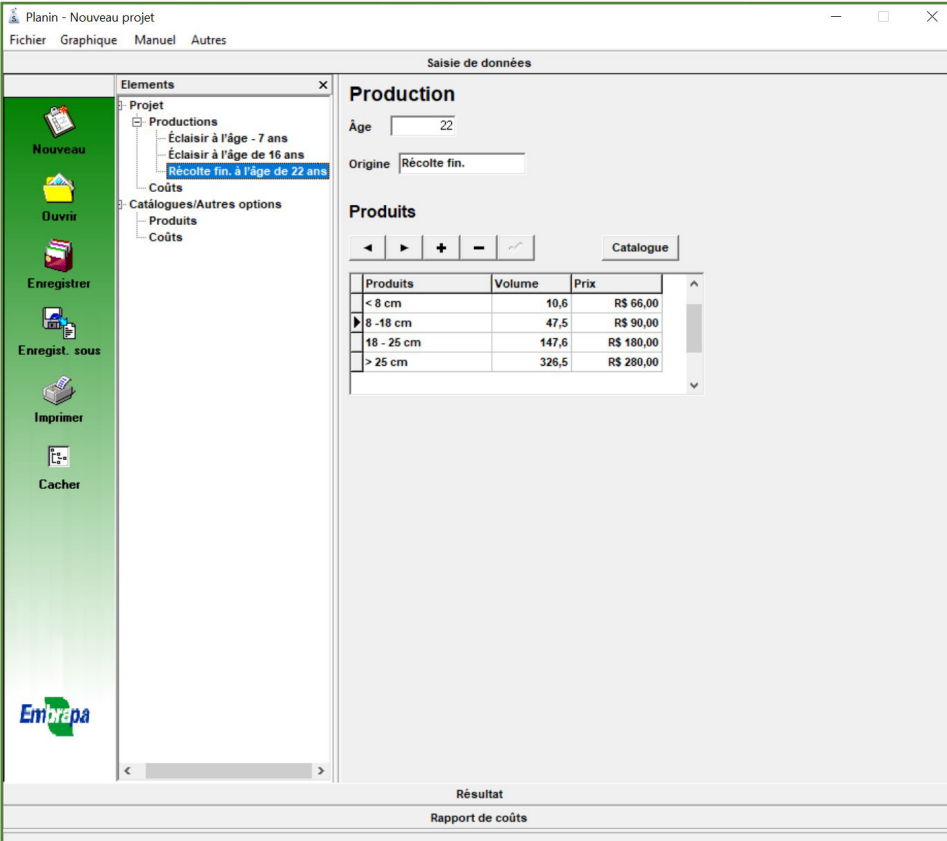
Corrélation (DH)

On trouvera la description détaillée de cette méthodologie dans les références Schreuder et Hafley (1977), Hafley et Schreuder (1977), Hafley et Buford (1985), Oliveira (1995).

7 ANALYSE ÉCONOMIQUE – PLANIN

Accéder au logiciel Planin, utilisé pour le calcul des paramètres de l'évaluation économique et financière et l'analyse de sensibilité de la rentabilité à des différents taux d'attractivité. Il prend en compte les divers segments des coûts opérationnels de l'implantation, la maintenance et la récolte. Avec ce programme, vous obtenez les flux de trésorerie, les analyses de sensibilité et les critères d'analyse économique les plus utilisés. En outre, il permet à l'utilisateur de suivre leurs coûts, en délivrant des rapports de dépenses annuelles.

Le manuel complet de Planin est accessible dans le logiciel. Ici, seuls certains écrans sont présentés montrant leur structure de base.



Planin - Nouveau projet
Fichier Graphique Manuel Autres

Saisie de données

Elements

- Projet
 - Productions
 - Éclairir à l'âge - 7 ans
 - Éclairir à l'âge de 16 ans
 - Récolte fin. à l'âge de 22 ans
 - Coûts
- Catálogos/Autres options
 - Produits
 - Coûts

Production

Âge

Origine

Produits

Produits	Volume	Prix
< 8 cm	10,6	R\$ 66,00
▶ 8 - 18 cm	47,5	R\$ 90,00
18 - 25 cm	147,6	R\$ 180,00
> 25 cm	326,5	R\$ 280,00

Résultat
Rapport de coûts

Planin - Nouveau projet

Fichier Graphique Manuel Autres

Saisie de données

Elements

- Projets
 - Productions
 - Éclaircir à l'âge - 7 ans
 - Éclaircir à l'âge de 16 ans
 - Récolte fin. à l'âge de 22 ans
 - Coûts
- Catálogos/Autres options
 - Produits
 - Coûts

Nouveau

Ouvrir

Enregistrer

Enregist. sous

Imprimer

Cacher

Embrapa

Coûts

Catálogo / Autres coûts

Nome	Unité	Type de Coût	Custo
Coût de l'ha	\$/ha	Unitaire	R\$ 0,00
Plantation	\$/ha	Unitaire	R\$ 15.000,00
Tr. annuels	\$/ha	Annuel	R\$ 0,00
Routes	\$/ha	Unitaire	R\$ 0,00
Replantation	\$/ha	Unitaire	R\$ 0,00
Entretien	\$/ha	Annuel	R\$ 0,00
CT.Ravageus	\$/ha	Annuel	R\$ 0,00

Deux clics pour changer | "\$/ha + Unitaire" est un coût Initial

Coûts annuels (\$/ha)

Idade	Custo
1	R\$ 420,00
2	R\$ 560,00
3	R\$ 1.130,00
4	R\$ 250,00
5	R\$ 250,00
6	R\$ 250,00
7	R\$ 250,00
8	R\$ 250,00
9	R\$ 250,00
10	R\$ 250,00
11	R\$ 250,00
12	R\$ 250,00
13	R\$ 250,00
14	R\$ 250,00
15	R\$ 250,00
16	R\$ 250,00
17	R\$ 250,00
Résultat	

Rapport de coûts

Planin - Nouveau projet

Fichier Graphique Manuel Autres

Saisie de données

Résultat

PLANIN © Embrapa

Flux de Recettes et Coûts pour la Récolte Finale à 22 ans

Année	Recette (\$)	Coûts (\$)	Recette Présente (\$)	Coût Présente (\$)
0	0,00	15.000,00	0,00	15.000,00
1	0,00	5.420,00	0,00	5.211,54
2	0,00	560,00	0,00	517,75
3	0,00	1.130,00	0,00	1.004,57
4	0,00	250,00	0,00	213,70
5	0,00	250,00	0,00	205,48
6	0,00	250,00	0,00	197,58
7	3.369,00	250,00	2.560,16	189,98
8	0,00	250,00	0,00	182,67
9	0,00	250,00	0,00	175,65
10	0,00	250,00	0,00	168,89
11	0,00	250,00	0,00	162,40
12	0,00	250,00	0,00	156,15
13	0,00	250,00	0,00	150,14
14	0,00	250,00	0,00	144,37
15	0,00	250,00	0,00	138,82
16	40.601,00	250,00	21.677,21	133,48
17	0,00	250,00	0,00	128,34
18	0,00	250,00	0,00	123,41
19	0,00	250,00	0,00	118,66
20	0,00	250,00	0,00	114,10
21	0,00	250,00	0,00	109,71
22	122.962,60	250,00	51.894,73	105,49

Salvar

Imprimir

Planin - Nouveau projet
Fichier Graphique Manuel Autres

Saisie de données

Résultat

Paramètres qui NE TIENNENT PAS compte de la valeur du capital au fil du temps

Production Totale (m3/ha)	801,10
Production Annuelle Moyenne (m3/ha)	36,41
Recette Totale	166.932,60
Coût Total	26.860,00
Recette Totale Nette	140.072,60
Recette Totale Moyenne (\$/année)	7.587,85
Coût Total Moyenne (\$/année)	1.220,91
Recette Nette Moyenne (\$/année)	6.366,94
Rapport Recette/Coût	6,21
Rapport Recette moyenne/Coût	0,28
Prix Moyen de la Production (\$/m3)	208,38
Coût Moyen de la Production (\$/m3)	33,53
Recette Nette moyenne (\$/m3)	174,85

Paramètres qui TIENNENT compte de la valeur du capital au fil du temps

Taux d'actualisation	4,00%
Valeur Actuelle des Recettes	76.122,10
Valeur Actuelle des Coûts	24.652,86
Valeur Actuelle Nette	51.469,24
Valeur Actuelle Nette Annualisée	3.561,61
Rapport Bénéfice/Coût	3,09
Taux de Rentabilité Interne	10,73%
Valeur Future des Recettes	180.403,20
Valeur Future des Coûts	58.425,28
Valeur Future Nette	121.977,92
Val. Espérée du Fonds (F. Faustmann)	89.040,25
Prix Moyen de la Production (\$/m3)	201,97
Coût Moyen de la Production (\$/m3)	65,41
Rentabilité Nette	208,78%

Rapport de coûts

Planin - Nouveau projet
Fichier Graphique Manuel Autres

Saisie de données

Résultat

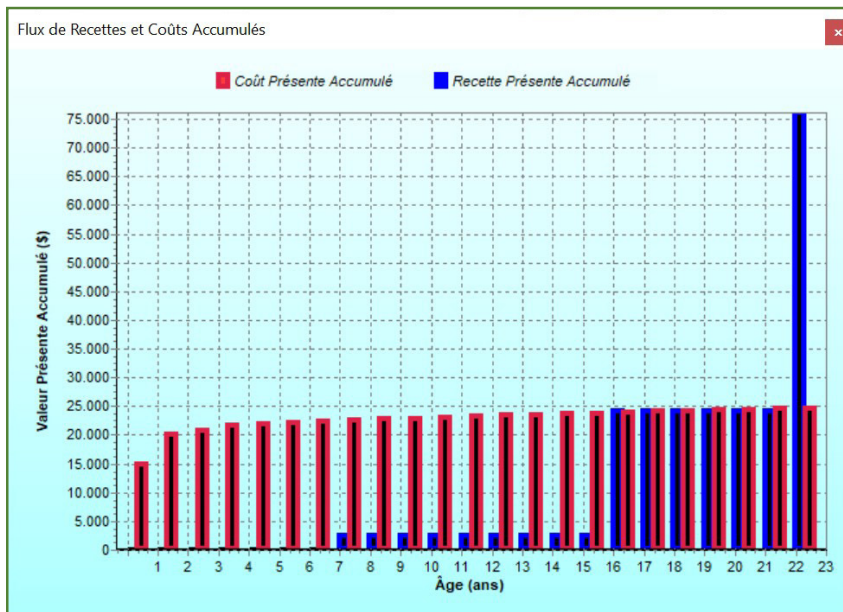
Analyse de sensibilité pour le taux d'actualisation (% a.a.)

Taux d'actualisation	V. Prés. Recettes	V. Prés. Coûts	V. Prés. Nette	V. P. N. Annualisée	Rap. Bénéfice/Coût
1,00	136.555,41	26.191,92	110.363,49	5.613,50	5,21
2,00	112.045,56	25.610,35	86.435,21	4.894,95	4,38
3,00	92.213,77	25.101,18	67.112,59	4.211,14	3,67
4,00	76.122,10	24.652,86	51.469,24	3.561,61	3,09
5,00	63.028,82	24.255,92	38.772,90	2.945,60	2,60
6,00	52.345,76	23.902,52	28.443,24	2.362,09	2,19
7,00	43.605,28	23.586,19	20.019,09	1.809,84	1,85
8,00	36.434,63	23.301,57	13.133,06	1.287,46	1,56
9,00	30.535,86	23.044,17	7.491,69	793,41	1,33
10,00	25.670,25	22.810,24	2.860,01	326,06	1,13
11,00	21.646,04	22.596,64	-950,60	-116,27	0,96
12,00	18.309,81	22.400,73	-4.091,92	-535,27	0,82
13,00	15.533,86	22.220,26	-6.686,40	-932,62	0,70
14,00	13.220,31	22.053,33	-8.833,03	-1.309,97	0,60
15,00	11.286,29	21.898,34	-10.612,04	-1.668,91	0,52

Analyse de sensibilité p. Coût de la Production (\$/ha) avec taux d'actualisation de 4,00% a.a.

Val. Prés. Coûts (\$/ha)	V. Prés. Nette	V. P. N. Annualisée	Rentabilité Nette (%)	Rap. Bénéfice/Coût
13.559,07	62.563,03	4.329,29	461,41	5,61
14.791,72	61.330,38	4.243,99	414,63	5,15
16.024,36	60.097,74	4.158,69	375,04	4,75
17.257,00	58.865,10	4.073,39	341,11	4,41
18.489,65	57.632,45	3.988,10	311,70	4,12
19.722,29	56.399,81	3.902,80	285,97	3,86
20.954,93	55.167,17	3.817,50	263,27	3,63
22.187,58	53.934,52	3.732,20	243,08	3,43
23.420,22	52.701,88	3.646,91	225,03	3,25
24.652,86	51.469,24	3.561,61	208,78	3,09
25.885,50	50.236,60	3.476,31	194,07	2,94
27.118,15	49.003,95	3.391,02	180,71	2,81
28.350,79	47.771,31	3.305,72	168,50	2,69
29.583,43	46.538,67	3.220,42	157,31	2,57
30.816,08	45.306,02	3.135,12	147,02	2,47

Rapport de coûts



RÉFÉRENCES

Corte, A.P.D, Sanquetta, C.R. (2007). Quantificação do estoque de carbono fixado em *Pinus* na área de domínio da floresta ombrófila mista no Paraná. *Cerne*, Lavras, v. 13, n. 1, p. 32-39.

Gouveia, V.M., Ângelo, H. (2002). Análise econômica do serviço de fixação de e armazenamento de carbono por um povoamento de *Tectona grandis* L. f. *Brasil Florestal*, v. 21, n. 74.

Hafley, W.L.; Buford, M.A. (1985). A bivariate model for growth and yield prediction. **Forest Science**, v. 31, n. 1, p. 237-47.

Hafley, W.L.; Schreuder, H.T. (1977). Statistical distribution for fitting diameter and height data in even-aged stand. **Canadian Journal of Forest Research**. v. 7, p. 481-487.

Oliveira, E.B. de, (1995). **Um sistema computadorizado de prognose de crescimento e produção de *Pinus taeda* L. com critérios quantitativos para a avaliação técnica e econômica de regimes de manejo**. Curitiba. Univ. Fed. do Paraná. 126p. Tese Doutorado.

Rondon, E. V. (2006). Estudo de biomassa de *Tectona grandis* L.f. sob diferentes espaçamentos no estado de Mato Grosso. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 337-341.

Saidelles, F.L.F.; Caldeira, M.V.W.; Schumacher, M.V.S.; Balbinot, R. (2009). Uso de equações para estimar o carbono orgânico em plantações de *Acacia mearnsii* De Wild. no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Árvore**. Viçosa. v.33, n.5, p. 907-915.

Schreuder, H.T.; Hafley, W.L. (1977). A useful bivariate distribution for describing stand structure of tree heights and diameter. **Biometrics**. V. 33, P. 471-7.

Silva, H.D. (2006). **Modelos matemáticos para a estimativa da biomassa e do conteúdo de nutrientes em plantações de *Eucalyptus grandis* Hill (ex- maiden) em diferentes idades**. UFPR, Tese de Doutorado. 101p.

Watzlawick, L.F., Sanquetta, C.R., Arce, J., Balbinot, R. (2003). Quantificação de biomassa total e carbono orgânico em povoamentos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze no sul do Estado do Paraná, Brasil. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**. v.1, n.2, p. 63-68.

CAPÍTULO 3

DEVELOPMENT AND TEST OF A LOW-COST TUNNEL SPRAYER FOR VINEYARDS

Data de submissão: 30/01/2023

Data de aceite: 14/02/2023

Antonio Odair Santos

Centro de Engenharia
Instituto Agrônômico (IAC)
Jundiaí-SP, Brasil
ORCID 0000-0001-9465-2242

Cláudio Alves Moreira

Centro de Engenharia/CEA
Instituto Agrônômico (IAC)
Jundiaí (SP), Brasil
ORCID 0000-0002-3172-4162

Antônio Carlos Loureiro Lino

Centro de Engenharia/CEA
Instituto Agrônômico (IAC)
Jundiaí (SP), Brasil
ORCID 0000-0003-2166-7667

ABSTRACT: A prototype of a recycling sprayer was tested in a vineyard envisaging to analyze the distribution of spray in the canopy leaves and the general spraying efficiency. The sprayer was developed at the Instituto Agrônômico (IAC) - Centro de Engenharia Agrícola, located in Jundiaí (São Paulo State, Brasil). The experiment was carried out from 2017 to 2020. The nozzles were fitted inside air spouts placed along vertical air ducts,

located so that two vertical converging air jets reached the canopy in two different opposite positions. Two vertical panels (1,20m x 1,90m) were installed on the same folding arms on which the air ducts were placed. The machine was enabled to perform electrostatic spraying. The excess liquid collected on the bottom of the panels was sucked back into the tank by a micro hydraulic pump. The prototype was submitted to field tests to verify the leaf spray coverage and the capability of the machine to save active ingredients during the spray. Leaf image analysis was used to study leaf spray coverage in field tests. The recycling device confirmed its efficiency with a saving of about 50% of active ingredients at the end of the treatments, and the use of electrostatic spray was beneficial for the leaf coverage uniformity, for spraying under high liquid pressure.

KEYWORDS: Viticulture. Spraying. Disease control.

DESENVOLVIMENTO E TESTE DE UM SISTEMA DE PULVERIZAÇÃO CONFINADA DE BAIXO CUSTO PARA VINHEDOS

RESUMO: Um protótipo de pulverizador reciclador foi testado em um vinhedo, com o objetivo de analisar a distribuição da pulverização no dossel e a eficiência geral da pulverização. O pulverizador foi desenvolvido no Instituto Agrônômico (IAC) - Centro de Engenharia Agrícola, localizado em Jundiaí (SP). O experimento foi realizado no período de

2017 a 2020. Os bicos de pulverização foram encaixados em mangueiras pressurizadas e dispostos ao longo de dutos de ar verticais, localizados de forma que duas colunas de jatos de ar convergentes atingissem o dossel em duas posições opostas. Dois painéis verticais (1,20m x 1,90m) foram instalados em um braço pivotante suspenso, onde também foram colocados os dutos de ar. A máquina foi habilitada para realizar a pulverização eletrostática. O excesso de líquido coletado na base dos painéis recebeu recalque para o tanque de pulverização por uma micro bomba hidráulica. O protótipo foi submetido a testes de campo para verificar a cobertura da pulverização foliar e a capacidade da máquina em economizar princípios ativos durante a pulverização. A análise de imagens foliares foi usada para estudar a cobertura da pulverização em campo. O dispositivo de reciclagem confirmou sua eficiência, com economia de cerca de 50% de princípios ativos, ao final dos tratamentos. O uso de pulverização eletrostática foi benéfico para a uniformidade da cobertura foliar, para pulverizações sob alta pressão de líquido.

PALAVRAS-CHAVE: Viticultura. Pulverização. Controle de doenças.

1 INTRODUCTION

In tropical viticulture, disease control is an important issue for grape growers, as it can affect the vine all along the seasons. Moreover, the increasing public concern about environmental pollution, which can be observed in recent years, has brought under the spotlight the problem of pesticide target loss during spray application in vineyards.

The results of research carried out in recent years, for conventional spraying, e.g. citrus, point out that even when modern sprayers, with directed jet and tangential airflow, are in use, the general values of spray are discouraging. Deposits comprise almost 33% in the plant, 23% in the soil, and 44% of evaporation and drift, of the total applied spray dose [4]. This result even though represents a remarkable improvement, concerning the traditional air-blast sprayers, which can place in the foliage only 15-35% of the total distributed liquid, unfortunately, does not show further potential for advancement.

Consequently, taking into consideration the low efficiency of common spraying techniques, loss-reducing methods have become necessary to maximize the pesticide spray efficiency in the canopy. Furthermore, leaf coverage uniformity is also important for disease control so, nowadays, the electrostatic spray is an important auxiliary technology for improving the leaf spray coverage.

During recent years several devices, such as air conveying devices and anti-drift nozzles were proposed and tested [9], [11], together with electronic sensors to adjust the spray to the crop [10], [14], [13]. In this view, recycling sprayers appear to be very promising [21], [17], because they can recover part of the active ingredient thus reducing the real applied dose. Furthermore, electrostatic spray can be added to recycling sprayers as an artifact for volume reduction in the spraying of vineyards.

In this view, this work aimed to develop a recycling tunnel sprayer to be used in vineyards and, in addition, to verify their general performance in the field, using leaf image analysis to determine leaf coverage uniformity.

2 METHOD

The experiment was carried out in the Centro de Engenharia e Automação/IAC, located in Jundiaí (Sao Paulo State, Brasil). The field tests were performed in a vineyard of the cultivar 'Isabel', established in the espalier system, spacing in 3m x 2m. The research was performed from 2017 to 2020. The experiment was a completely randomized design, and when necessary the means were compared by Tukey's test set at 5% probability with the help of the statistical analysis program SISVAR [8].

The prototype was equipped with a centrifugal fan and flexible air ducts; spray atomization was obtained by the spray nozzles, with hollow cone spray tip (Teejet Spraying Systems Co.), displaced along two vertical air ducts and located so that two converging air jets reached the canopy in two different opposite positions.

A recycling device was assembled by adding two vertical panels (1.2m x 1.9m), pending from sustaining arms, in which the air ducts were placed, and a horizontal shield was placed to cover them.

Each of the spraying units or single panel (Fig.1) consisted of an asymmetrical shield, each including: a) forced air from a centrifugal flow fan (maximum air flow rate: 1.2 m³/s), b) a vertical air duct (height: 1.8m; diameter 0.2m), fitted with six air jets (total outlet section: 58 cm²), spaced at 0.2m intervals.

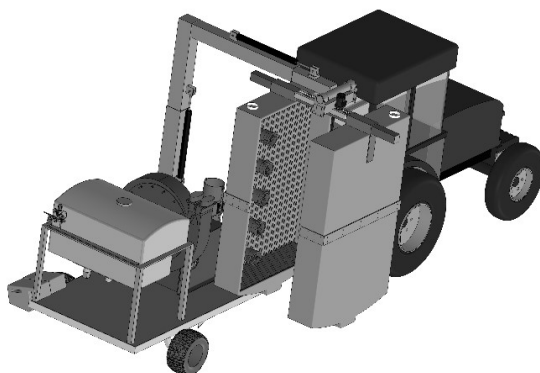
Excess liquid was collected on the bottom of the panels by a 1-bar pressure pump (flow rate 5 L/min), which after filtration, returns the recovered mixture to the spray tank.

The distance between the panels can be adjusted from 0.2 up to 1.0 m utilizing a hydraulic pump, plus a pinion and rack mechanism. The panels were enabled to move altogether through a hydraulic cylinder.

The sprayer was completed with a 400 L spray tank, a pressure regulator, and an oil pressure system (electric-over-hydraulic). A hydraulic power system, driven by the tractor's P.T.O. was used to operate the fans and a piston-type pump on the over-the-row structure.

The system included a lamellae screen located on the inner side of the recycling panels intended to separate the droplets from the airstream coming from the canopy.

Figure 1. CAD Design of the assembly of the recycling device.



2.1 RECOVERY RATE IN LABORATORY

In the laboratory, the performance of the sprayer was evaluated based on spray recovery trials, with water only, under static conditions, and in the absence of vegetation. The sprayer was fitted with 10 open cone nozzles, and the average medium flow rate was 7.92 L/min (at 345 kPa) in all experiments. The spray recovery rate was measured by collecting the water flow from the tube of the recycling system, previously disconnected from the tank. This involved adjusting the operational parameters of the sprayer: starting the sprayer and waiting until the water flow from the recycling pipe became steady; placing the end of the tube in a container (Volume capacity: 50 L), to collect the water flow; after four minutes, removing the tube's end and measuring the volume of water collector using graduated cylinders. In each test, the machine was allowed to spray for at least three minutes before taking the first measurement.

Two different tests were performed, in which the following settings were compared:

- tunnel opening: 0.50 m, and 1.00 m;
- with fan speed at 2600 RPM, corresponding to airflow rates of 2.10 m³/s, respectively.

2.2 RECOVERY RATE AND SPRAY DEPOSIT DISTRIBUTION IN THE VINEYARD

Another experiment was conducted in a vineyard aiming to analyze the distribution of spray into the canopy, onto the soil, and the off-target dispersion of the spray. In addition, it was also verified the capability of the machine to save active ingredients during the spray application.

Two vine rows were randomly selected in the vineyard, and six absorbing paper stripes were displaced on the soil. The absorbing stripes were spaced by 15 m in the planting row to verify the eventual drop of liquid onto the soil.

After the applications, 60 leaves and 60 bunches, per row, were randomly collected and packaged in identified plastic packages. Paper samples were also recollected, identified, and placed in plastic bags.

Subsequently, spray deposits were assessed with the procedure described by [15]. Each sample was washed using 100 mL of deionized water (leaves) or 200 mL (paper samples and bunches). Optical absorbance at 425 nm wavelength was assessed with a spectrophotometer (UV-VIS, Spectrum SP-2000), and spray deposits (d , in μL) were calculated as:

$$d = 10^3 \frac{wA}{A_m} \quad (1)$$

where w , in mL, is the volume of water used to remove the tracer; A the absorbance of the washing solution; A_m is the absorbance of the applied spray mixture. Deposits were then expressed in $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of leaf area (i.e., the total area of both leaf sides), $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ground area (paper samples), or $\mu\text{L}/\text{g}$ fresh weight (bunches). Results were converted to the percentage of applied volume.

Along the experiment, for any row used in the trial, six vines were randomly chosen for the assessment of the averaged leaf area index (LAI). A computational algorithm (Vitiscanopy) was used to calculate the LAI [6]. It uses the 'in locus' image analysis to calculate the canopy architectural parameters, which are based on gap analysis from upward-looking images of canopies and the transmission of light through the canopy to estimate LAI based on Beer's Law [6].

2.3 LEAF COVERAGE IN A VARIED SPRAY CONFIGURATION

A set of experiments were designed, for different dates, and it was verified the capability of the machine to cover the leaves with the active ingredient under certain conditions: a) electrostatic and conventional spray; b) comparison with traditional spray application technique (Air-blast Sprayer).

Vine rows were randomly selected, and a completely randomized design was set.

The application of liquid was performed under a pressure of 345 kPa, with the tractor's PTO speed of 540 RPM. The speed of the application was 3.5 km/h. The volume of liquid applied was 100 L/ha. Yellow-Saturn was used as a marker of the applied liquid, in the proportion of 1g/L of water.

In the vineyard, four rows were randomly selected for analysis of leaf coverage, and the leaves were sampled in the inner and outer portions of the upper, middle, and lower thirds of the canopy, totaling 60 samples.

The leaves were collected with the help of scissors and stored in a paper bag and taken to the lab. During the application, the temperature varied between 24.5 and 26°C, the relative humidity between 55 and 60%, and the wind speed between 1.5 and 3,5 m. s⁻¹.

After each application, six vines were randomly chosen in the analyzed rows, for the assessment of the leaf area index (LAI) [6].

Each sample from the rows was taken to the laboratory and fixed on a white plate to facilitate the separation of the leaves and the background. The leaves were photographed in a dark environment, under ultraviolet light, to evidence the drops containing the fluorescent marker. A Canon digital camera (model EOS Rebel T5) was used with special lenses (Canon EF 50 mm), positioned at a distance of 40 cm.

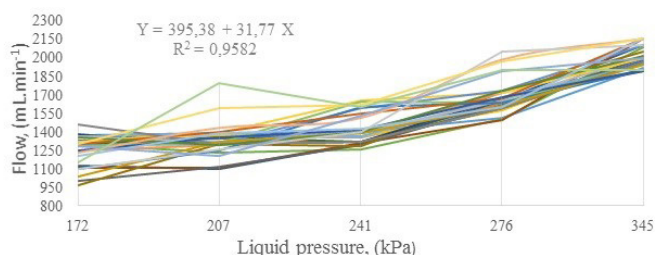
The images obtained were processed and analyzed in the Image-J software (National Institute of Mental Health, Ca, USA), for which a computational routine was developed to automate these operations and finally segregate the total droplet coverage in the leaf blades.

3 RESULTS

Results from the relation between liquid pressure and flow rate are shown in Fig. 2.

Analyzing the curves together it is noted that, generally, within the adopted pressure interval, a flow control can be made, which ranges from an average of 1200 ml.min⁻¹ to 1900 ml.min⁻¹. This represents an adequate amplitude for application rates of a wide range of pesticides, from ultra-low volume to high volume.

Figure 2. Relation between water flow rate and pump pressure for the recycling sprayer.



By the regression equation (Figure 2), it is noted that for each unit of pressure increase, there is an increase of 31.77 mL.min⁻¹ of liquid flow, which is the degree of resolution achieved, with a high value for the coefficient of determination.

The laboratory test for the varied distance between the tunnel's walls shows a maximum recovery rate of 97.3% in a static test (Table 1). The reduction in the recovery rate at increasing distances between the tunnel's walls was largely expected. Therefore,

a minimum of 60.5% recovery rate was recorded at the 1,0 m distance, in the absence of air flux. Turbulence is responsible for the generation of greater losses at larger distances. However, with no fan, the water flux without the help of an air stream causes the flux of droplets to be diverted outside of the shields.

During the tests, the spray recovery rate was little affected by the air flow rate adjustments. This is promising in face of the work outside in the field since it suggested that it would be possible to adjust for a correct air flow rate to get better liquid penetration. This can help to reach leaves in the internal part of the vine canopy, during spray application in the vineyard, without affecting the potential recovery rate of the sprayer.

Results from Table 1 suggest that the increase in the distance between the shields makes the recovery worse, so shields should be used as close as possible, following the vine canopy size.

Table 1. Averaged values for recovery rate, for three runs of static test for pressurized liquid (345 kPa) and not pressurized liquid.

Tunnel opening (m)	Recovery rate, %		Averaged air flow within the inlets (m/s)
	Liquid pressure (no fan)	Fan pressurization (2600 RPM)	
0.50	75.1±1.0 a	95.0±0.1 c	9.2
0.50	76.3 ±0.61 a	97.3 ±0.5 c	9.2
1.0	60.5 ±1.4 b	81.4 ±1.0 d	9.2
1.0	62.0 ±0.9 b	83.0 ±1.0 d	9.2

For the same line and column, data followed by the same letter do not differ by Tukey test (P<0,05).

In the test carried out to verify the deposit distribution in the vineyard, the liquid recovery rate ranged from 53.3% to a minimum of 39.4% (Table 2).

There is a decrease in the values, as now there is the presence of the canopy, as compared to the static test depicted in Table 1, without the presence of vegetation. According to Table 2, the major part of the applied volume was retained in the canopy, with similar values between rows. A small fraction was diverted to the soil, and being the rest considered as drift plus evaporation.

There was an increase in the drift values in row three, which could be due to increased variation in the wind speed during the application or eventually increased deposition onto the vineyard structure (posts and wires), deposition on parts of the vines other than leaves (trunks, stems, petioles), deposition on the sprayer itself. Most of this deposition is in the inside part of the machine and the lamellae installed in the inner part of the shields.

Table 2. Averaged Spray deposition and losses (% of volume applied), for three rows in a vineyard, during the 2018 growing season; liquid pressure at 345 kPa; fan pressurization at 2600 RPM.

Row			Total distributed (%)		
	Volume Applied (L/ha)	Recovery rate (%)	Canopy and bunches	Soil	Drift and evaporation
R 1	200	53.3	42.8	2.3	2.7
R 2	200	49.2	46.5	3.3	1.0
R 3	200	39.4	48.3	1.7	10.6

Table 3 shows the influence of LAI development on the recovery rate. On August the third, a date before bud break, the LAI is zero, and the recovery rate is at its highest value. As the LAI unfolds during the growing season, the recovery rate shows a decreasing profile, since the canopy increases the interception of applied liquid volume.

Table 3. Averaged values for recovery rate, on different dates, for two vine rows, under pressurized liquid and at 345 kPa and fan pressurization at 2600 RPM.

Trial date (2018)	LAI	Tunnel opening, (m)	Recovery rate %	Volume sprayed (L/ha)
Aug-3	0	0.70	69	200
Sept-3	0.29	0.65	50	200
Sept-11	0.53	0.60	57	250
Sept-30	0.70	0.70	50	350
Oct-9	0.98	0.70	39	400
Nov-3	1.60	0.70	30	420

Tables 4 and 5, show some representative samples of the leaf coverage results, obtained using two available spray techniques in the developed prototype, the electrostatic spray (ES) and the traditional spray (TS), with no electrostatic charge.

In the images, the increased black color represents increased leaf coverage.

In most of the investigations involving spraying the total deposits are always considered as a measure of spraying efficiency [3].

However, the distribution of spray in the leaves is an important point to be considered as, for example, the fungi can penetrate the leaf tissues even with a good total deposit, as that amount of ingredients does not always cover all the leaf blades.


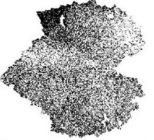
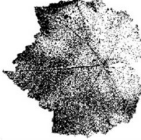
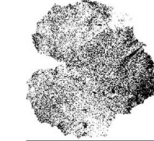
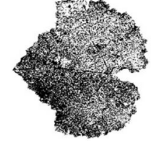
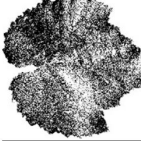



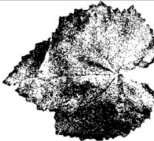
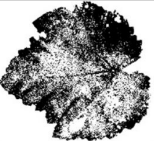
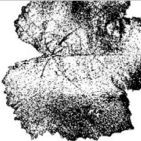
Table 4 and 5 shows good results for spray leaf coverage, even for the internal leaves, were achieved, no matter the technique used.

However, when considering all data and only spray techniques, Table 8, which depicts the output of statistical analysis, shows that there was an improvement in leaf cover by adding electrostatic spray, as compared to the traditional spray results.

Even though the minimum result for leaf coverage was 27.14% for traditional spray, and all values for leaf coverage, regardless of the spray technique are well above 30 % of leaf coverage (Tables 4 and 5).

According to some authors, a baseline value of 30% in leaf coverage was considered enough to protect the orange [18] and sugarcane leaves [19], from disease infection. It wasn't found similar research results for vineyards, however, following the cited authors, all values from Tables 4 and 5 are far greater than 30 % which can be considered an adequate level of leaf coverage to protect the vines from diseases.

Table 4. The subsamples of spray leaf coverage (%) for electrostatic spray.

Traditional spray - external leaves		
1 EXT	2 EXT	3 EXT
		
44.08 %	42.22 %	46.57 %
4 EXT	5 EXT	6 EXT
		
35.36 %	52.77 %	53.76 %
Traditional spray - internal leaves		
1 INT	2 INT	3 INT
		
27.14 %	43.25 %	51.08 %
4 INT	5 INT	6 INT
		
51.26 %	56.29 %	46.69 %


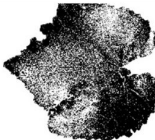
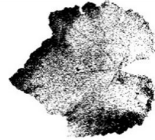
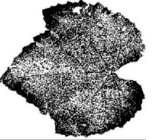
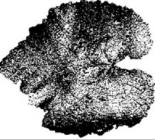
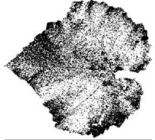
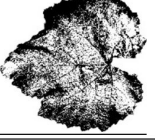
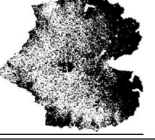

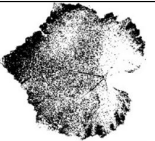
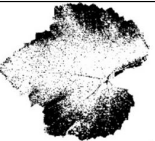
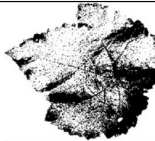
Ext = external; Int= internal.

Tables 6 and 7 show the results for spray leaf coverage, using two different spray machines, in a separate experiment. For the air-blast machine (AB), a minimum of 12.48% in leaf coverage was recorded. However, most of the values are higher than 50%. Table

6 depicts the results of adequate coverage, even though the losses of spray liquid to the ambient are knowingly always large.

Generally, air-blast machines use a higher liquid pressure to spray small-sized droplets. Traditionally, they use nozzles that also contribute to producing those droplet sizes. The small droplets are transported farther into the canopy than large droplets and provide better coverage inside the canopy. Electrostatic spray, in its turn, depends on air turbulence and electric attraction between the leaves and the charged droplet, to penetrate the canopy depth.

Table 5. The subsamples of spray leaf coverage (%) for traditional spray.


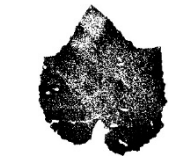
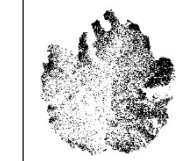
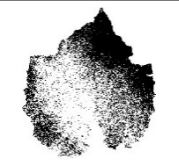
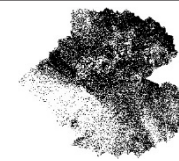
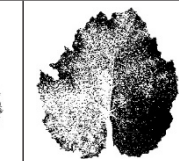
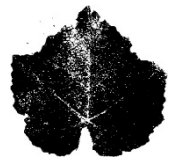

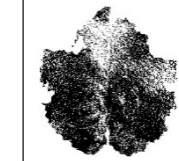

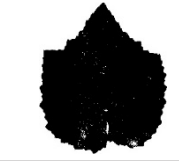
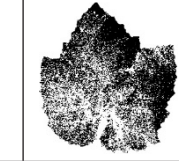
Electrostatic spray - external leaves		
1 EXT	2 EXT	3EXT
		
63.72 %	64.41 %	41.98 %
4 EXT	5 EXT	6 EXT
		
59.78 %	60.27 %	42.42 %
Electrostatic spray - internal leaves		
1 INT	2 INT	3 INT
		
52.90 %	57.68 %	38.19 %
4 INT	5 INT	6 INT
		
42.49 %	37.93 %	44.75 %

Ext = external; Int= internal.

When the prototype was used with the electrostatic option (Table 7), average coverage values were higher as compared to the air-blast spray machine. These data are significantly different, according to Table 8. When adding the values for the traditional

spray (TS), in the analysis, highlight the results for electrostatic spray, which were higher and different statistically, as compared to TS and AB.

Table 6. The subsamples of spray leaf coverage (%) for air-blast spray (AB).

1	2	3
12.48%	75.61%	30.3%
		
4	5	6
		
45.13%	53.42%	54.63%
7	8	9
		
97.22%	94.53%	67.88%
10	11	12
		
88.1%	98.66%	58.37%

Considering that the spray was performed at high liquid pressure (345 kPa), one can see that, at least at this pressure level, the developed prototype can deliver an adequate spray, when compared to a similar machine, traditionally present in the market (air-blast machine).

Table 7. The subsamples for spray leaf coverage for electrostatic spray.









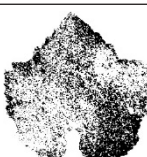



Electrostatic spray		
1	2	3
		
99.92%	99.99%	100%
4	5	6
		
100%	60.75%	64.69%
7	8	9
		
61.56%	77.36%	38.88%
10	11	12
		
100%	99.99%	100%

Table 8. Averaged data for spray leaf coverage values according to leaf positioning and spray techniques.

Averaged Spray leaf coverage (%)						
Leaf positioning				Spray technique		
Electrostatic (ES)		Traditional (TS)				
Int	Ext	Int	Ext	ES	TS	AB
45.66	55.43	45.95	46.63	83.60	45.87	64.69
a	a	a	a	a	b	a

Data followed by the same letter do not differ by the Tukey test ($P < 0,05$). Int=internal leaves; Ext= external leaves; ES=electrostatic spray; TS – traditional spray; AB= air-blast spray.

4 DISCUSSION

Laboratory and field tests have shown to be advantageous the application of a recycling sprayer, based on air assisted system and thin-walled, self-leveling aluminum

containment shields, which provided a high recovery rate of the applied ingredient to the vine. The potential recovery under static conditions was 60.5% to 97.3% at 0.50 m and 1.00 m shield openings, respectively, and clearly decreased by 1.00 m, suggesting that better performance is expected when using the recycler prototype on proper-managed vertical shoot positioning canopies.

Under dynamic conditions, however, the maximum spray recovery rate decreased due to the presence of the canopy, and the effect of additional wind flow, entering the tunnel from the front opening, even at low operating speeds (3, 5 km/h - 4 km/h). Adjusting a stripped plastic curtain on the front and back could partially offset this effect, resulting in an even higher recovery rate.

Henceforth, this also suggests that the prototype can be improved by increasing the forced air flow rate, or by using additional air jets to protect the front and rear openings of the panels by forming protective air curtains. This detail may increase the degree of confinement.

The actual recovery rate of applied liquid, in the vineyard, was maximum before bud break (69%), but still moderate rates (30% to 57%) throughout the grapevine growing season and was, as expected, affected by the development of the LAI.

These values were generally better than those reported in the literature for sprayers, either without forced air assistance [5], [2], or equipped with axial fans [12], [17].

The drift rates observed in the field were, as expected very low compared to the ones observed in traditional not-tunneled machines. The same low values were noticed for the spray loss onto the soil. Other authors working with various crops also showed similar drift or soil spray loss values for fruit in general [7] and, particularly, for grapevine [1].

As shown, a tunnel sprayer may not only reduce drift and improve leaf deposit; it also makes it possible to collect and reuse the overspray.

Total leaf and bunches deposition found in this experiment ranged from 42.8% to 48.3%, being close to values found elsewhere with a similar axial-fan sprayer previously tested under comparable conditions [1], [16]. The differences can be attributed to the variations in LAI, since, as demonstrated, leaf deposition tends to increase when leaf area increases.

The major advancement in tunnel spray application technology, in the near future, could be matching the sprayer characteristics to the target canopy. This could be accomplished by using a system of sensors that detect the height, shape, and density of the plants, and adjust the sprayer.

Several methods of measuring the plant size and shape have been used: ultrasonic sensors [10], infrared, and machine vision [20]. The last authors concluded that measured

plant structure could be used to adjust applied spray ingredients, and this would reduce the amount of pesticide required.

An imagery system would measure the plant structure and calculate the air velocity, spray application rate, and spray droplet spectrum for each directed jet. Each directed jet could be individually turned toward the parts of the tree with denser foliage or greater disease pressure to give optimum spray coverage. The jet velocity could also consider the ambient wind velocity to ensure an optimum canopy penetration. The direction of the directed jets could also consider the location of target pests, i.e., on top or bottom of leaves, in the center of the plant canopy, or on edges.

All these operations will occur as the sprayer moves down in the row. This type of spray control should provide still more uniform leaf coverage with a minimum of spray drift, possibly close to zero.

5 CONCLUDING REMARKS

With a prototype of a towed recycler sprayer, with a confinement chamber, based on floating shield panels, it was possible to recycle the liquid at around 50% of the applied dose, for a vineyard with a developed LAI. It was able to promote an adequate percentage of leaf coverage.

The distance between shield panels and the ventilation conditions influenced the spray liquid recycling capacity.

The prototype, equipped with operational tools easily available on the domestic market, is a valid solution for the mechanization requirements of phytosanitary treatments, in vines grown in espaliers and similar crops.

REFERENCES

- [1] Anifantis, A. S., Pascuzzi, S, Santoro, F. In: IX International Scientific Symposium “Farm Machinery and Processes Management in Sustainable Agriculture”, Lublin, Poland. (2017). Applied Biology 57: Pesticide Application, 285-292.
- [2] Baldoin, C., de Zanche, C., Sorgato F., Zanardi, W. Performances of a new shielded sprayer on a vineyard. Annual Review of Agricultural Engineering. 1 (2005) 257-265.
- [3] Chaim, A. Pulverização eletrostática com bicos hidráulicos. Revista ecotoxicologia e meio ambiente. 17 (2007) 67-74.
- [4] Chaim, A., Pessoa, M. C. P. Y., Ferracini, V. L. Eficiência de pulverização em videira, comparando bicos e pulverizadores. Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente. Curitiba. 14 (2004) 39 – 46.
- [5] Cross, J.V., Walklate, P.J., Murray, R.A., Richardson, G.M. Spray deposits and losses in different sized apple trees from an axial fan orchard sprayer: 3. Effects of air volumetric flow rate. Crop Protection. 22 (2003)381-394.

- [6] De Bei R., Fuentes S., Gilliam M., Tyerman, S., Edwards E., Bianchini, N., Collins, C. VitisCanopy: A free computer app to estimate canopy vigor and porosity for grapevine. *Sensors*. 16 (2016) 585-595.
- [7] Doruchowski, G., Holownicki, R. *Crop Protection*. 19 (2000) 617-622.
- [8] Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*. 35 (2011) 1039-1042.
- [9] García-Ramos, F.J., Serreta, A., Boné, A., Vidal, M. Applicability of a 3D Laser Scanner for Characterizing the Spray Distribution Pattern of an Air-Assisted Sprayer. *Journal of Sensors*. 1 (2018) 1-7.
- [10] Gil, E., Rosell, J., Planas, S., Val, L. Variable rate application of plant protection products in the vineyard using ultrasonic sensors. *Crop Protection*. 26 (2007) 1287-1297.
- [11] Gregorio, E., Torrent, X., Planas, S., Rosel-Polo, J.R. *Science of the Total Environment*. 687 (2019) 967-977.
- [12] Knewitz, H., Weisser P, Koch, H. Drift-reducing spray application in orchards and biological efficacy of pesticides. *International advances in pesticide application*. 66 (2002) 231-236.
- [13] Maghsoudi, H., Minaei, S., Ghobadian, B., Masoudi, H. *Computers and Electronics in Agriculture*. 112 (2015) 149-160.
- [14] Pérez-Ruiz, M., Agüera, J., Gil, J.A. Optimization of agrochemical application in olive groves based on positioning sensor. *Precision Agriculture*. 12 (2011) 564-575.
- [15] Pergher, G., Petris, R. Canopy structure and deposition efficiency of vineyard sprayers. *Journal of Agriculture Engineering*. 2 (2007) 53-60.
- [16] Pergher, G., Gubiani, R. The effect of spray application rate on foliar deposition in a hedgerow vineyard. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 61 (1995) 205-216.
- [17] Pergher, G., Gubiani, R., Sirio, R.S., Cividino, S.R.S., Dell'Antonia, D., Lagazio, C. *Crop Protection*. 45 (2013) 6-14.
- [18] Ramos, H. H., Yanai, K., Corrêa, I. M., Bassanezi, R. B., Garcia, L. C. Características da pulverização em citros em função do volume de calda aplicado com turbopulverizador. *Engenharia Agrícola*. 27 (2007) 56-65.
- [19] Schneider, J. L., Oliveira, G. M., Balan, R. E., Canteri, M. G., Saab, O. J. G. A. Cobertura de gotas de pulverização obtida com diferentes pontas e taxas de aplicação na parte aérea da cana-de-açúcar. *Ciência Rural*, 43 (2013) 797-802.
- [20] Walklate, P. J., G. M. Richardson, J. V. Cross, M. R. A. Relationship between orchard tree crop structure and performance characteristics of an axial fan sprayer. *Applied Biology*. 57 (2018) 285-292.
- [21] Wenneker M., Van de Zande, J. Drift reduction in orchard spraying using a cross-flow sprayer equipped with reflection Shields. *The CIGR E-journal*. 10 (2008).

CAPÍTULO 4

CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS Y SOCIOECONÓMICAS DE LA PRODUCCIÓN DE MAÍZ EN UNIDADES DE PRODUCCIÓN FAMILIAR DE OAXACA, MÉXICO

Data de submissão: 20/01/2023

Data de aceite: 14/02/2023

Rafael Rodríguez Hernández

Investigador Titular del
Programa de Socioeconomía del
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental
Valles Centrales de Oaxaca
Santo Domingo Barrio Bajo, Etlá
Oaxaca, México
<https://orcid.org/0000-0003-2723-0781>

Pedro Cadena Iñiguez

Investigador Titular del
Programa de Socioeconomía del
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental
Centro de Chiapas
Ocozocuautila de Espinosa
Chiapas, México
<https://orcid.org/0000-0003-3929-5822>

RESUMEN: Como parte del Programa de Desarrollo Territorial (PRODETER), se realizó un diagnóstico técnico productivo de las Unidades de Producción Familiar (UPF) ubicadas en el territorio de Ejutla de Crespo, Oaxaca con la finalidad de caracterizarlas

tecnológicamente, identificar la problemática productiva; definir y estimar los indicadores productivos de línea base para contrastar los avances de la intervención; y elaborar una propuesta de modelo tecnológico con base en las tecnologías disponibles. Se diseñó una encuesta en una aplicación móvil que constó de ocho módulos de recopilación de información y se entrevistaron a 43 responsables de UPF que significan el 15 % de los integrantes del Programa en el territorio. La información recabada se vació a una base de datos en Excel y se realizó un análisis estadístico no paramétrico; adicionalmente se realizaron recorridos de campo con los actores, se analizaron muestras de agua y suelo y se participó en reuniones de trabajo con los actores. Los resultados indicaron que la principal actividad económica de las UPF es la agricultura, el principal cultivo es el maíz, el cual se realiza bajo el sistema denominado “milpa” en donde además del maíz se produce frijol, calabaza y quelites, otros cultivos importantes fueron las hortalizas y Agave mezcalero; la producción de maíz en el territorio fue insuficiente para cubrir el consumo de la UPF durante el año ya que equivalió solamente al 30 % de lo que se demandó, el principal problema es el bajo rendimiento de grano causado principalmente por sequía en la etapa de floración y formación de la mazorca, además de problemas fitosanitarios; existe una diversidad de maíces nativos que está en riesgo de desaparecer. Se concluye que es

necesario enfrentar el problema de sequía mediante prácticas de conservación de suelo y agua e implementar una estrategia de conservación y mejoramiento de los maíces nativos.

PALABRAS CLAVE: Unidad de producción. Productividad. Maíz.

PRODUCTIVE AND SOCIOECONOMIC CHARACTERISTICS OF CORN PRODUCTION IN FAMILY PRODUCTION UNITS OF OAXACA, MEXICO

ABSTRACT: As part of the Territorial Development Program (PRODETER), a productive technical diagnosis of the Family Production Units (UPF) located in the territory of Ejutla de Crespo, Oaxaca was carried out in order to characterize them technologically, identify the productive problem; define and estimate the baseline production indicators to contrast the progress of the intervention; and prepare a proposal for a technological model based on the available technologies. A survey was designed in a mobile application that consisted of eight information-gathering modules and 43 UPF managers were interviewed, representing 15% of the members of the Program in the territory. The information collected was entered into an Excel database and a non-parametric statistical analysis was performed; In addition, field trips were made with the actors, water and soil samples were analyzed, and work meetings with the actors were participated. The results indicated that the main economic activity of the UPF is agriculture, the main crop is corn, which is grown under the system called “milpa” where, in addition to corn, beans, squash and quelites are produced, other important crops were the vegetables and Agave mezcalero; the production of corn in the territory was insufficient to cover the consumption of the UPF during the year since it was equivalent to only 30% of what was demanded, the main problem is the low grain yield caused mainly by drought in the flowering stage and ear formation, as well as phytosanitary problems; there is a diversity of native maize that is at risk of disappearing. It is concluded that it is necessary to face the drought problem through soil and water conservation practices and implement a strategy for the conservation and improvement of native maize.

KEYWORDS: Production unit. Productivity. Maize.

1 INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los lineamientos del Programa de Desarrollo Rural de la Secretaría de Agricultura del gobierno federal y considerando el índice de marginación como uno de los criterios básicos (DOF, 2019), se definieron en el país las áreas prioritarias de atención denominadas territorios del Programa de Desarrollo Territorial (PRODETER) en donde se implementaron cuatro componentes:

- Desarrollo de Capacidades de los productores mediante capacitación y fomento a la organización, Extensión y Asesoría Rural a través de la incorporación de técnicos en los territorios.
- Integración Económica de las Cadenas Productivas mediante la identificación de proyectos de inversión detonantes para el territorio.

- Fortalecimiento de las Unidades de Producción Familiar mediante apoyos concretos de recursos para mejorar la producción en el corto plazo.
- Investigación y Transferencia de Tecnología. Este último componente pretende articular la investigación con el extensionismo para promover la aplicación de mejoras tecnológicas, así como atender problemas estructurales del medio rural o de las cadenas productivas.

En el territorio Heroica Ejutla de Crespo, El INIFAP participó como Institución de Enseñanza e Investigación, por lo que se consideró como primera acción la realización de un diagnóstico técnico productivo de la Unidades de Producción Familiar (UPF), cuyo concepto fue planteado por Cuanalo (2003). El diagnóstico se concibe como un documento ejecutivo a través del cual debe dar respuesta a las siguientes preguntas:

¿Qué y cómo están produciendo los productores?

¿Con qué recursos naturales cuentan y cuál es el estado en que se encuentran?

¿Cómo se puede mejorar el proceso productivo?

¿Cuál es el nivel de productividad actual y cuál es el potencial del territorio?

¿Cuáles son las innovaciones tecnológicas disponibles adecuadas para el territorio?

¿Cuál es el principal mercado del producto o productos que se generan?

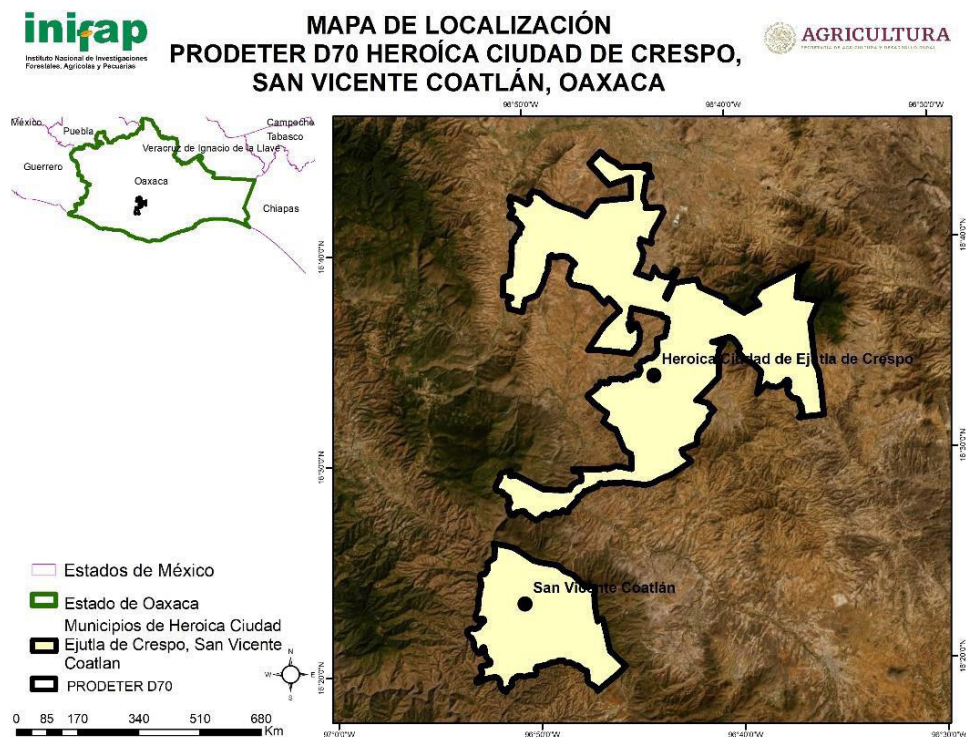
El objetivo fue caracterizar tecnológicamente las Unidades de Producción Familiar ubicadas en el territorio de H. Ejutla de Crespo; Identificar la problemática productiva; definir y estimar los indicadores productivos de línea base para contrastar los avances anuales de la intervención en el territorio. En este trabajo se presentan los resultados de dicho diagnóstico.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN DEL TERRITORIO

El PRODETER denominado por los integrantes “Unión de campesinos de Ejutla” se ubicó en el estado de Oaxaca y comprendió los municipios, H. Ciudad de Ejutla de Crespo, Coatecas Altas, La Compañía, San Miguel Ejutla, y San Vicente Coatlan, ubicados en el sur de la región denominada Valles Centrales de Oaxaca. En la Figura 1 se puede observar el mapa de localización y delimitación de este territorio.

Figura 1. Localización del PRODETER H. Ejtula de Crespo, Oax.



2.2 MARCO DE MUESTREO

Para la determinar el tamaño de la muestra se utilizó la fórmula sugerida por Snedecor y Cochran (1967) citados por Rojas (1979) y Donnet et al., (2015) En ella se indican que los elementos deben ser seleccionados mediante un sorteo al azar con reemplazo para el caso de los productores representantes de cada UPF, que intervengan en el PRODETER y de acuerdo a las características numéricas del universo de productores. Para lograr lo anterior, se utilizó la lista o padrón de productores establecido en el acta de cierre de constitución del PRODETER cuya asamblea y proceso de constitución fue coordinado por el técnico planificador y los extensionistas asignados para el territorio. Se utilizó la siguiente formula de muestreo:

$$n = \frac{\frac{Z^2 p_n q}{d^2}}{1 + \frac{Z^2 p_n q}{N d^2}}$$

Donde:

Z= Nivel de Confianza

d= Nivel de precisión

pn= Proporción de la población que pertenecen al grupo de interés

q = (1 - pn)

N = Tamaño de la Población

n = Tamaño de la Muestra

De esta forma los valores asignados a cada elemento para el cálculo del tamaño de muestra en este estudio si fuera el caso que de una primera submuestra los sujetos a entrevistar hayan realizado X actividad y de 10 ITEMS, 9 pertenecen al grupo de interés entonces se sustituyen los valores como sigue:

Z= 95 % (1.96)

d= 10 % (0.10)

p= 0.9 Proporción de la población que pertenecen al grupo de interés

q= 0.1 (1 - pn)

N= 273 productores participantes en el PROGRAMA Desarrollo Rural en el territorio

El resultado fue: n= 31 entrevistas

Con la finalidad de garantizar la validez de los resultados y permitir hacer inferencias válidas sobre la población (N), se realizaron en total 43 entrevistas (15.75 % de N), es decir un 38 % adicional al tamaño de muestra requerido con una confiabilidad del 95%, lo cual da cumplimiento con lo establecido en los lineamientos de operación del Programa de Desarrollo Rural en el sentido que la muestra debe ubicarse entre el 10 y el 20 % de la población.

2.3 EL INSTRUMENTO PARA RECOPIRAR INFORMACIÓN

El cuestionario ubicado en una aplicación móvil diseñado para sistema operativo Android estuvo integrado por los siguientes módulos: Datos del productor, datos de la UPF, Información general de los cultivos en la UPF, Módulos específicos de cultivos (maíz), infraestructura, maquinaria y equipo, comercialización. La información recabada se vació a una base de datos en Excel y se analizaron mediante estadística no paramétrica. Para complementar la información se hicieron recorridos de campo con los beneficiarios para ver la situación de sus predios y sus cultivos, se tomaron algunas muestras de suelo y agua en predios donde fue posible hacerlo y además se realizaron asambleas con los productores beneficiarios pertenecientes al PRODETER.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 INFORMACIÓN GENERAL DE LAS UPF

En cuanto a la edad del productor (jefe de familia), el máximo valor fue de 85 años, mientras que el mínimo fue de 24, dando un promedio de 56 años, por lo que se podría decir que no es una población vieja sino más bien madura, se observó cierta incorporación de población joven a las actividades de la unidad de producción. En cuanto al número de integrantes de la UPF, el dato máximo fue de 11 y el mínimo de 1 integrante, por lo que el promedio de integrantes fue de 4.5 por UPF, por lo que el tamaño se considera medio, se constató que no es frecuente encontrar familias con bastantes integrantes, esto influye en la distribución de las tareas del campo, es decir, en la división del trabajo. Respecto al nivel de estudios de los responsables de las UPF, se encontró que prácticamente la mitad tiene la educación primaria (49 % de los entrevistados), el 30 % tiene educación secundaria y el 19 % no tiene estudios; por lo que la mayoría de los integrantes del PRODETER sabe leer y escribir, lo cual puede significar un factor determinante respecto a los medios en que pueden utilizarse para hacer llegar la información de mejoras tecnológicas y en general sobre capacitación y acceso a la información (por ejemplo medios escritos), así como la posibilidad de implementar procesos de innovación acordes y accesibles.

3.2 ACTIVIDADES ECONÓMICAS

Respecto a las principales actividades económicas de la UPF, se encontró que la agricultura es la fuente de ingresos y ocupación de los integrantes en un 100 %. De este porcentaje una proporción de UPF se dedica también a la ganadería como actividad complementaria (el 16 %), estas son familias que cuentan con su yunta y algunas cabezas de ganado lechero, ovinos y caprinos. Solamente un 2 % reportó actividad comercial como preponderante por encima de la actividad agrícola. De esta situación se desprende que prácticamente todas las UPF en el territorio tienen como principal actividad económica a la agricultura a la cual se dedican los integrantes de la familia, de la cual obtienen sus alimentos básicos (maíz, frijol, calabaza, hortalizas y otros) y en algunos casos muy esporádicos generan excedentes para el mercado. Dentro de la agricultura que se practica en la UPF, el maíz es el cultivo por excelencia ya que 38 de 43 UPF reportaron a este cultivo como el principal, mientras que el jitomate, frijol y calabacita fueron otros cultivos importantes.

3.3 CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN DE MAÍZ

La mayoría de los productores cultivan el maíz criollo blanco (84 %), mientras que solo un 7 % manifestó cultivar maíz de color (ya sea amarillo, rojo o negro) y un 9 % no especificó el tipo de maíz (Figura 2). Esto quiere decir que los productores prefieren el maíz blanco por sus características propias para la alimentación como la elaboración de productos, dentro de ellos las tlayudas, atole, nicuatole, etc. Por otro lado, se detectó que existe un cierto riesgo de desaparición de los maíces nativos.

Figura 2. Maíces criollos cultivados en Ejutla de Crespo, Oax.



Respecto al sistema de cultivo, el 72 % de los entrevistados practica el sistema milpa, esto quiere decir que al maíz le agregan otros cultivos propios del sistema como calabaza criolla (Chompa, Tamala y/o Guiche) y frijol enredador, así como se favorece la presencia de arvenses comestibles denominados quelites; de esta forma, de la milpa obtienen complementos alimenticios importantes en su dieta, lo cual concuerda con lo planteado por Leyva-Trinidad (2020). El rendimiento promedio estimado fue de 963 kg/ha de grano, el cual se considera bajo, aún bajo el sistema milpa. Al respecto Boada y Espinosa (2016) señalan que el rendimiento de maíz es causado generalmente por múltiples factores que al conjugarse unos con otros provocan la baja productividad, en este caso al abordar las causas de este nivel de rendimiento, los productores manifestaron haber tenido algún grado de siniestro en su cultivo del año inmediato anterior, ya que el 84 % mencionó haber presentado pérdidas importantes en la producción de maíz y solamente el 16 % manifestó no haber tenido pérdidas. Cuando se les preguntó la causa

de ese siniestro la mayoría respondió que fue la sequía la principal causa, señalando que no llovió lo suficiente como para garantizar una cosecha regular e incluso este problema se ha presentado de manera recurrente en la región, indicando que ya van dos años que no llueve lo suficiente.

De acuerdo con información generada por la CONAGUA (2020) y Rodríguez et al., (2021) en el observatorio del Aeropuerto de Oaxaca (estación más cercana al territorio), en total llovieron 880 mm en todo el año, pero se puede observar en la Figura 3 que la mayor concentración de la lluvia fue en los meses de junio y julio que es la etapa de desarrollo de la planta, mientras que en agosto hubo un decremento drástico a solo 69.92 mm coincidiendo con la etapa de floración y llenado de grano, lo cual puede explicar la presencia de siniestros por sequía en el territorio de Ejutla de Crespo y por lo tanto los bajos rendimientos. La importancia de la disponibilidad de agua en la etapa de floración y llenado de grano fue demostrada por Inzunza-Ibarra et al., (2018), encontrando que un óptimo desarrollo de la mazorca y por tanto un buen rendimiento se logra con una humedad aprovechable del 60%.

Figura 3. Precipitación mensual en el observatorio del aeropuerto de la ciudad de Oaxaca, Oax. 2019.



Respecto a otras limitantes que influyeron directamente en el rendimiento y producción de maíz, el 37 % de los entrevistados manifestó tener problemas con plagas de gusanos, dentro de los que se consideran al gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) como el principal, seguido de gallina ciega en el suelo (*Phyllophaga spp.*) y el gusano elotero (*Helicoverpa zea*) como el tercero en importancia. El 25 % manifestó tener presencia de otros insectos plagas, tales como Trips y arañas rojas en el cultivo y gorgojos en almacén. En cuanto a enfermedades del cultivo, el 12 % manifestó tener problemas con el denominado “Chauistle”, que es una enfermedad fungosa que ataca a la planta de maíz (Figura 4). El 50 % de los productores manifestó no realizar control

alguno y solamente un 25 % manifestó realizar algún tipo de control, principalmente con fungicidas.

Figura 4. Cultivo de maíz con problemas de “Chauistle” mencionado por los productores en Ejutla de Crespo, Oax.



3.4 COSTO DE PRODUCCIÓN

El costo de producción total promedio estimado fue de \$ 17,310.00/ha, en donde el 39 % se refiere a mano de obra, el 22 % corresponde a la preparación el terreno y el 20% corresponde a los insumos comerciables. En el Cuadro 1, se ejemplifica el costo de producción para una ha de maíz en la zona de estudio considerando los conceptos mínimos que considera el paquete tecnológico del productor. La preparación del terreno es convencional con tractor y considera un barbecho, dos rastreos y una siembra mecánica; La semilla criolla, seleccionada, se le imputó un costo de 20 pesos por kg; al mes de plantada la milpa se le da un deshierbo mecánico para eliminar las malezas: Se considera una aplicación por lo menos de un insecticida para combatir al gusano cogollero que es casi seguro que se presenta; para el caso de fertilizantes se considera la aplicación

de cuatro bultos de Urea y dos de 18-46-00; adicionalmente las labores manuales para aplicación de insecticida, fertilizantes, pizca o cosecha, deshojada, desgranada y encostado. El costo total estimado fue de \$ 17,310.00/ha.

Cuadro 1. Costo de producción de una ha de maíz en Ejutla de Crespo, Oax.

Concepto	Unidad	Cantidad	Precio (\$)	Importe (\$)
Preparación del terreno				
Barbecho	Servicio	1	1500	1500
Rastreo	Servicio	2	800	1600
Siembra	Servicio	1	800	800
Semilla	kg	20	20	400
Deshierbo mecánico	Servicio	1	800	800
Insumos				
Insecticida	l	1	360	360
Urea	kg	200	9	1800
18-46-00	kg	100	12	1200
Costales	pieza	50	2	100
Labores manuales				
Aplicación de fertilizantes	Jornal	3	250	750
Aplicación de agroquímicos	Jornal	2	250	500
Pizca o cosecha	Jornal	10	250	2500
Deshojada	Jornal	8	250	2000
Desgrane	Jornal	2	250	500
Encostado	Jornal	2	250	500
Otras labores				
Desgrane mecánico	Servicio	1	2000	2000
Costo total				17310

3.5 CONSUMO

El consumo de grano promedio por la UPF se estimó en 1514.7 kg/año. La unidad de producción de acuerdo a los datos de rendimiento y producción proporcionados, así como al tamaño de sus predios, produce anualmente 456.98 kg de maíz, lo que equivale al 30.17 % del consumo total, presentando un déficit de grano de 1057.72 kg que equivale al

69.83 % del consumo de la UPF. Este déficit fue cubierto con compras fuera de la unidad de producción, generalmente en las tiendas DICONSA como son conocidas localmente los centros de abasto al consumidor, este grano proviene de los estados de Sinaloa y Jalisco principalmente, donde se producen maíces híbridos y variedades comerciales que no tienen las características del grano nativo. Considerando este escenario actual, se estimó que se requiere un rendimiento mínimo de 3191.97 kg/ha de grano para lograr la autosuficiencia de este alimento básico en el territorio. El rendimiento se puede ir incrementando con el empleo de componentes tecnológicos de manera integral como son: semillas más resistentes a la sequía y más rendidoras, especial atención al manejo del suelo para favorecer mayor retención de humedad y aprovechar al máximo la escasa precipitación en los meses críticos, lo que implica mejorar la estructura del suelo con mejoradores orgánicos; fortalecer y ampliar la superficie de riego para proporcionar riegos de auxilio en las etapas críticas de escasa precipitación (julio y agosto) y ampliar la superficie de riego en el ciclo otoño-invierno.

4 CONCLUSIONES

La productividad del maíz fue baja en el último ciclo de producción en el territorio, debido principalmente a irregularidad en el temporal, ocasionando pérdidas de rendimiento ya que la mayoría de los productores dependen del temporal. La producción de maíz lograda por los integrantes del PRODETER, no fue suficiente para cubrir las necesidades del consumo de grano por la población que integra el territorio, por lo que existe un déficit de grano equivalente a 168 t/año que se tienen que importar de otros estados. La insuficiente producción se debió al bajo rendimiento unitario debido principalmente al problema de sequía que se presentó en la etapa de floración y llenado de grano y a problemas fitosanitarios. En este PRODETER, existe un importante reservorio de recursos genéticos de variedades nativas de maíz, que se encuentran en riesgo de desaparición debido a la introducción de variedades e híbridos comerciales, lo que ha provocado un cruzamiento con los materiales locales degradando las características originales de los materiales nativos.

REFERENCIAS

Boada R. y Espinosa J. (2016). Factores que limitan el potencial de rendimiento del maíz de polinización abierta en campos de pequeños productores de la Sierra de Ecuador. Siembra, 3(1), 067-082.

Comisión Nacional del Agua, Servicio Meteorológico Nacional. (2020). Resúmenes mensuales de temperatura y lluvia. <https://smn.conagua.gob.mx/es/>. [Fecha de consulta: 16-04-2020]

Cuanalo de la C.H. (2003). La unidad de producción familiar En: Desarrollo Social Contra la Pobreza. Red Mexicana de Proyectos de Desarrollo Social A.C. Mérida Yucatán. 170p.

Diario Oficial de la Federación. (2019). Lineamientos de Operación del Programa de Desarrollo Rural de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural para el ejercicio fiscal 2019. Cámara de diputados. 28 de febrero de 2019. Séptima Sección vespertina.

Donnet L., López D., Dominguez C. (2015). Encuesta de evaluación de las necesidades de los productores. En: Rodríguez H.R. y Donnet L. (Edts). Caracterización de la demanda de semillas mejoradas de maíz en tres agro-ambientes de producción de temporal en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. Santo Domingo Barrio bajo, Etla, Oaxaca, México. Libro Técnico No. 20, 190 p.

Leyva-Trinidad, D.A., A. Pérez-Vázquez, I. Bezerra da Costa y R.C. Formighieri Giordani. (2020). El papel de la milpa en la seguridad alimentaria y nutricional en hogares de Ocotlán Texizapan, Veracruz, México. *Polibotánica*, 50, 279-299.

Inzunza-Ibarra M.A., Villa-Castorena M. M., Catalán-Valencia E.A., López-López R., Sifuentes-Ibarra E. (2018). Rendimiento de grano de maíz en déficit hídrico en el suelo en dos etapas de crecimiento. *Fitotécnica Mexicana*, 41(3), 283-290.

Rodríguez H.R., Aragón C.F., Zárate M.W. (2021). Principales características productivas y socioeconómicas de la producción de maíz en unidades de producción familiar en Ejutla, Oaxaca. En Memoria de XI Reunión Nacional de Investigación Agrícola. INIFAP. México. 540p.

Rojas, S.R. (1979). Guía para realizar investigaciones sociales. Facultad de Ciencias Políticas y Sociales. Universidad Autónoma de México. México, D.F. 271 p.

Inzunza-Ibarra M.A., Villa-Castorena M. M., Catalán-Valencia E.A., López-López R., Sifuentes-Ibarra E. (2018). Rendimiento de grano de maíz en déficit hídrico en el suelo en dos etapas de crecimiento. *Fitotécnica Mexicana*, 41(3), 283-290.

CAPÍTULO 5

EFECTO DEL AGROPLASMA EN EL CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO DE LA KIWICHA, *AMARANTHUS CAUDATUS* VAR. OSCAR BLANCO

Data de submissão: 16/01/2023

Data de aceite: 03//2023

Roger Veneros-Terrones

Laboratorio de Fisiología y
Cultivo de Tejidos Vegetales
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo-Perú
<https://orcid.org/0000-0002-9666-528X>

Claudia Díaz-Fernández

Laboratorio de Fisiología y
Cultivo de Tejidos Vegetales
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo-Perú
<https://orcid.org/0000-0001-8523-3919>

Lisi Cerna-Rebaza

Laboratorio de Biología
American School
Trujillo-Perú
<https://orcid.org/0000-0001-7654-3464>

Luis Felipe Gonzales-Llontop

Universidad Nacional
Toribio Rodríguez de Mendoza
Chachapoyas-Perú
<https://orcid.org/0000-0001-7944-2642>

Vito Quilcat-León

Departamento de Química
Universidad Nacional de Trujillo
Trujillo-Perú
<https://orcid.org/0000-0003-1382-3324>

Julio Chico- Ruiz

Laboratorio de Fisiología y
Cultivo de Tejidos Vegetales
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo-Perú
[https://ctivitaec.concytec.gob.pe/
appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.
do?id_investigador=671](https://ctivitaec.concytec.gob.pe/appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.do?id_investigador=671)
<https://orcid.org/0000-0002-7287-321X>

RESUMEN: Se aplicó Agroplasma, como fertilizante ecológico, al cultivo de *Amaranthus caudatus* L. con el objetivo de determinar su efecto en el crecimiento y rendimiento de la var. Oscar Blanco “kiwicha”. Se aplicó por aspersión el abono orgánico líquido, a plantas de 15 días de edad, sembradas por pares, con una altura de planta promedio de 10.4 cm. Se utilizó un diseño e bloques completamente al azar, con tres tratamientos (T1=0%; T2= 2%; T3=4%) y tres repeticiones. Los resultados del crecimiento de la “kiwicha”, revelaron que existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$), respecto al diámetro de tallo, altura de planta, área foliar, número de hojas y ramas por planta, así también se encontraron diferencias significativas para el rendimiento de semillas cosechadas por planta y Kg/ha respecto al control. Para altura de planta (T1=124,28 cm.; T2= 142.50cm., T3= 191,15 cm.), el tratamiento que recibió una dosis del 4 % tuvo mejor efecto en el crecimiento de la planta, al incrementarla en 53,5 % y en área foliar 65,16 %, con respecto

al control, y un mejor rendimiento (103,94 g de semillas por planta y 2227,07 Kg/ha). Se concluye que Agroplasma aumentó significativamente el crecimiento y rendimiento de semillas por planta y por hectárea en *A. caudatus* var. Oscar Blanco “kiwicha”.

PALABRAS CLAVE: Kiwicha. Abono orgánico. *Amaranthus caudatus*.

EFFECT OF AGROPLASM ON THE GROWTH AND YIELD OF *AMARANTHUS CAUDATUS* VAR. OSCAR BLANCO “KIWICHA”

ABSTRACT: Agroplasma was applied, as an ecological fertilizer, to the cultivation of *Amaranthus caudatus* L. in order to determine its effect on the growth and yield of var. Oscar Blanco “kiwicha”. The liquid organic fertilizer was sprayed on plants of 15 days of age, sown in pairs, with an average plant height of 10.4 cm. A completely randomized block design was used, with three treatments (T1 = 0%, T2 = 2%, T3 = 4%) and three repetitions. The results of the growth of the “kiwicha”, revealed that there is significant difference ($p < 0.05$), regarding stem diameter, plant height, leaf area, number of leaves and branches per plant, as well as significant differences were found for the yield of seeds harvested per plant and Kg / ha with respect to the control. For plant height (T1 = 124.28 cm, T2 = 142.50cm, T3 = 191.15 cm.), The treatment that received a dose of 4% had a better effect on the growth of the plant, increasing it in 53.5% and in leaf area 65.16%, with respect to the control, and a better yield (103.94 g of seeds per plant and 2227.07 Kg / ha). It is concluded that Agroplasma significantly increased the growth and yield of seeds per plant per hectare in *A. caudatus* L. var. Oscar Blanco “kiwicha”.

KEYWORDS: Kiwicha. Organic fertilizer. *Amaranthus caudatus*.

1 INTRODUCCIÓN

El amaranto, especie cultivada por más de cinco mil años de antigüedad, constituyó el alimento básico de los incas y aztecas en América; luego de la conquista pasó a ser un cultivo casi olvidado, así como otros cultivos andinos antiguos, pero actualmente ha logrado captar un creciente interés debido a su potencial alimenticio y su calidad nutritiva (Roque, 2019; Arellano *et al.*, 2004; Mujica, 1997).

Existen cuatro especies cultivadas de amaranto para grano, cuyo origen pertenece a América, ellos son: *A. cruentos* de México y Centroamérica, *A. hypochondriacus* de México, *A. caudatus* de la región de los Andes de América del Sur y *A. edulis* de la región Salta de Argentina (Carmona y Orsini, 2010; Mujica *et al.*, 2001). El origen del *A. caudatus* “kiwicha” o “amaranto” se debe buscar en América. Su fase inicial se relaciona con la fase inicial del desarrollo de la agricultura, y culmina con los logros de los habitantes del Tahuantinsuyo y los aztecas (Peralta *et al.* 2012; Guillén, 1990).

Amaranthus caudatus L., conocido como: “kiwicha”, “alegría”, “achita” o “amaranto”; son plantas pertenecientes a la familia Amaranthaceae, las cuales son herbáceas de 1 a 1.5 metros de altura, con hojas largamente pecioladas, oblongo-elípticas u ovals y

la inflorescencia mide hasta 90 cm; en cuanto a color y forma de planta presenta un amplio espectro. Las flores carecen de corola, y toda la inflorescencia aparece en colores rojizos. La inflorescencia puede ser erecta, semirrecta o laxa pudiendo medir hasta 90 cm. de longitud. Las semillas son lenticulares o globosas, blancas, negras y brillantes, con bastante endospermo y, a diferencia de la quinua, carecen de saponinas amargas (García-Parra *et al.*, 2019; INIEA, 2006; Martínez *et al.*, 1979).

La parte verde de algunas especies de Amarantho son consumidas como verdura en regiones húmedas de África, sudoeste de Asia, China, India y Caribe. Los cortes se realizan cuando la planta es joven, lo que origina rebrotes que pueden cortarse nuevamente. Poseen altos contenidos de: proteína 26,7 %, lisina de 4,8 a 6,4 por 100 g de proteína, de 48 a 69% de almidón, fibra 9,9%, cenizas 19,9%, lípidos 3,2% y carbohidratos 39,7%. Se destacan por los tenores de calcio 2034 mg por 100g, hierro 30 mg por 100g y fósforo 311mg por 100g de peso seco; los contenidos de nitratos oscilan desde 0,4% a 0,9% y oxalatos desde 0,6% a 9,1% en peso seco (Pedersen *et al.*, 1991). Según el análisis químico del grano de "kiwicha", la cantidad de proteína varía según su procedencia, 14,5 % en Sella Méndez, 15,43 % en Monte Cercado, 14,84 % en Tarija y 15,97 % en Portillo, del departamento de Tarija-Bolivia (Zamora, 1991). Las semillas de kiwicha tienen el nivel más alto en proteínas, lisina, calcio y fósforo en comparación con el grano de centeno, el arroz y la lecha, esto lo hace un alimento excepcional; las semillas contienen de un 13 a 18% de proteínas y un alto nivel de lisina, aminoácido esencial para la nutrición (INIEA, 2006), y de 12 a 19% de proteínas en *Amaranthus* spp. cultivados en Ecuador (Nieto, 1990). La evaluación del contenido de proteínas y fibra en semillas de 64 muestras de *A. caudatus*, del Centro de Investigación de Cultivos Andinos (CICA) de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) demostró 14.6% de proteínas en semillas deshidratadas, 13.0 % base húmeda y 9,4% de fibra y 13,5% para *A. caudatus*, 15,7 % *A. cruentus* (Bressani, 1989). El valor nutritivo de *A. caudatus* "achita", en base a los resultados del análisis químico realizado en las semillas, arrojó 16% proteína, 7% de grasa; 58 % de hidratos de carbono; 500 mg de P2O5; 247 mg de CaO; 3.4 mg de Fe; 3.2 mg de vitamina C; 0.3 mg de riboflavina y 0.93 mg de tiamina (Paúcar *et al.*, 2017; Barrantes, 1969).

En el Perú, el amaranto se cultiva principalmente en los valles interandinos de la sierra y en pequeñas extensiones, en muchos casos se observa siembras asociadas a maíz o formando bordes de otros cultivos. Recientemente su cultivo ha tomado auge en la costa, donde se siembra bajo condiciones de riego por aspersión y altos niveles de fertilización, pudiendo considerarse como manejo de alta tecnología, utilizada mayormente para la agroindustria y exportación. El potencial de cultivo es bastante halagador, porque está siendo utilizado como cultivo de rotación y de alta producción. Instituciones como

el INIA y las universidades están efectuando investigaciones en aspectos agronómicos, utilización y producción de semilla mejorada (MINAGRI, 2018; Mujica, 1997).

Los rendimientos de las cuatro líneas seleccionadas, GL8, R1011, K254 y AM9 de amaranto, cultivados en el Institute of Plant and Soil Science Research Center de Dinamarca, rindieron cerca de 1.000 kg ha⁻¹ en 1988-1990, mientras que en 1991 el rendimiento fue bajo, con c. 200 kg ha⁻¹. La razón para este rendimiento muy bajo es que los meses mayo y junio fueron fríos y lluviosos, y el período de cosecha resultó húmedo, en contraste con el año 1992, donde hubo rendimientos altos por un verano caliente y seco; el rendimiento normal del amaranto en condiciones del norte de Europa se estima cerca de 1.000 kg ha⁻¹, pero con poca seguridad de un año al otro; también la distancia entre surcos obviamente tiene importancia con respecto al rendimiento de semillas. Una comparación en el año frío de 1991 entre una distancia de 55 cm con otra de 27,5 cm dio como resultado que con la distancia más amplia el rendimiento fue 354±34,7 kg ha⁻¹ mientras que con 1 una distancia de la mitad fue 552±89,9 kg ha⁻¹ (Duncan *et al.*, 2018; Jacobsen *et al.*, 2002).

En México se han encontrado dos variedades de *A. caudatus*, “Froncosa” y “Tulyehuaico”, que producen mayor rendimiento de semillas (628 y 1422 Kg/ha), respectivamente en la alta densidad de población (62,500 plantas/ha), también se han registrado altos valores para la biomasa aérea y porcentaje de reverdecimiento, características agronómicas favorables para un mejor rendimiento de semillas; y con una fertilización moderada de 50 Kg/ha de nitrógeno (Torres *et al.*, 2015). En el Ecuador está siendo investigado por el INIAP y las universidades, así como por la actividad privada, teniendo grandes posibilidades, sobre todo en los valles de la sierra, cuyas altitudes no superan los 2800 msnm y que presentan alta luminosidad y poca precipitación (Monteros, 1994). Los rendimientos comerciales que se obtienen varían de 640-3750 kg/ha. En los ensayos llevados a cabo en Quito en la temporada 1992-93, los rendimientos fluctuaron entre 800 y 2492 kg/ha. (Ayala-Garay *et al.*, 2016; Mujica, 1997).

En el Perú el cultivo de *A. caudatus* es semejante a los realizados en otros países antes mencionados, donde en la fertilización, utiliza en la mayoría de los casos como fuente nitrogenada úrea y en algunas oportunidades, además utiliza cloruro de potasio y superfosfato, pero no utilizan un fertilizante orgánico de última generación, como por ejemplo el Agroplasma, que es un fertilizante líquido, ecológico, con una proporción de aminoácidos libres equivalentes a 27 % en peso de microalgas regeneradoras (*F. coronella*), Nitrógeno 720 mg/L, Fósforo 240 mg/L y Potasio 62,2 mg/L, con pH:7, sin componentes químicos de síntesis y totalmente inocuo para personas. La disolución en general es como mínimo en una proporción de 1 litro de agroplasma en 80 litros de

agua (disolución 1:8), variando dicha proporción en función del tipo de cultivo. El uso regular de agroplasma activa los mecanismos sinérgicos de crecimiento y multiplicación celular de las plantas, aportando nutrientes de absorción directamente asimilables de manera compensada, optimizando los procesos metabólicos vegetales. Activa el transporte de sustancias nutritivas y cataliza el proceso fotosintético, así como logra frutos de calidad óptima, aumentando notablemente las cosechas (Mejía *et al*, 2020; Reetz, 2016; Bio-Plasma, 2006).

El cultivo de quinua y amaranto está tomando un gran auge debido a propiedades alimenticias, gracias a la concentración de proteínas de alta calidad y de aminoácidos esenciales. Sin embargo, no se han llevado a cabo investigaciones sobre la utilización del Agroplasma como fertilizante ecológico en el crecimiento y rendimiento de estos cultivos. Por ello, propuso evaluar el efecto del agroplasma en el crecimiento y rendimiento de la kiwicha, *A. caudatus* L. var. Oscar Blanco.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

El material biológico procedió del Centro Experimental de Cultivos Andinos de la Universidad Santiago Antunez de Mayolo, de la provincia de Huaraz-Departamento de Ancash, estuvo constituido por semillas frescas de *A. caudatus* L. var. Oscar Blanco “kiwicha”.

Se utilizó una parcela distribuida en tres bloques, de 3,6 m x 4,5 m, en dichos bloques se distribuyó en 3 surcos a una distancia de 90 cm. y en cada surco se sembraron 150 semillas en forma directa, después de la germinación de las semillas de kiwicha, que fue de un 90 %, a continuación, se realizó el raleo, cuando las plántulas alcanzaron una altura de 10 cm, dejando 30 plántulas, distribuidas en quince golpes a una distancia de 30 cm. Luego se inició con el experimento, aplicando riegos por gravedad, con agua de caño, cada semana hasta la duración del experimento, así mismo se fertilizó en dos momentos, a los 25 y 50 días después de la siembra, empleando una dosis de 25 K/ha de úrea en las dos aplicaciones y para todos los tratamientos; la aplicación del agroplasma fue 0%, 2% y 4%, por aspersión foliar, cada quince días hasta la maduración de la panoja.

2.1 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO:

- **Longitud de tallo:** Se determinó al azar 10 plantas a las cuales se midió la longitud del tallo, midiendo desde la base hasta la hoja terminal del ápice de tallo, utilizando una wincha metálica de 3 metros de longitud (Castro *et al.*, 1997).

- **Diámetro del tallo:** Se determinó al azar 10 plantas, a las cuales se midió el diámetro en el segundo entrenudo, utilizando un vernier digital marca Starrett 727, con una sensibilidad de 0,01 mm.
- **Número de hojas por planta:** Se determinó al azar 10 plantas, a las cuales se contaron el número de hojas desde la base hasta el ápice del tallo, en la aparición de la panoja.
- **Número de ramas por planta:** Se determinó al azar 10 plantas, a las cuales se contaron el número de ramas por planta, cuando la panoja había madurado, adquiriendo un color pardo oscuro.
- **Peso fresco de hojas y tallo:** Se determinó al azar 10 plantas, cuando las plantas alcanzaron la madurez de la panoja, de las cuales se obtuvieron todas las hojas y los tallos, luego fueron pesados en forma independiente los tallos y hojas, en una balanza de brazo.
- **Peso seco de hojas y tallos:** Se determinó al azar 10 plantas, cuando las plantas alcanzaron la madurez de la panoja, de las cuales se obtuvieron todas las hojas y los tallos, luego fueron pesados en forma independiente los tallos y hojas; luego fueron colocados en una estufa a 103 °C por 72 horas, posteriormente se pesaron las hojas y tallos deshidratado, en una balanza de brazo.

2.2 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO:

- **Peso de semillas frescas:** Se determinó al azar 10 plantas, cuando las plantas alcanzaron la madurez de la panoja en un 90 % aproximadamente, las plantas fueron cortadas y dejadas a exposición del sol por un lapso de 5 días, luego se obtuvieron las semillas por estrujamiento manual y posteriormente tamizado, para separar las semillas libre de restos de panoja; finalmente se procedió a pesar en una balanza de brazo.
- **Longitud de panoja:** Se determinó al azar 10 plantas, cuando las plantas alcanzaron la madurez de la panoja en un 90 % aproximadamente, a las cuales se les midió la longitud de la panoja con una wincha metálica de 3 metros.
- **Determinación de clorofilas a, b y total:** Las hojas fueron cortadas en pequeñas secciones y se pesaron 5 gramos, luego fueron trituradas en un mortero con etanol absoluto, posteriormente filtrado con papel Whatman n° 1, el filtrado se diluyó al décimo y luego se hizo la lectura en el espectrofotómetro Milton Roy 21, a 649 y 665 nm de longitud de onda, con estos valores se determinó las concentraciones de clorofilas (Rivera *et al.*, 2005).

- Determinación de proteínas totales:** Para el procesamiento de las muestras y la extracción de proteínas solubles, se pesaron 15 gramos de semillas secas, luego en un vaso precipitado conteniendo 200 ml de agua potable se sometieron a cocción por 30 minutos. Se dejó enfriar durante 15 minutos, luego se decantó el agua de ebullición. El sedimento constituido por las semillas cocidas, se resuspendió en 200 ml de NaHCO_3 0,4 M, pH 9,0, se trituró durante 3 a 5 minutos y posteriormente se sometió a centrifugación en dos fases: Fase 1: en esta fase se centrifugó a 4 000 rpm por 30 minutos, a temperatura ambiente, para separar las partículas de mayor tamaño y Fase 2: en esta fase se centrifugó a 5500 rpm, como en la fase anterior, para obtener un sobrenadante. La cantidad de proteínas se determinó con las lecturas en absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, leídos en el espectrónico 20 Milton Roy, y luego se procedió a la determinación de las proteínas totales, por el método calorimétrico de Biuret, (Prot.- 2), según laboratorios Wiener (2000).

2.3 DETERMINACIÓN DEL ÁREA FOLIAR

Se utilizó el método de las siluetas, que consiste en calcar las siluetas de todas las hojas de la planta papel bond de 80 gramos, luego recorta el papel y se pesa en una balanza analítica, luego se compara con el peso de 1 cm² del mismo papel y por regla de tres simple se determina en área foliar de la planta (De Sousa y Rojas, 1992).

2.4 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El Diseño utilizado fue en bloques completamente al azar (DBCA) con tres repeticiones.

VARIETADES	AGROPLASMA	TRATAMIENTOS
V1	0 %	T1
	2%	T2
	4%	T3

V1: *Amaranthus caudatus* L. var. Oscar blanco "kiwicha".

BLOQUE I	T1	T2	T3
BLOQUE II	T1	T3	T2
BLOQUE III	T3	T1	T2

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron organizados en tablas para la evaluación estadística del efecto del Agroplasma, en el crecimiento y rendimiento, en los diferentes tratamientos según diseño experimental, para ello se utilizó el análisis de varianza (ANAVA), con una probabilidad del 0.05 y la prueba de comparación de promedios de Duncan (Steel y Torrie, 1993; Spiegel, 1982).

3 RESULTADOS

Se encontró que la mejor altura de planta (191,15 cm) y la mayor área foliar (475,59 cm²), correspondieron al tratamiento con Agroplasma al 4% (Tabla 1). Aplicando ANAVA se encontró diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0.05$. Asimismo, que los pesos frescos y secos de hojas y tallos, correspondiendo 630,31 g para peso fresco de tallos y 387,68 g para hojas, correspondieron al tratamiento tres (Tabla 2). Los pesos secos fueron procesados estadísticamente encontrando diferencias con $p < 0.05$

Respecto a las clorofilas se encontró a una mayor concentración de clorofila b (8,79 µg/ml), en el tratamiento que recibió agroplasma al 4 %, así como la mayor cantidad de clorofila total (11,73 µg/ml), según como se muestra en la Tabla 3. El mayor rendimiento en el tratamiento con Agroplasma al 4 %, obteniéndose 103,94 g de semillas por planta y 2227,07 Kg/ha, respecto a 74,23g y 1590,64 Kg/ha del control respectivamente (Tabla 4).

Respecto a la calidad de las semillas, los resultados muestran que se han obtenido una concentración de proteínas totales de 15,69 g % para el tratamiento con Agroplasma al 4%, superando al control que se ha obtenido 12,40 g % (Tabla 5).

Tabla 1. Promedios del diámetro de tallo, altura de planta, área foliar, número de hojas y rama por planta de *A. caudatus* L var. Oscar Blanco "kiwicha", fertilizados con agroplasma.

Tratamientos	DT (cm)		AP (cm)		AF (cm ²)		NH (unidad)		NR (unidad)	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
T1	3.92a	± 0.03	124.28a	± 1.08	287.96a	±	33.10	±	11.03a	±
						1.18		0.27		0.46
T2	5.05b	± 0.02	142.50b	± 0,79	363.19b	±	41.68	±	14.6b	±
						1.35		0.29		0.2
T3	5.94c	± 0.02	191.15c	± 2.70	475.59c	±	437.00	±	20.7c	±
						0.65		0.26		0.36

DT: Diámetro de tallo, AP: Altura de planta, AF: Área folia, NH: N^o de hojas por planta, NR: N^o de ramas por planta, X: Promedios por tratamiento, DE: Desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, aplicando ANAVA, con $p < 0.05$.

Tabla 2. Promedios de pesos frescos y secos de tallos y hojas de *A. caudatus* L var. Oscar Blanco “kiwicha”, por bloques y tratamientos, con agroplasma.

Tratamientos	Pft (g)		Pst (g)		Pfh (g)		Psh (g)	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
T1	70.26	± 0.41	16.03a	± 0.10	87.83	± 0.36	14.85a	± 0.03
T2	155.79	± 0.31	30.42b	± 0.04	196.11	± 0.74	25.72b	± 0.03
T3	630.31	± 0.28	101.21c	± 0.11	387.68	± 0.51	50.20c	± 0.12

Pft: Peso fresco de tallo, Pst: Peso seco de tallo, Pfh: Peso fresco de hojas, Psh: Peso seco de hojas, X: Promedios por tratamiento DE: Desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, aplicando ANAVA, con $p < 0.05$.

Tabla 3. Promedios de clorofilas a, b y total en hojas de *A. caudatus* L. var. Oscar Bblanco “kiwicha”, por tratamientos, fertilizados con agroplasma.

Tratamiento	Cla (Ug/ml)		Clb (Ug/ml)		Clt (Ug/ml)	
	X	DE	X	DE	X	DE
T1	1.78	±0.05	6.67	±0.05	8.4	±0.05
T2	2.44	±0.04	7.33	±0.01	9.64	±0.06
T3	2.98	±0.01	8.79	±0.01	11.73	±0.06

Cla: Clorofila a, Clb: Clorofila b, Clt: Clorofila total, X: Promedios por tratamiento DE: Desviación estándar.

Tabla 4. Promedios de longitud de panoja, peso de semillas por planta, y el rendimiento por hectárea de semilla de *A. caudatus* L. var. Oscar Blanco “kiwicha”, fertilizados con agroplasma.

Tratamientos	Lp (cm)		Psp (g)		Rendimiento (Kg/ha)	
	X	DE	X	DE	X	DE
T1	48.28a	±0.07	74.23a	±0.30	1590.64	±6.452
T2	69.72b	±0.34	82.62b	±0.69	1770.35	±14.761
T3	98.14c	±1.39	103.94c	±0.04	2227.07	±0.571

Lp: Longitud de panoja, Psp: Peso de semillas por planta, X: Promedios por tratamiento, DE: Desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, aplicando ANAVA, con $p < 0.05$.

Tabla 5. Promedios de proteínas totales en 100 gramos de semillas de *Amaranthus caudatus* L. var. Oscar Blanco "kiwicha", por bloques y tratamientos, fertilizados con agroplasma.

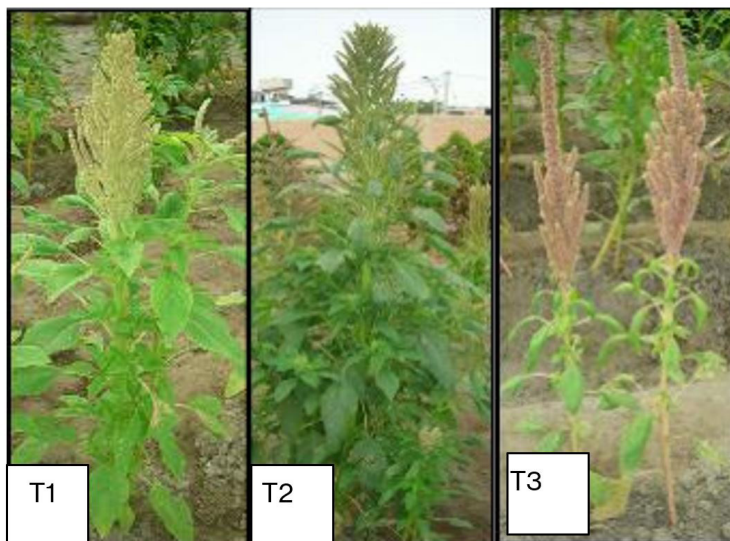
Tratamiento	B1 (Pt g %)	BII (Pt g %)	BII (Pt g %)	Promedio (Pt g %)	DE
T1	12.45	12.27	12.49	12.40	±0.117
T2	13.42	13.85	13.50	13.59	±0.229
T3	15.44	15.92	15.72	15.69	±0.241

DE: Desviación estándar Pt: Proteínas totales g; Gramos.

Fig. 1. Tamaño de las panojas de *A. caudatus* L. var. Oscar Blanco "kiwicha" de los diferentes tratamientos con agroplasma.



Fig. 2. Tamaño de las panojas de *A. caudatus* L. var. Oscar Blanco "kiwicha" de los diferentes tratamientos con agroplasma.



4 DISCUSIÓN

Las diferencias significativas según el ANAVA, respecto al crecimiento de *A. caudatus* var. Oscar blanco “kiwicha”, en los parámetros de: diámetro de tallo, altura de planta, área foliar, número de hojas y ramas por planta (Tabla 1), se obtuvo un incremento del 53,5% en altura de planta y un 51,5% en el diámetro de tallo, del tratamiento con Agroplasma al 4%, respecto al control, esto se debe probablemente a que agroplasma ha influenciado mejor, porque los componentes de este fertilizante orgánico, entre ellos los aminoácidos y el nitrógeno, dentro de la planta se movilizan rápidamente hasta los meristemas apicales y laterales, y permiten una mayor división celular y con ello un mejor crecimiento en altura de las plantas; el área foliar se incrementó en 65,2%, probablemente por efecto del macronutriente nitrógeno, contenido en alta proporción en este fertilizante, el cual habría permitido en el crecimiento de parte laminar de las hojas, cantidades muy favorables respecto al control según Mejía-Valvas *et al.* (2022).

También se encontraron diferencias significativas según el ANAVA, para los pesos frescos y secos de tallos y hojas (Tabla 2), mostrando los pesos frescos (Pft=630,31 g y Pfh=387,68g) y secos (101,21 g y 50,20 g) más altos, de las plantas de kiwicha que recibieron agroplasma al 4%, esto probablemente se deba a la influencia de los componentes nutricionales que contiene el fertilizante, tales como nitrógeno, fósforo, potasio entre otros, los cuales han permitido que las plantas aumenten su anabolismo, como la fotosíntesis, síntesis de almidón, proteínas y otras biomoléculas, las cuales conllevan a incrementar su masa y por ende su peso seco; así mismo estas plantas tienden a incrementar la absorción y retención de agua e incrementar su peso fresco, esto se confirma con el trabajo de Chamorro (2019).

Para las clorofilas (a y b), según el ANAVA se encontraron diferencias significativas, siendo el más alto para la clorofila b del tratamiento con Agroplasma al 4% (8,79 Ug/ml), el cual representa un incremento del 75,29 % respecto a su control, esto nos indica que probablemente agroplasma influye en la síntesis de clorofila b, más que clorofila a, con lo puede permitir que absorba una mayor cantidad de energía luminosa y posteriormente transformarla en energía química en forma de Adenosin Trifosfato (ATP), útil en la captación del Anhídrido Carbónico (CO₂) para el ciclo de Calvin del proceso fotosintético.

Las diferencias significativas según el ANAVA respecto al rendimiento de *A. caudatus* var. Oscar blanco “kiwicha”, en los parámetros de: longitud de panoja, peso de semillas por planta y kilogramos por hectárea, indican que Agroplasma al 4 %, permitiendo obtener 2227,07 kg/ha de semillas de kiwicha y 98,14 g de semillas de amaranto por planta (Tabla 4), representando un incremento del 40,02 % y 40,02 % respectivamente; en el caso del rendimiento por hectárea es superior a 1000 Kg/ha de semillas de kiwicha obtenidos

en el Institute of Plant and Soil Science Research Center of Dinamarca (Jacobsen *et al.*, 2002), pero dentro del rango de los resultados de 1000 – 2500 Kg/ha por el INIA-Perú, para los periodos 1992-1993 (Mujica *et al.*, 1999) y 800-2492 Kg/ha, reportados para Quito en los periodos 1992 y 1993 (Mujica y Berti, 1997), pero superiores a 628-1422 Kg/ha, que recibieron como fertilizante solamente Nitrógeno en una dosis de 50 Kg/ha para una población de 62 500 plantas/ha (Torres *et al.*, 2016). Este incremento del rendimiento también tendría una relación directa con la mayor longitud de la inflorescencia (98,14 cm), permitiendo un incremento del 103,27 % respecto al control, así mismo es superior al tamaño de la inflorescencia (90 cm) reportado por el Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria⁶. este dato corrobora que Agroplasma influye en el tamaño de la inflorescencia o panoja, permitiendo un mayor número de flores, que finalmente se convierten en semillas y de esta manera favorece un mejor rendimiento de kiwicha.

Para la calidad de las semillas de kiwicha, respecto a proteínas totales, según el ANAVA se encontraron diferencias significativas, siendo el porcentaje más alto (15,7%) para el tratamiento con Agroplasma al 4 % (Tabla 5 y figura 5), representando un incremento del 26,5% respecto a su control, así mismo es superior a 14,6 g % obtenido por el Centro de investigación de Cultivos Andinos, en la misma variedad de kiwicha (Lizarraga, 1981), pero menor al rango de 13-18g% en *A. caudatus*, encontrado por el Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA, 2006) semejante a 15 g % en kiwicha (Bejosano, 1999); pero menor a 16,1g % en *A. caudatus* L. “kiwicha” (Cárdenas, 1969).

5 CONCLUSIONES

Con base a los resultados de la presente investigación experimental sobre el crecimiento y rendimiento de *A. caudatus* var. Oscar blanco, podemos afirmar lo siguiente:

El Agroplasma si tuvo una influencia en el crecimiento y rendimiento de kiwicha y ello se manifiesta específicamente en el crecimiento cuando se utiliza agroplasma al 4%, de igual manera a la misma concentración elevó en el rendimiento de semillas por planta y por hectárea y en la cantidad de proteínas totales en las semillas de kiwicha.

Se demuestra que hay alternativas amigables, no contaminantes, que se pueden aplicar a las plantas para mejorar su crecimiento y desarrollo.

6 AGRADECIMIENTO

Al personal técnico de la sección de botánica que apoyó brindando sus ambientes para realizar la presente experiencia.

Los autores expresan que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arellano M, Albarracín G, Mucciarelli S. (2004). Estudio comparativo de hojas de *Beta vulgaris* con *Amaranthus dubius* Mart ex thell. *Phyton*, 53:193-197.
- Ayala-Garay, A.; Espitia-Rangel, E.; Rivas-Valencia, P.; Martínez-Trejo, G.; Almaguer-Vargas, G. (2016). Análisis de la cadena del valor de amaranto en México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 1 (13): 87.
- Barrantes P. (1969). *Amaranthus caudatus*: Determinación analítica en la "achita". Tesis Ing°. Químico. Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo. Perú.
- Bejosano F. (1999). Protein quality evaluation of *Amaranthus* wholemeal flours and concentrates. *J Sci Food & Agricul.* 76(1):100-106.
- Bio-Plasma (2006). Fertilizante Ecológico. Lima-Perú. 2006.
- Bressani R. (1989). The proteins of grain amaranth. *Foods Reviews International*.; 51:1338.
- Cárdenas, M. (1969). Manual de plantas económicas de Bolivia. Cochabamba-Bolivia: Edit lcthus.
- Carmona, W.; Orsini, G. (2010). Sinopsis del subgénero *Amaranthus* (*Amaranthus*, *Amaranthaceae*) en Venezuela *Acta Botánica Venezuelica*, 33(2): 329-356.
- Castro P, Villar P, Pérez C. (1997). Leaf morphology and leaf chemical composition in three *Quercus* (*Fagaceae*) species along a precipitation gradient in NE Spain. *Trees. Structure and Function.* 11: 127-13.
- Chamorro, F. (2019). Evaluación del amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) en dos sistemas de labranza con cuatro niveles de fertilización nitrogenada. Tesis Título Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Ecuador.
- De Sousa N, Rojas E. (1992). Estimación del área foliar de *Heliconia bihai* (L.) L. y *H. Latispatha* benth. *Bioagro* 4(4):106-114.
- Duncan, E.G.; O'Sullivan, C.A.; Roper, M.M.; Biggs, J.S.; Peoples, M.B. (2018). Influence of co-application of nitrogen with phosphorus, potassium and sulphur on the apparent efficiency of nitrogen fertiliser use, grain yield and protein content of wheat: *Field Crops Research*, 226: 56-65.
- García-Parra, M.A.; De la Cruz-Cruz, H.A.; Plazas-Leguizamón, N.Z. (2019). Ciclo de vida y curvas en S aplicadas al cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp.)", *Tecnológicas*, 22 (46): 61-76.
- Guillen F. (1990). Caracterización y análisis de crecimiento de dos ecotipos de coime (*Amaranthus caudatus*) en condiciones de cultivo de campo. Tesis Ing°. Agrónomo. Universidad Autónoma. Tarija-Bolivia.
- Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA) (2006). Kiwicha con cualidades óptimas para agroindustria y exportación. Nota de prensa 033-INEA-OII-PW.
- Jacobsen S, Iteno K, Mujica A. (2002) Amaranto como un cultivo nuevo en el norte de Europa. *Agronomía Tropical*.; 52(1):109-119.
- Lizárraga V. (1981). Evaluación del contenido de proteínas y fibras de 64 muestras de la Colección *Amaranthus caudatus* "Kiwicha". Tesis Ing°. Agrónomo. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco. Perú.

- Martínez C, Espitia E, Caballero J. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
- Mejía, R.L.; Gómez L.; Pinedo, R.; Mendoza, H.; Pajuelo, C.E. (2020). Niveles de fertilización inorgánica en tres variedades de kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) en Ancash, Perú. *IDESIA*, 38 (1): 75-84.
- Mejía-Valvas R., Mendoza-Vilcahuamán H., Gómez-Pando L., Pinedo-Taco R. (2022). Comportamiento agronómico y calidad de kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) en función del cultivar y la dosis de fertilización. *IDESIA* 40(1): 87-94.
- MINAGRI. (2018). Manejo Agronómico, Prácticas de Conservación de Suelos, Producción, Comercialización y Perspectivas de granos andinos. Ministerio de Agricultura y Riego. Dirección General de Políticas Agrarias-DGPA. Lima Perú. 86 p.
- Mujica A, Berti M. (1997). El cultivo del Amaranto (*Amaranthus* spp.): Producción. Mejoramiento Genético y Utilización. FAO. Red de Cooperación Técnica en Producción de Cultivos Alimenticios. Roma, Italia.
- Monteros JC. (1994). INIAP-Alegría. Primera variedad mejorada de amaranto para la sierra ecuatoriana. INIAP. Boletín Divulgativo N° 245. Ecuador.
- Mujica A, Jacobsen E, Chirinos L. (2001). Experiencias en el manejo de los recursos genéticos de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), amaranto (*Amaranthus caudatus* L. y cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en Perú. **In:** Compendio de Exposiciones de Reunión para diseñar el componente regional del proyecto IPGRI-IFAD, La Paz-Bolivia.
- Mujica A, Izquierdo J, Jacobsen S. (1999) Prueba americana de cultivares de amaranto (*Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus hypocondriacus* L. y *Amaranthus cruento* L.) **En:** Reunión Técnica y Taller de Formulación de Proyecto Regional sobre Producción y Nutrición Humana en base a Cultivos Andinos. Perú.
- Nieto C. (1990). El cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp) una alternativa agronómica para Ecuador. INIAP, EE. Santa Catalina. Publicación Miscelánea N° 52. Quito, Ecuador.
- Paucar, L.; Peñas, E.; Dueñas, M.; Frías, J.; Martínez Villaluenga, C. (2017). Optimizing germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 76: 245-252.
- Pedersen B, Kalinowski L, Eggum B. (1991). The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) I. Protein and minerals of raw processed grain. *Plant Food for Human Nutrition*, 36:309-324.
- Peralta, E.; Mazón, Á.; Murillo, M.; Rivera, D.; Rodríguez, L.; Lomas, C.; Monar. (2012). Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco. Cultivos, cultivares y costos de producción. Tercera edición. INIAP. Quito, Ecuador.
- Reetz, H. (2016). *Fertilizers and their Efficient Use*. First edition, IFA, Paris, France. 109 p.
- Rivera C., Zapata A, Pinilla J.(2005) Comparación de la estimación de clorofila a mediante los métodos espectrofotométricos y fluorométrico. *10(2): 95*.
- Roque, O.J. (2019). Requerimiento térmico de las fases fenológicas de dos cultivares de amaranto (*Amaranthus caudatus* L): precoz y tardía en Ayacucho. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 7 (1): 18-31.

Spiegel M. (1982). Teoría y Problemas de Probabilidades y Estadísticas. Serie dcompendios Shawm Edit. Mc Graw Hill. México.

Steel R, Torrie J. (1993). Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da Edición. Editorial. McGraw-Hill S.A. México.

Torres G, Trinidad A, Reyna T. (2006). Respuesta de genotipos de Amaranto a densidades de poblaciones. Revista Fitotecnia Mexicana 2006; 9(04):307-312.

Wiener G. (2000). Laboratorios: Método calorimétrico para la determinación de hierro sérico, proteínas totales y hemoglobina. Rosario-Argentina. 2000.

Zamora J. (1991). Industrialización del amaranto. Tesis Ing°. Químico. Universidad Autónoma Juan Misael Saracho. Tarija-Bolivia.

CAPÍTULO 6

ESTUDIO DE INFECCIÓN DE *CALIGUS ROGERCRESSEYI* EN SALMÓNIDOS DE CULTIVO POR MEDIO DE TÉCNICAS DE MACHINE LEARNING

Data de submissão: 10/12/2022

Data de aceite: 03/01/2023

Patricio R. de los Ríos-Escalante¹

Departamento de Ciencias
Biológicas y Químicas
Facultad de Recursos Naturales
Universidad Católica de Temuco
Casilla 15-D, Temuco, Chile
Núcleo de Estudios
Ambientales UC Temuco
Casilla 15-D, Temuco, Chile
<https://orcid.org/0000-0001-5056-7003>

Juan Barile

Departamento de
Agropecuarias y Acuícolas
Facultad de Recursos Naturales
Universidad Católica de Temuco
Casilla 15-D, Temuco, Chile
<https://orcid.org/0000-0002-2121-3799>

Eriko Carreño

Departamento de
Agropecuarias y Acuícolas
Facultad de Recursos Naturales
Universidad Católica de Temuco
Casilla 15-D, Temuco, Chile
<https://orcid.org/0000-0003-0871-4772>

RESUMEN: El copépodo *Caligus rogercresseyi* es un ectoparásito que afecta a los cultivos de salmones, generando efectos negativos en la productividad de la industria, por lo que se ha tratado de estudiar cómo controlar la tasa de infección de este en especies de salmónidos, pero no se ha podido controlar del todo esta plaga. El presente estudio consistió en una revisión de datos obtenidos de infección de *C. rogercresseyi* de centros de cultivo de salmónidos de la región de Aysén. A estos datos se les aplicó por medio de técnicas de machine learning para estudiar la presencia de patrones en las tasas de infección de *C. rogercresseyi* en salmónidos de cultivo usando el programa Python y librerías especializadas (Numpy, Matplotlib, Pandas, Seaborn y Statsmodels). Los resultados al aplicar modelo K-Means indicaron una relación directa en la tasa de infección total con la salinidad, e inversa con latitud y la temperatura, mientras que las tasas de infección más altas fueron en *Salmo salar*, en comparación a *Oncorhynchus kisutch* y *O. mykiss*. Los modelos de regresión múltiple muestran relación inversa significativa entre total de infectados de *Caligus* (hembras, machos, adultos y juveniles), con latitud y temperatura y directa significativa con longitud y salinidad para el total de datos y para *S. salar*. Mientras que para *O. kisutch* se encontró que el número de *Caligus* adultos y hembras tuvo relación inversa significativa con temperatura, mientras que con *Caligus* juveniles y adultos la relación fue inversa y significativa con longitud y temperatura. Finalmente, para *O. mykiss* el

¹ Author for correspondence, Email: prios@uct.cl

número de hembras de *Caligus* tuvo una relación directa con la longitud e inversa con la temperatura, mientras que para machos de *Caligus* hubo una relación directa con latitud y longitud, finalmente para adultos de *Caligus* hubo solo una relación directa con la longitud.

PALABRAS CLAVE: *Caligus rogercresseyi*. Machine learning. Salmonidos. Acuicultura.

ESTUDO DA INFECÇÃO DE CALIGUS ROGERCRESSEYI EM SALMONÍDEOS DE CRIAÇÃO USANDO TÉCNICAS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA

RESUMO: O copépodo *Caligus rogercresseyi* é um ectoparasita que afeta as fazendas de salmão, gerando efeitos negativos na produtividade da indústria, motivo pelo qual se tentou estudar como controlar sua taxa de infecção em espécies de salmonídeos, mas não conseguiu controlar totalmente essa praga. Este estudo consistiu em uma revisão dos dados obtidos da infecção por *C. rogercresseyi* em fazendas de salmonídeos na região de Aysén. Técnicas de aprendizado de máquina foram aplicadas a esses dados para estudar a presença de padrões nas taxas de infecção de *C. rogercresseyi* em salmonídeos de criação usando o programa Python e bibliotecas especializadas (Numpy, Matplotlib, Pandas, Seaborn e Statsmodels). Os resultados da aplicação do modelo K-Means indicaram uma relação direta da taxa de infecção total com a salinidade, e uma relação inversa com a latitude e temperatura, enquanto as maiores taxas de infecção foram em *Salmo salar*, em comparação com *Oncorhynchus kisutch* e *O. mykiss*. Os modelos de regressão múltipla mostram uma relação inversa significativa entre o número total de *Caligus* infectados (fêmeas, machos, adultos e juvenis), com latitude e temperatura e uma relação direta significativa com longitude e salinidade para os dados totais e para *S. salar*. Enquanto para *O. kisutch* verificou-se que o número de *Caligus* adultos e fêmeas teve uma relação inversa significativa com a temperatura, enquanto que com *Caligus* juvenil e adulto a relação foi inversa e significativa com comprimento e temperatura. Finalmente, para *O. mykiss* o número de fêmeas *Caligus* teve uma relação direta com a longitude e inversamente com a temperatura, enquanto para os machos *Caligus* houve uma relação direta com a latitude e longitude, finalmente para os adultos *Caligus* houve apenas uma relação direta com o comprimento.

PALAVRAS-CHAVE: *Caligus rogercresseyi*. Aprendizado de máquina. Salmonídeos. Acuicultura.

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de salmones es una actividad económica importante en la Patagonia Chilena, especialmente en las regiones de los Lagos, Aysén y Magallanes donde están los centros de engorda de adultos en zonas de mar interior, las especies más cultivadas de salmonídeos son principalmente el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en menor grado salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Soto et al., 2019).

Un problema que afecta a estos cultivos es la presencia del piojo de mar *Caligus rogercresseyi*, Boxshall & Bravo, 2000 (conocido como “*Caligus*”) el cual es un copépodo ectoparásito que afecta a la piel de los peces, generando mermas en la producción

(Boxshall & Bravo, 2000; Bravo et al., 2009; 2013; 2014; De los Rios, 2019). Lo que ha generado una necesidad de saber controlar el avance de este parásito en los cultivos, esta plaga, considerando su importancia en los cultivos (González et al., 2016), ha generado que el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA-Chile), haga fiscalización y maneje grandes volúmenes de datos de la presencia de *Caligus* en cultivos de salmones.

Considerando el volumen de datos, estos se podrían tratar por medio de técnicas de “machine learning”, en que consiste en estudiar los datos de manera multidisciplinaria para obtener patrones en grandes conjuntos de datos, lo cual permite encontrar patrones en los conjuntos de datos, lo que implica el manejo de conocimientos de estadística y programación (VanderPlas, 2017). El objetivo del presente trabajo es analizar por medio de técnicas de Machine Learning, un conjunto de datos de infección de *Caligus* en especies de salmones de cultivo de la región de Aysén (43-46° S), en la Patagonia chilena, obtenidos desde el SERNAPESCA-Chile.

2 MATERIALES Y METODOS

Se consiguieron datos de infección de *Caligus rogercresseyi* (juveniles, hembras ovígeras, machos y total de adultos para cultivos de salmónidos en la región de Aysén (42-46° S) entre los años 2018 y 2019, las especies incluidas fueron salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en menor grado salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha arcoíris (*O. mykiss*), y se consideraron datos de temperatura, salinidad, latitud y longitud obtenidos del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA-Chile).

Los datos fueron importados y procesados mediante técnicas de machine learning usando el programa de uso libre Python (Van Rossum & Drake, 1995), más las librerías numpy (Harris et al., 2020), pandas (McKinney, 2010), matplotlib (Hunter, 2007), seaborn (Waskom, 2021) y statsmodel (Seabold & Perktold, 2010). El primer análisis realizado fue el método de K-Means con el fin de encontrar posibles agrupaciones en el conjunto de datos (VanderPlas, 2017). El segundo análisis aplicado fue de regresión múltiple (Halswanger, 2016), en que se consideraron como variables independientes latitud, longitud, temperatura, salinidad para el total de datos, y separados por especies, y como variables dependientes el número de juveniles, hembras ovígeras, machos y total de adultos de *Caligus* por pez.

3 RESULTADOS

Los resultados del modelo K means, revelaron que existiría una disminución de la cantidad de individuos infectados a mayor latitud y mayor longitud, esto es considerando las tres especies, y los cuatro estadios de *Caligus* (Figuras 1 y 2).

Mientras que los datos de salinidad indican un incremento de la tasa de infección hasta 35 g/l de salinidad cayendo bruscamente, mientras que en temperatura se observó alta tasa de infección entre los 10 y 12.5°C, esto es considerando las tres especies, y los cuatro estadíos de *Caligus* (Figuras 1 y 2).

Los resultados del modelo de regresión múltiple para el total de salmónidos de cultivo y salmón del Atlántico encontró modelos muy robustos, existiendo relaciones inversas altamente significativas con latitud y temperatura, y relaciones directas altamente significativas con longitud y salinidad (Tabla 1). Una situación totalmente diferente sucedió con el salmón del Pacífico, el modelo no fue robusto para la tasa de infección con machos, mientras que para la tasa de infección con el total de *Caligus* aunque el modelo fue robusto, los efectos de las variables consideradas no fueron significativos (Tabla 2). Mientras que para hembras de *Caligus*, el modelo aunque fue robusto, solo tuvo una relación significativa con longitud, y finalmente para juveniles de *Caligus*, el modelo fue robusto pero solo con relación directa con longitud y salinidad (Tabla 2). Finalmente, para trucha arcoiris, los modelos de regresión múltiple fueron significativos, existiendo solo relación directa significativa con longitud para individuos adultos totales y machos de *Caligus* (Tabla 2). Para los datos de hembras y juveniles los modelos de regresión múltiple fueron significativos, y mostraron relación directa significativa con latitud y longitud (Tabla 2).

Figura 1. Resultados del modelo K-means para presencia de adultos y machos de *C. rogercresseyi* para las especies de salmónidos de cultivo en la región de Aysén (*S. salar*, *O. kitsutch* y *O. mykiss*) en función de la localización geográfica de los sitios de cultivo (latitud y longitud), salinidad y temperatura superficiales.

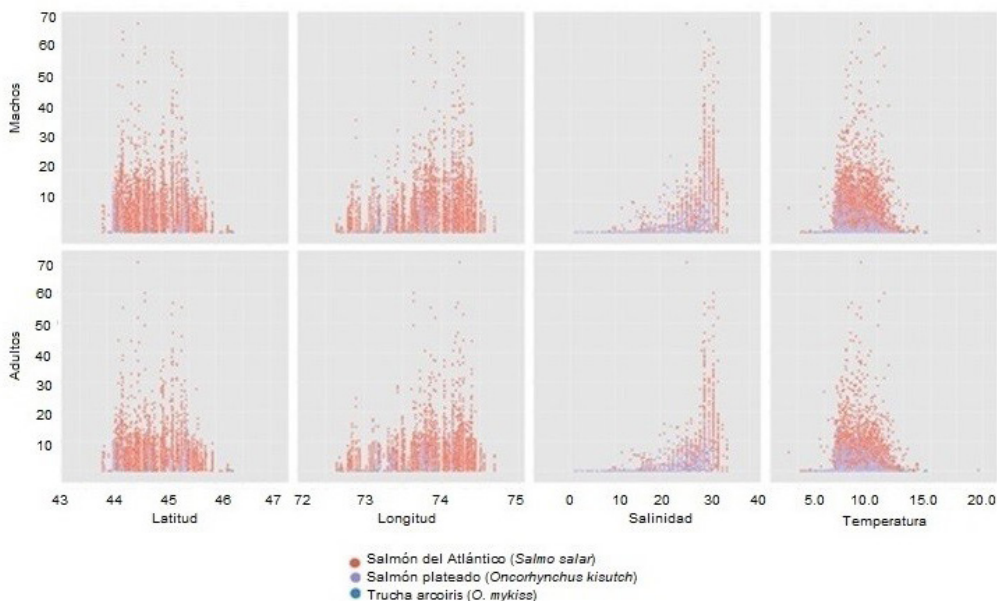


Figura 2. Resultados del modelo K-means para presencia de juveniles y hembras de *C. rogercresseyi* para las especies de salmónidos de cultivo en la región de Aysén (*S. salar*, *O. kitsutch* y *O. mykiss*) en función de la localización geográfica de los sitios de cultivo (latitud y longitud), salinidad y temperatura superficiales.

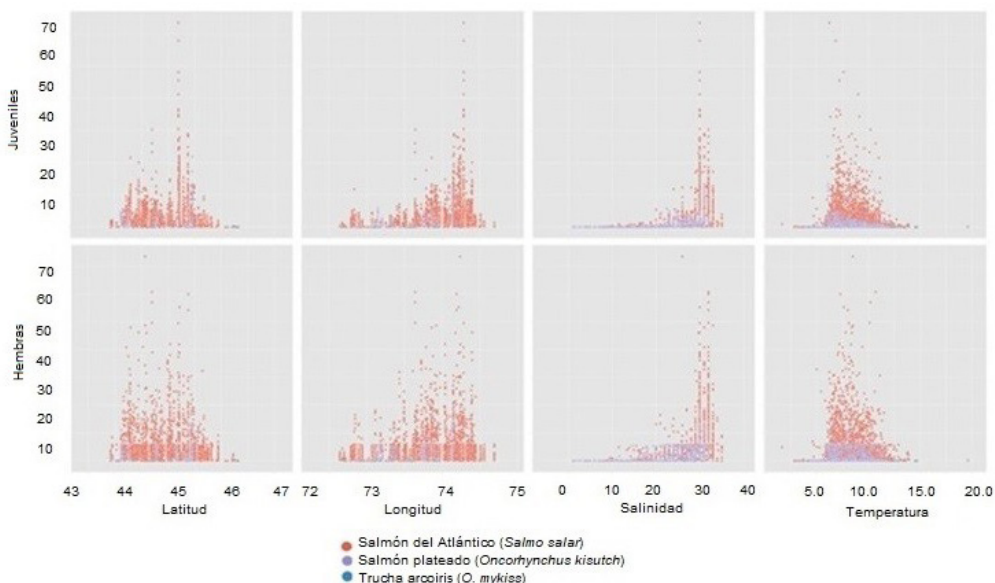


Tabla 1. Resultado del análisis de regresión múltiple para presencia de individuos de *C. rogercresseyi* (total adultos, machos, hembras y juveniles) para total de salmónidos y salmón del Atlántico.

Factor	Total salmónidos-Adultos Caligus			Total Salmon del Atlantico - Adultos Caligus		
	Coefficiente	T observado	P	Coefficiente	T observado	P
Latitud	-1.144	-9.192	< 0.001*	-0.3463	-5.618	< 0.001*
Longitud	0.722	8.962	< 0.001*	0.7717	9.522	< 0.001*
Temperatura	-0.370	-9.415	< 0.001*	-0.1408	-7.146	< 0.001*
Salinidad	0.214	14.367	< 0.001*	0.0757	8.851	< 0.001*
R ²	0.414	F observado	1294.000	0.085	F observado	153.900
R ² ajustado	0.414	P	< 0.001*	0.084	P	< 0.001*
Factor	Total salmónidos-Machos Caligus			Total Salmon del Atlantico - Machos Caligus		
	Coefficiente	T observado	P	Coefficiente	T observado	P
Latitud	0.770	10.479	< 0.001*	-0.748	-9.431	< 0.001*
Longitud	-0.487	-10.233	< 0.001*	1.572	15.079	< 0.001*
Temperatura	-0.220	9.567	< 0.001*	-0.203	-7.967	< 0.001*
Salinidad	0.121	13.747	< 0.001*	0.078	7.059	< 0.001*
R ²	0.417	F observado	1294.000	0.121	F observado	228.600
R ² ajustado	0.417	P	< 0.001*	0.120	P	< 0.001*
Factor	Total salmónidos-Hembras Caligus			Total Salmon del Atlantico - Hembras Caligus		
	Coefficiente	T observado	P	Coefficiente	T observado	P
Latitud	-0.376	-6.702	< 0.001*	-0.748	-9.431	< 0.001*

Longitud	0.237	6.517	< 0.001*	1.572	15.079	< 0.001*
Temperatura	-0.148	-8.353	< 0.001*	-0.202	-7.967	< 0.001*
Salinidade	0.093	13.831	< 0.001*	0.077	7.059	< 0.001*
R ²	0.364	F observado	1048.000	0.121	F observado	228.600
R ² ajustado	0.364	P	< 0.001*	0.120	P	< 0.001*
	Total salmónidos-Juveniles Caligus			Total Salmon del Atlantico - Juveniles Caligus		
Factor	Coefficiente	T observado	P	Coefficiente	T observado	P
Latitud	-1.146	-7.379	< 0.001*	-1.119	-6.740	< 0.001*
Longitud	0.754	7.502	< 0.001*	4.415	20.230	< 0.001*
Temperatura	-0.536	-10.937	< 0.001*	-0.452	-8.526	< 0.001*
Salinidade	0.178	9.602	< 0.001*	0.005	0.248	< 0.001*
R ²	0.261	F observado	645.400	0.109	F observado	203.300
R ² ajustado	0.260	P	< 0.001*	0.108	P	< 0.001*

Tabla 2. Resultado del análisis de regresión múltiple para presencia de individuos de *C. rogercresseyi* (total adultos, machos, hembras y juveniles) para salmón del Pacífico y trucha arcoiris.

	Total Salmon del Pacifico - Adultos Caligus			Total Trucha Arcoiris - Adultos Caligus		
Factor	Coefficiente	T observado	P	Coefficiente	T observado	P
Latitud	-0.007	-1.423	0.156 n.s.	-0.013	-0.047	0.962 n.s.
Longitud	-0.019	-2.145	0.033 n.s.	5.519	11.403	< 0.001*
Temperatura	-0.003	-2.224	0.027 n.s.	-0.129	-1.585	0.114 n.s.
Salinidade	0.003	0.561	0.575 n.s.	-0.002	-0.078	0.938 n.s.
R ²	0.052	F observado	2.700	0.371	F observado	66.510
R ² ajustado	0.033	P	0.031*	0.365	P	< 0.001*
	Total Salmon del Pacifico - Machos Caligus			Total Trucha Arcoiris - Machos Caligus		
Factor	Coefficiente	T observado	P	Coefficiente	T observado	P
Latitud	-0.007	-1.363	0.175 n.s.	0.119	0.617	0.537 n.s.
Longitud	-0.016	-1.944	0.053 n.s.	3.614	10.887	< 0.001*
Temperatura	-0.003	-2.108	0.036 n.s.	-0.063	-1.138	0.256 n.s.
Salinidade	0.003	0.470	0.639 n.s.	-0.006	-0.317	0.752 n.s.
R ²	0.045	F observado	2.324	0.333	F observado	56.340
R ² ajustado	0.026	P	0.058 n.s.	0.327	P	< 0.001*
	Total Salmon del Pacifico - Hembras Caligus			Total Trucha Arcoiris - Hembras Caligus		
Factor	Coefficiente	T observado	P	Coefficiente	T observado	P
Latitud	-0.001	-0.915	0.361 n.s.	-0.132	-1.261	0.208 n.s.
Longitud	< 0.001	-2.589	0.010*	1.903	10.556	< 0.001*
Temperatura	< 0.001	-1.798	0.074 n.s.	-0.065	-2.157	0.032*
Salinidade	< 0.001	1.070	0.286 n.s.	0.003	0.379	0.705 n.s.
R ²	0.053	F observado	2.755 n.s.	0.369	F observado	66.020
R ² ajustado	0.034	P	0.029*	0.364	P	< 0.001*

Factor	Total Salmon del Pacifico - Juveniles Caligus			Total Trucha Arcoiris - Juveniles Caligus		
	Coefficiente	T observado	P	Coefficiente	T observado	P
Latitud	-0.031	-1.914	0.057 n.s	1.785	4.720	< 0.001*
Longitud	-0.069	-2.581	0.011*	7.230	11.165	< 0.001*
Temperatura	-0.009	-2.015	0.045*	-0.172	-1.585	0.114 n.s
Salinidad	0.003	1.857	0.065 n.s	0.001	0.050	0.960 n.s.
R ²	0.112	F observado	6.221	0.332	F observado	56.160
R ² ajustado	0.094	P	< 0.001*	0.327	P	< 0.001*

4 DISCUSION

Los resultados indicarían que el salmón del Atlántico sería más susceptible a la infección con *Caligus* en comparación a la trucha arcoiris y al salmón plateado. Por otro lado los resultados del análisis de regresión múltiple indicarían que a mayor latitud y mayor longitud habría menor tasa de infección de *Caligus* para las tres especies lo que se debería probablemente a las condiciones oceanográficas, ya que se combinarían bajas salinidades y temperaturas a mayor latitud, y altas salinidades a mayor latitud. El manejo de la tasa de infección de este parásito sobre salmónidos de cultivo, es importante pues puede ser un vector para otros agentes patógenos bacteriales y virales (Oelkers et al., 2014; Labra et al., 2020)

Los resultados solo muestran número de individuos de *Caligus* por individuo de pez, pero no tenemos información detallada sobre la talla, biomasa, y estado reproductivo del pez, lo cual podría afectar los resultados (Gonzalez et al., 2020; Hemingsen et al., 2020; Montory et al., 2020). Considerando esta situación, hay necesidad de controlar la tasa de infección de *Caligus* sobre salmónidos de cultivo, para controlar las pérdidas asociadas, esto ha generado medidas de control basadas en agentes químicos así como posibles técnicas moleculares (Valenzuela-Muñoz et al., 2020).

Si se considera el rol importante en la economía chilena del cultivo de salmónidos (Soto et al., 2019), sobre esta base, es probable que se manejen grandes volúmenes de datos relacionados con aspectos de producción de salmónidos. El presente estudio se basó solo en cultivos localizados entre los 42 y 46°S, mientras que los cultivos de salmónidos están localizados entre los 40 y 53°S (Soto et al., 2019; Valenzuela-Muñoz et al., 2020). El presente estudio aunque manejó una fracción de un gran volumen de datos disponibles, el uso de técnicas de Ciencia de Datos y Machine Learning han sido originalmente propuestos para ingeniería y economía (VanderPlas, 2017), igual puede ser una alternativa viable para procesar y analizar la información de datos ecológicos y

ambientales (Humphries et al., 2018). Sobre estos antecedentes el uso de estas técnicas para estudiar datos de *Caligus*, confirmarían los antecedentes descritos por la literatura, y sería interesante aumentar la escala de la cantidad de datos disponibles para determinar la robustez de los modelos predictivos y su concordancia con los estudios.

5 AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado por el proyecto MECESUP UCT 0804. El autor principal expresa su gratitud a M.I. y A.M.S. por sus valiosos aportes y sugerencias para la preparación del manuscrito.

REFERENCIAS

Boxshall, G.A. y Bravo, S., (2000). On the identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoidea: Caligidae) from salmonid net pen systems in southern Chile. *Contributions to Zoology (Amsterdam, Netherlands)*: 69: 137-146. DOI:10.1163/18759866-0690102015

Bravo, S., Erranz, F., y Lagos C. (2009). A comparison of sea lice, *Caligus rogercresseyi*, fecundity in four areas in southern Chile. *Journal of Fish Diseases* 32, 107–113. DOI:10.1111/j.1365-2761.2008.01012.x

Bravo, S., Pozo, V., Silva, M.T., y Abarca, D., (2013). Comparison of the fecundity rate of *Caligus rogercresseyi* infesting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on farms in two regions of Chile. *Aquaculture* 404/405: 55-58. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.002>

Bravo, S., Silva, M.T., y Treasurer, J. (2014). Factors affecting the abundance of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo) on farmed salmonids in Chile in the period 2006–2007. *Aquaculture* 434: 456-461. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.009>

De Los Rios, P., (2019). A checklist of marine parasite copepods of the genus *Caligus* (O.F. Müller, 1785) and their respective marine fish hosts in Chile. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 132: 65–72. DOI:10.2988/PBSW-D-19-00003

Gonzalez, M.P., Muñoz, J.L.P., Valerio, V., y Vargas-Chacoff, L., (2016). Effects of the ectoparasite *Caligus rogercresseyi* on *Salmo salar* blood parameters under farm conditions. *Aquaculture*, 457: 29-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.027>.

Gonzalez, M.P., Ovalle, L., Spinetto, C., Oyarzo, C., Oyarzun, R., Menanteau, M., Alvarez, D., Rivas, M., y Olmos, P. (2020). Experimental transmission of *Caligus rogercresseyi* between two different fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 141: 127-138. DOI: 10.3354/dao03513

Halswanger, T., (2016). An introduction to statistics with Python. With applications in the life sciences. *Springer International Publishing Switzerland*, 278 p.

Harris, C.R., Millman, K.J., van der Walt, S., Gommers, R., Virtalen, P., Cournapeau, D., Wieser, E., Taylor J., Berg, S., Smith, N.J., Kern, R., Picus, M., Hoyer, S., van Kerkwijk, M.H., Brett, M., Haldane, A., Fernandez del Río, J., Wiebe, M., Peterson, P., Gérard-Marchant, P., Sheppars, K., Reddy, T., Warren Weckesser, Abbasi, H., Gohlke, C., y Oliphant, T.E., (2020) Array programming with NumPy. *Nature*, 2020,585: 357-362. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>

Hemmingsen, W., Mackenzie, K., Sagerup, K., Remen, M., Bloch-Hansen, K., Dagbjartarson Imsland, A.K., (2020). *Caligus elongatus* and other sea lice of the genus *Caligus* as parasites of farmed salmonids: a review. *Aquaculture* 522: 735160. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735160>

Humphries, G., D.R. Magness & F. Huettmann, (Eds) 2018. Machine learning for ecology and sustainable natural resource management. *Springer Nature Switzerland, A.G.*, 441 p.

Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comp. Sci. & Eng.*, 9: 90–95. doi: 10.1109/MCSE.2007.55

Labra, A., Bravo, S., y Marshall, S.H., (2020). Defining the role of *Caligus rogercresseyi* in transmission and spreading of *Piscirickettsia salmonis*. *Aquaculture* 528: 735489. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735489>

McKinney, W. (2010). Data structures for statistical computing in python. *Proceedings 9th Python in Sciences Conferences*, 445: 51–56. DOI: 10.25080/Majora-92bf1922-00a

Montory, J.A., Cumillaf, J.P., Gebauer, P., Urbina, M., Cubillos V.M., Navarro, J.M., Marin, S.L., y Cruces E., (2020). Early development and metabolic rate of the sea louse *Caligus rogercresseyi* under different scenarios of temperature and pCO₂. *Marine Environmental Research*, 162: 105154. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105154>

Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., Gonzalez, J., Wadsworth, y Nylund, A., (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of infectious salmon anemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture* 420/421: 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.016>

Seabold, S., y Perktold, J. (2010). Statsmodels: Econometric and statistical modeling with python. In 9th Python in Science Conference. DOI: 10.25080/Majora-92bf1922-011

Soto, D., Leon-Muñoz, J., Desdner, J., Luengo, L., Tapia, F.J., Garreaud, R. 2019. Salmon farming vulnerability to climate change in southern Chile: understanding the biophysical, socioeconomic and governance links. *Reviews in Aquaculture* 11:354-474. DOI: 10.111/raq.12336

Valenzuela-Muñoz, V., Gallardo-Escarate, A., Saez-Vera, C., Garces, F., Bonfatti, J., y Gallardo-Escarate, C., (2020). More than bubbles: in vivo assessment and transcriptome modulation of *Caligus rogercresseyi* and Atlantic salmon exposed to hydrogen peroxide (PARAMOVE®). *Aquaculture*, 522: 735170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735170>

VanderPlas, J., (2017). Python Data Science Handbook. O'Reilly Media, Inc., 1005 Gravenstein Highway North, Sebastopol, CA 95472. 529 p.

Van Rossum, G., y Drake Jr, F.L. (1995). Python reference manual. Centrum voor Wiskunde en Informatica Amsterdam.

Waskom, M.L. (2021). Seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Software.*, 6: 3021. DOI: 10.21105/joss.0302

DESARROLLO DE UN LENGUAJE DE INTERCOMUNICACIÓN PARA LA INTEGRACIÓN COLABORATIVA ENTRE DISPOSITIVOS HARDWARE HETEROGÉNEOS Y COMPONENTES SOFTWARE EN EL DOMINIO DE LA GANADERÍA DE PRECISIÓN EN MONOGÁSTRICOS¹

Data de submissão: 23/12/2022

Data de aceite: 10/01/2023

Vicente López Sacanell

Universitat de Lleida

Ph.D student

Grupo de investigación en AgróTICA y

Agricultura de Precisión (GRAP)

Escuela Técnica Superior de

Ingeniería Agraria

Campus Agroalimentario

Forestal y Veterinario

Lleida, España

<https://orcid.org/0000-0002-8258-8834>

Jesús Pomar Gomá

Universitat de Lleida

Emeritus Professor

Grupo de investigación en AgróTICA y

Agricultura de Precisión (GRAP)

Escuela Técnica Superior de

Ingeniería Agraria

Campus Agroalimentario

Forestal y Veterinario

Lleida, España

<https://orcid.org/0000-0002-4757-551X>

RESUMEN: Los sistemas de alimentación de precisión son sistemas complejos que requieren el diseño y desarrollo de componentes especializados, que incluyen hardware y software (es decir, módulos DSS, alimentadores de precisión, controladores electrónicos, sensores, actuadores y otros dispositivos) adaptados a diferentes especies animales y tipos de producción. La construcción de sistemas de alimentación de precisión implica reunir estos componentes de manera colaborativa. Para permitir que estos componentes heterogéneos interoperen, es necesario un lenguaje de comunicación especializado y de alto nivel. Hoy en día, los dispositivos comercializados generalmente usan lenguajes de comunicación patentados que dificultan la comunicación entre componentes de diferentes proveedores o desarrolladores. Este trabajo constituye una propuesta para un lenguaje abierto de alto nivel que permita la intercomunicación de componentes diferentes y heterogéneos independientemente del fabricante y proveedor. En esta propuesta, todos los mensajes de comunicación se construyen en base a una estructura común y un contenido específico y todos los mensajes se clasifican de acuerdo con sus funcionalidades y se probaron en sistemas reales en el dominio de alimentación de precisión.

PALABRAS CLAVE: Alimentación de precisión. Lenguaje de comunicación entre agentes. Integración del hardware de proveedores. Arquitectura multiagente.

¹ Este trabajo es un resultado del proyecto Feed-a-Gene (grant agreement no.633531) financiado por el Programa H2020 de la Unión Europea. Asimismo, el trabajo fue presentado virtualmente en el XI Congreso Ibérico de AgroIngeniería, organizado conjuntamente por la Sociedad Española de Agroingeniería y por la Secção Especializada de Engenharia Rural de la Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal, celebrado los días 11 y 12 de noviembre de 2021.

DEVELOPMENT OF AN OPEN AGENT COMMUNICATION LANGUAGE TO INTEGRATE MULTI-MANUFACTURER HARDWARE DEVICES AND SOFTWARE COMPONENTS IN THE DOMAIN OF PRECISION LIVESTOCK FARMING FOR MONOGASTRIC

ABSTRACT: Precision feeding systems are complex systems that require the design and development of specialized components, including hardware and software (i.e., DSS modules, precision feeders, electronic controllers, sensors, actuators, and other devices) adapted to different animal species and types of production. Building precision feeding systems involve putting these components together in a collaborative way. To allow these heterogeneous components to interoperate, a specialized and high-level communication language is necessary. Today, commercialized devices generally use proprietary communication languages that make the communications between components of different vendors or developers very difficult. This work constitutes a proposal for an open, high-level language that allows intercommunication of different and heterogeneous components regardless of the manufacturer and vendor. In this proposal, all communication messages are built based on a common structure and a specific content and all messages are classified according to their functionalities and was tested in real systems in precision feeding domain.

KEYWORDS: Precision farming livestock. Agent communication language. Hardware multivendor integration. Multiagent architecture.

1 INTRODUCCIÓN

La contribución de las tecnologías en los sistemas de producción ganaderos se ha convertido en un instrumento necesario e imprescindible que permite, no sólo reducir los costes de producción e incrementar la eficiencia y la productividad, si no también estudiar otros factores como el comportamiento, la actividad física o la salud de los animales. La incursión de nuevas tecnologías en dicho ámbito ha permitido crear un *nuevo* concepto llamado Ganadería de Precisión (*PLF - Precision Livestock Farming*). La PLF apunta a ser aquel instrumento que permite un desarrollo sostenible de los sistemas de producción animal (Berckmans, 2014; Milovanovic, 2014).

Ésta persigue como objetivo principal crear un sistema de manejo - a nivel productivo, reproductivo, de impacto ambiental y de salud y bienestar animal - basado en el monitoreo y control de un sistema continuo y automático en tiempo real (Berckmans, 2014). Este monitoreo y control está fundamentado en la observación, es decir, en la adquisición de datos y su procesamiento (Pomar & López, 2018). No obstante, la toma de decisiones no siempre es fácil debido a la gran variedad de información disponible y a la naturaleza dinámica de estos datos (O'Grady & O'Hare, 2017).

Los sistemas de información desarrollados se adecúan a manejar todos los datos medidos por los diferentes componentes instalados en granja, pero debido a la globalización y la desregularización del sector, ésto continúa siendo un gran desafío,

y más aún, a nivel comercial (Samah, *et al.*, 2009). La alta competitividad provoca, como consecuencia, la creación de sistemas de manejo opacos. A pesar de que cada fabricante utiliza unos estándares concretos, la tendencia va dirigida al uso de estándares normalizados, como ya ocurre con las ISO 11784/11785/14223/24631, para identificación electrónica, el ISObus, en maquinaria, o la ISO 11788ADED, para equipos de ordeño.

Desgraciadamente los equipos que comúnmente se utilizan en los sistemas de engorde convencionales para monogástricos no han sufrido importantes mejoras tecnológicas, y la alimentación continúa enfocándose en el grupo, en lugar del individuo.

En este estudio se pretende mejorar la tecnología existente basándose en los modelos multiagente. Estos modelos se constituyen en base a agentes, que en definitiva representan cada uno de los equipos y/o dispositivos instalados en granja. Cada agente debe ser capaz de manejar su propia información, así como también ser capaz de relacionarse con uno o varios agentes, según la necesidad. La manera de hacerlo será a través de un lenguaje de comunicaciones entre agentes, el cual permitirá un intercambio de la información generada por cada uno de ellos y vital para la toma de decisiones.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

La evolución del sector ha hecho que se empiecen a crear prototipos viables para granjas de experimentación, un paso necesario y previo antes de llegar a los modelos comerciales. Uno de estos prototipos con los que se ha realizado este estudio son los alimentadores inteligentes de alimentación (IPF – *Intelligent Precision Feeder*). Estos equipos están provistos con una serie de sensores y actuadores capaces de identificar, monitorizar y proporcionar una dieta individualizada a cada animal (cerdo), mediante el envío y recepción de información concreta y precisa en tiempo real, con el fin de satisfacer los objetivos predefinidos por el usuario.

Esta información, enviada mediante mensajes, debe ser definida y estructurada adecuadamente, teniendo en cuenta tanto el tipo de dispositivo conectado en el sistema como el tipo de información que va a generar y va a enviar a otro agente (Tabla 1). Esta información debe ser estructurada de una determinada manera para la comprensión de cada agente involucrado en su intercambio, por lo que es necesario crear un Lenguaje de Comunicaciones entre Agentes (ACL – *Agent Communication Language*). El ACL puede ser definido como un método de alto nivel para intercambiar información y conocimiento entre los diferentes agentes que forman parte de una arquitectura multiagente (Genesereth & Ketchpel, 1994). Esta comunicación entre agentes es un componente clave que permite la interacción entre ellos y se convierte en la base de las arquitecturas multiagente (Soon, *et al.*, 2019).

Tabla 1 – Componentes que pueden formar parte del sistema multiagente y tipo de contenido que genera.

Component	Feeder device	Scale device	Drinker device	Accelerometer sensor	Environmental sensors
	Date	Date	Date	Date	Date
	Start time	Start time	Start time	Animal ID	Time
	End time	End time	End time	Sensor ID	Sensor ID
	Time spent	Time spent	Time spent	Distance	Signal
Data acquired	Diet A	Weight	Water delivered	Time spent standing	
	Diet B	Animal ID	Animal ID	Time spent lying	
	Diet C	Device ID	Device ID	Time spent walking	
	Diet D	Certitude	Certitude		
	Animal ID				
	Device ID				
	Certitude				

El desarrollo del lenguaje de comunicación propuesto tiene como fundamento teórico el estudio realizado sobre un prototipo virtual basado en agentes (Pomar, *et al.*, 2011). En este estudio se crearon varios módulos virtuales, llamados agentes, los cuales representaban componentes reales de una granja. De esta forma se creó un entorno multiagente, formado por varios agentes (*Feeder, Mixer, Formulator*, etc.). La finalidad de ese prototipo virtual fue crear un lenguaje de comunicación específico para sistemas de producción de engorde, en monogástricos, mediante el cual los agentes involucrados interactuaban entre sí de acuerdo con los propósitos deseados.

Posteriormente, el prototipo virtual fue adaptado con ciertas restricciones a un prototipo físico (equipo IPF), lo cual permitió realizar diferentes estudios sobre alimentación de precisión en cerdos de engorde y así comprobar la viabilidad del sistema (Hauschild, *et al.*, 2012) (Andretta, *et al.*, 2016).

Proyectos como agriOpenLink, loF2020 y Feed-a-Gene han permitido modificar, complementar y mejorar el lenguaje creado inicialmente. Así, el proyecto loF2020 desarrolla varias soluciones basadas en IoT, enfocándose en diferentes modelos productivos y de gestión en el ámbito de la agricultura. En cada uno de ellos se define el modelo del dominio, algunos componentes utilizados y el tipo de información procedente de cada componente

(Tomasi, *et al.*, 2017). Por otra parte, el proyecto Feed-a-Gene ha permitido definir y tratar en profundidad la información que puede ser recibida por aquellos componentes integrados en el sistema productivo y que puede resultar útil para la toma de decisiones.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un agente es capaz de intercambiar información, solicitar servicios y negociar con otros agentes a través del ACL. De esta forma el ACL permite que los agentes trabajen de forma cooperativa para aportar la información deseada o para solucionar un problema. Para que dos agentes se comuniquen de forma efectiva, ambos deben usar la misma estructura de mensajes.

Se propone utilizar la estructura mostrada en la Tabla 2. Todos los mensajes tendrán un encabezado formado por un carácter “#” ó “\$”, el cual permite distinguir si el mensaje es enviado por el software de control (SC) o es el SC quien lo recibe. A continuación, se le añadirá otro carácter, “[”, indicando que se inicia el encapsulado del mensaje. Como carácter de finalización del mensaje, se utilizará el “]” seguido por un *CRLF*.

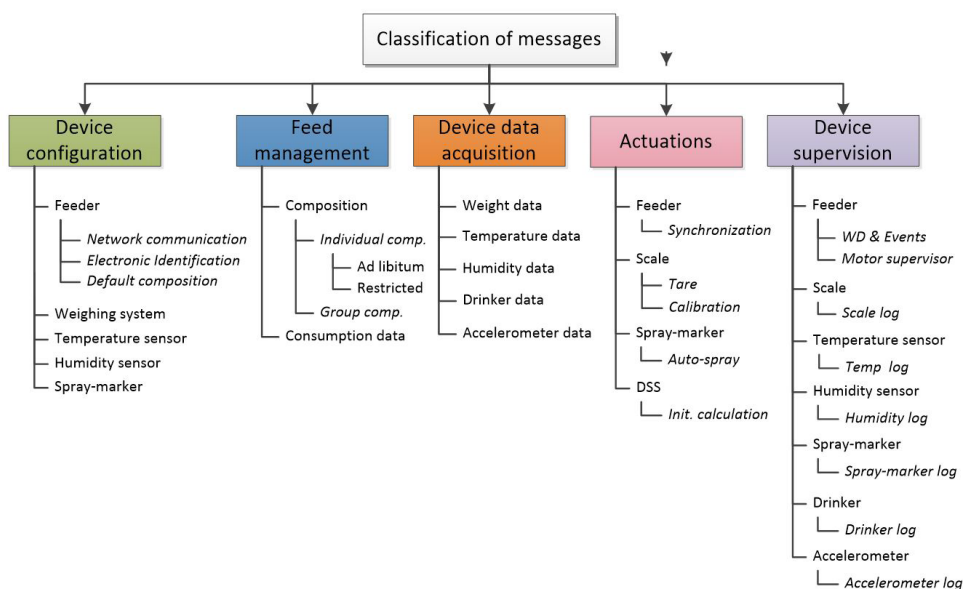
Tabla 2- Los mensajes empiezan y acaban siempre con unos caracteres de inicialización. Al contenido interno del mensaje se le añade dos tipos de información: 1) la información de los agentes implicados en la conversación para poder identificar y trazar el mensaje, y 2) la información que será útil para la toma de decisiones. La información contenida en cada mensaje puede variar dependiendo del dispositivo o equipo.

	<i>Definition</i>	<i>example</i>
Start	Initial characters	#{
Identification	Destination agent address	<18.01>
	Sender agent address	<SAB040>
	Number of message	<10201>
	Date	<2016-02-21>
	Time	<09:45:18>
	Class	<10>
	SubClass	<4>
	Type of device	<Scale>
Content		<2016-02-21>
		<09:35:22>
		<09:45:18>
		<1>
	The quantity of information depends on the <i>Class</i> and <i>SubClass</i> of the message	<982000056189330>
		<21>
		<082,400>
		<03021>
		<00,423>
		<0085510,546>
	<015996382,301>	
End	End characters	}+ <i>CRLF</i>

El encapsulado con toda la información será de dos tipos, la parte *identificativa*, o aquella que es necesaria para trazar el origen y el destino del mensaje y conocer su tipología, y la parte de *contenido*, o aquella que posee información útil para la toma de decisiones. Respecto a la *identificativa*, siempre indicará la dirección del agente receptor del mensaje, la dirección del agente que envía el mensaje, el número del mensaje, la fecha y hora de envío, la clase y subclase del mensaje, y por último el tipo de agente o dispositivo que genera el mensaje. En cuanto al *contenido*, éste puede ser variable dependiendo de la clase y subclase del mensaje.

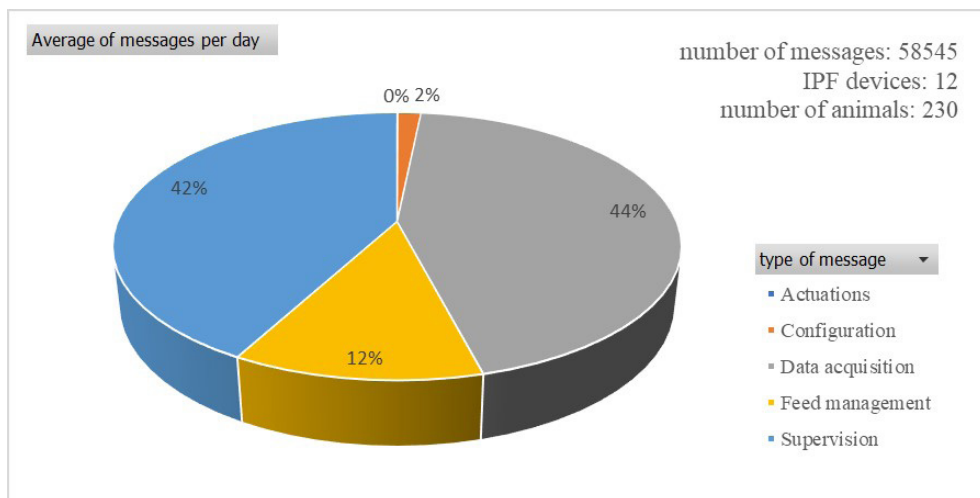
Es posible clasificar un mensaje dependiendo de la funcionalidad que éste tenga. Puede ser de configuración, manejo de las dietas y consumo, toma de datos de sensores/equipos, acciones específicas sobre los equipos, y por último del tipo supervisión (Figura 1).

Figura 1 – Clasificación de un mensaje ACL dependiendo de su funcionalidad.



La implementación de estos mensajes en los equipos IPF ha permitido la realización de diversos estudios debido a la posibilidad de gestionar la dieta suministrada a cada animal y obtener el consumo realizado por cada uno de ellos (Sousa, *et al.*, 2018) (Remus, *et al.*, 2019). No obstante, el lenguaje ACL propuesto puede proporcionar mucha más información adicional si se dispone de los equipos y sensores instalados, facilitando estudios sobre comportamiento y/o bienestar animal. No obstante, toda esta información debería ser tratada adecuadamente puesto que puede ser considerada como Big Data (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Proporción de mensajes generados al día. El 98% de los mensajes son utilizados para supervisar los equipos conectados y recibir los datos productivos para facilitar la toma de decisiones. La cantidad de mensajes a lo largo de todo un engorde puede ser de tal magnitud que es necesario un tratamiento adecuado de dicha información.



4 CONCLUSIONES

La creación de un lenguaje de comunicaciones que permite la interoperabilidad y el intercambio de información entre diferentes dispositivos, mediante mensajes, se ha convertido en uno de los primeros requisitos para avanzar hacia la alimentación de precisión. Este lenguaje de comunicaciones se ha diseñado para que los diferentes dispositivos que se comunican entre sí intercambien información, la cual puede ser útil para la toma de decisiones, como ya se ha contrastado en entornos reales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andretta, I., Pomar, C., Rivest, J., Pomar, J. & Radünz, J. (2016). Precision feeding can significantly reduce lysine intake and nitrogen excretion without compromising the performance of growing pigs. *Animal*, 10(7), pp. 1137-1147.

Berckmans, D. (2014). Precision livestock farming technologies for welfare management in intensive livestock systems. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 33(1), pp. 189-196.

Genesereth, M. & Ketchpel, P. (1994). Software agents. *Communications of the ACM*.

Hauschild, L., Lovatto, P., Pomar, J. & Pomar, C. (2012). Development of sustainable precision farming systems for swine: Estimating real-time individual energy and nutrient requirements in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 1(78), pp. 88-97.

Milovanovic, S. (2014). The role and potential of information technology in agricultural improvement. *Economics of Agriculture*, 61(2), pp. 471-485.

O'Grady, M. & O'Hare, G. (2017). Modelling the smart farm. *Information processing in agriculture*, Issue 4, pp. 179-187.

- Pomar, J. & López, V. (2018). La porcicultura de precisión es una perspectiva innovadora para el futuro de la producción porcina (I). *Albéitar*, Issue 217, pp. 18-19.
- Pomar, J. & López, V. (2018). La porcicultura de precisión es una perspectiva innovadora para el futuro de la producción porcina (II). *Albéitar*, Issue 218, pp. 20-21.
- Pomar, J., López, V. & Pomar, C. (2011). Agent-based simulation framework for virtual prototyping of advanced livestock precision feeding systems. *Computers and Electronics in Agriculture*, 78(1), pp. 88-97.
- Remus, A., Hauschild, L., Corrent, E., Létourneau-Montminy, M. & Pomar, C. (2019). Pigs receiving daily tailored diets using precision feeding techniques have different amino acids requirements than pigs fed in conventional phase-feeding systems. *Journal of Animal Science and Biotechnology*.
- Samah, B., Shaffril, H., Hassan, Md. & Ismail, N. (2009). Contribution of Information and Communication Technology in Increasing Agrobased Entrepreneurs Productivity in Malaysia. *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 5(3), pp. 93-98.
- Soon, G., On, C., Anthony, P. & Hamdan, A. (2019). A Review on Agent Communication Language. *Computational Science and Technology*, pp. 481-491.
- Sousa, L., Pomar, C., Campos, PHRF., da Silva, WC., Gobi, JP., Veira, AM., Fraga, AZ. & Hauschild, L. (2018). Precision feeding strategy for growing pigs under heat stress conditions. *Journal of Animal Science*, pp. 4789-4801.
- Tomasi, R., Rizzo, F. & Conzon, D., (2017). *The IoF2020 Use Case Architectures and Overview of the Related IoT Systems - WP3*, s.l.: s.n.

CAPÍTULO 8

DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO COMO ENSAYO DE IDENTIDAD PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE UN REMEDIO HERBOLARIO¹

Data de submissão: 15/01/2023

Data de aceite: 03/02/2023

Dr. en F. Gabriela Ávila Villarreal

Unidad Académica de Ciencias Químico
Biológicas y Farmacéuticas
Centro Nayarita de Innovación y
Transferencia de Tecnología
Universidad Autónoma de Nayarit
Tepic-Nayarit-México
<https://orcid.org/0000-0001-5241-5732>

Q.F.B. Guadalupe Yáñez Ibarra

Centro Nayarita de Innovación y
Transferencia de Tecnología
Universidad Autónoma de Nayarit
Tepic-Nayarit-México
<https://orcid.org/0000-0002-6801-9379>

M. en C. Gabriela Victoria Ruiz Castillo

Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro-México
<https://orcid.org/0000-0003-4967-2927>

Dra. en C. Ana María Hanan Alipi

Universidad Autónoma de Nayarit
Unidad Académica de Agricultura
Xalisco-Nayarit-México
<https://orcid.org/0000-0003-4711-2483>

M. en C. Roberto Hernández Villarreal

Universidad Autónoma de Nayarit
Tepic-Nayarit-México
<https://orcid.org/0000-0002-5230-5223>

RESUMEN: El uso de plantas medicinales sigue siendo una de las primeras opciones de tratamiento para la población a nivel mundial, por lo que garantizar su calidad, eficacia y seguridad resulta una prioridad. Razón por la que se han establecido métodos estándar que pueden ser utilizados como herramientas para la determinación del control de calidad, uno de ellos es la cromatografía en capa fina, método descrito en las farmacopeas como una alternativa rápida y sencilla para implementar posibles ensayos de identidad. En el presente trabajo se llevó a cabo el desarrollo de un método cromatográfico como control de calidad de un remedio herbolario a base de una mezcla de plantas que se utiliza ampliamente en la medicina tradicional como auxiliar del tratamiento en enfermedades renales. Dicho remedio herbolario fue evaluado conforme a la NOM-073-SSA1-2015 y a lo establecido por la FHEUM. Como resultado se obtuvo una huella cromatográfica similar tanto del material vegetal de referencia como la muestra encapsulada, lo que indica que no

¹ Este trabajo forma parte del proyecto "Estudio Etnofarmacológico preliminar del uso de Plantas Medicinales Nativas del Estado de Nayarit", con el número de registro SIP18-158 y con financiamiento ante la Universidad Autónoma de Nayarit.

sufrió algún tipo de degradación química al estar expuesto a condiciones extremas de temperatura y humedad por 12 meses. Todo lo anterior, permitió proponer como ensayo de identidad una cromatografía en capa fina con una fase móvil de diclorometano/acetato de etilo en proporción 9:1 para productos herbolarios comerciales que tengan la mezcla de *Guazuma ulmifolia*, *Equisetum hyemale*, *Serjania triquetra* y *Arctostaphylos pungens*.

PALABRAS CLAVE: Medicina tradicional. Cromatografía en capa fina. Control de calidad. Remedios herbolarios. Infusión.

DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD AS IDENTITY TEST FOR QUALITY CONTROL OF AN HERBAL REMEDY

ABSTRACT: Nowadays the consumption of herbal remedies is one of the most popular options to treat a broad diversity of illness worldwide. Development of quality control assays to confirm quality, efficacy and safety of these remedies should be a priority. In consequence, standard methods have been established that can be used as tools for quality control determination, one of it is thin layer chromatography (TLC), a method generally described in all the pharmacopeias as a quick and simple alternative to implement possible identity tests. The aim of this work, we carried out the development of a chromatographic method as quality control strategy for an herbal remedy. This herbal product is a mixture of five plants, ancestral used in Traditional Mexican Medicine to treat kidney diseases. This herbal remedy was evaluated according to Mexican NOM-073-SSA1-2015 and the established by the Mexican Herbal Pharmacopeia (FHEUM). As a result, a similar TLC fingerprint was obtained from both the reference plant material and the capsule sample, indicating that it did not undergo any chemical degradation as it was exposed to extreme temperature and humidity conditions for 12 months. Taking everything into account, this work allows us to imply for identity test for this herbal mixture a TLC experiment; with a mobile phase combination of dichloromethane/ethyl acetate in proportion 9:1 for commercial herbal products including the mixture of *Guazuma ulmifolia*, *Equisetum hyemale*, *Serjania triquetra* and *Arctostaphylos pungens*.

KEYWORDS: Traditional Mexican Medicine. Thin layer chromatography. Quality control. Herbal remedies. Infusion.

1 INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales es una de las terapias complementarias y alternativas que más se utilizan en el mundo; por lo que, durante miles de años éstas se han consumido con fines terapéuticos, dando origen a la medicina tradicional (MT). (Sofowora, Ogunbodede & Onayade, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la MT como:

La suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales. (World Health Organization [WHO], 2013, pp 15).

Datos reportados por la OMS indican que entre el 65 al 80 % de la población mundial ha utilizado plantas medicinales para satisfacer o complementar sus necesidades básicas de salud. (Palhares *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2020).

En ese sentido, se ha visto que la MT se utiliza para tratar una gran variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades crónico-degenerativas como las enfermedades renales, en donde los pacientes buscan tratarse sin tener los efectos secundarios que los medicamentos convencionales provocan. (Bencheikh *et al.*, 2021).

De acuerdo con el Reporte de Salud Mundial emitido por la OMS y al proyecto de Carga Global de la Enfermedad, se puede afirmar que las enfermedades renales incluidas las del tracto urinario contribuyen con aproximadamente 850,000 muertes cada año. (Schieppati & Remuzzi 2005; Senanayake *et al.*, 2017; Senanayake *et al.*, 2018).

Si bien, la Fundación Mexicana del Riñón reportaba en el año 2012 que en México había 9.6 millones de personas con insuficiencia renal en sus estadios tempranos, en la actualidad no existe un registro de estos pacientes, solo se sabe que en el año 2017 se estimó que alrededor de 14.5 millones de personas padecían esta enfermedad. (Agudelo-Botero *et al.*, 2020; Miguel-Hernández, Romero-Quechol & Cruz-Ojeda, 2020).

Además de la problemática de prevalencia e incidencia de esta enfermedad, también se debe tener en cuenta que el tratamiento es extremadamente caro. Razón por la cual, los pacientes tienen que recurrir a otras opciones de tratamiento más accesibles. (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009, pp 9; Khan *et al.*, 2022).

En México, existen diversas alternativas en la MT para tratar estas afecciones. Una que complementa al tratamiento farmacológico es el consumo de infusiones a base de mezclas de plantas con propiedades medicinales. No obstante, se tiene la problemática que la mayoría de estas plantas no cuentan con evidencia científica suficiente que asegure su calidad, eficacia y seguridad. (Bahmani *et al.*, 2016; Govea-Salas *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2022; Sansores-España *et al.*, 2022).

Los productos a base de plantas por lo general se consideran seguros al ser de origen natural, sin embargo, esto no se puede asegurar sin realizarle investigaciones exhaustivas. Sobre todo, porque algunas plantas pueden tener efectos nefrotóxicos o hepatotóxicos, además de presentarse interacciones entre plantas y medicamentos, errores de dosificación y de identificación, presencia de contaminantes ambientales e incluso adulterantes químicos. (Bateman, Chapman & Simpson, 1998; Debjit *et al.*, 2009; Ekor, 2014; Khan *et al.*, 2022; Lippert & Renner, 2022; Yang *et al.*, 2018).

Con el propósito de tener evidencias de la seguridad se estableció la “estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023” la cual pretende ayudar a las autoridades

sanitarias a encontrar soluciones que promuevan la utilización segura y eficaz de la MT mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales. (WHO, 2013, pp 8).

A pesar de que en la actualidad gracias a esas estrategias ya se cuenta con evidencia del potencial efecto farmacológico de un número considerable de plantas, con el aumento en el uso mundial de productos a base de plantas y la introducción de productos nuevos en el mercado, ha provocado graves problemas de salud pública. (Atanasov *et al.*, 2021; Ekor, 2014; Sofowora, Ogunbodede & Onayade, 2013).

Es bien sabido que la seguridad de estos productos se ve comprometida por la falta de un control de calidad adecuado, el etiquetado incorrecto y la falta de información para el paciente. Por lo tanto, es esencial que el público, incluidos los profesionales de la salud, reciba suficiente información para ayudar a comprender mejor los riesgos asociados con el uso de estos productos y garantizar que todos sean seguros y de calidad adecuada. (Ekor, 2014; Goda, 2022; Heydari *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2014).

En ese sentido, se recomienda una evaluación científica de las propiedades químicas y biológicas, realizar un control de calidad de los extractos, una identificación adecuada de la planta, el correcto etiquetado y con todo esto corroborar científicamente su seguridad y eficacia farmacológica. (Heinrich *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2022; Luan *et al.*, 2020; Rivera-Mondragón *et al.*, 2017).

Para lograr lo anterior, la OMS y las diferentes instancias regulatorias internacionales acordaron una serie de técnicas analíticas simplificadas. Dentro de estas, se recomienda como primer paso una inspección visual (incluidos el color y olor característico) para detectar una posible contaminación o adulteración. Después se deben realizar pruebas que comprueben la inocuidad, por ejemplo, la determinación de materia extraña, el contenido de cenizas insolubles en ácido, microorganismos (bacterias y hongos), metales pesados, micotoxinas, plaguicidas, entre otros. Posteriormente se debe comprobar la identidad y contenido de metabolitos secundarios a través de técnicas cromatográficas como la cromatografía en capa fina, la cromatografía de líquidos o la cromatografía de gases, etc. (Balekundri & Mannur, 2020; Bauer & Franz, 2010; Food and Drug Administration, 2016; Muyumba *et al.*, 2021; Stavrianidi, 2020; WHO, 1998; WHO, 2007).

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue definir un ensayo de identidad para el control de calidad para un remedio herbolario (RH) comercializado en cápsulas y como mezcla vegetal para infusión, el cual declara contener: Flor de peña (*Hieracium fendleri*), Cola de caballo (*Equisetum arvense*), Tres costillas (*Capsella bursa-pastoris*) y Guásima (*Guazuma ulmifolia*).

El RH en cápsulas fue evaluado conforme a los numerales 8 y 10 de la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, estabilidad de fármacos y medicamentos, así

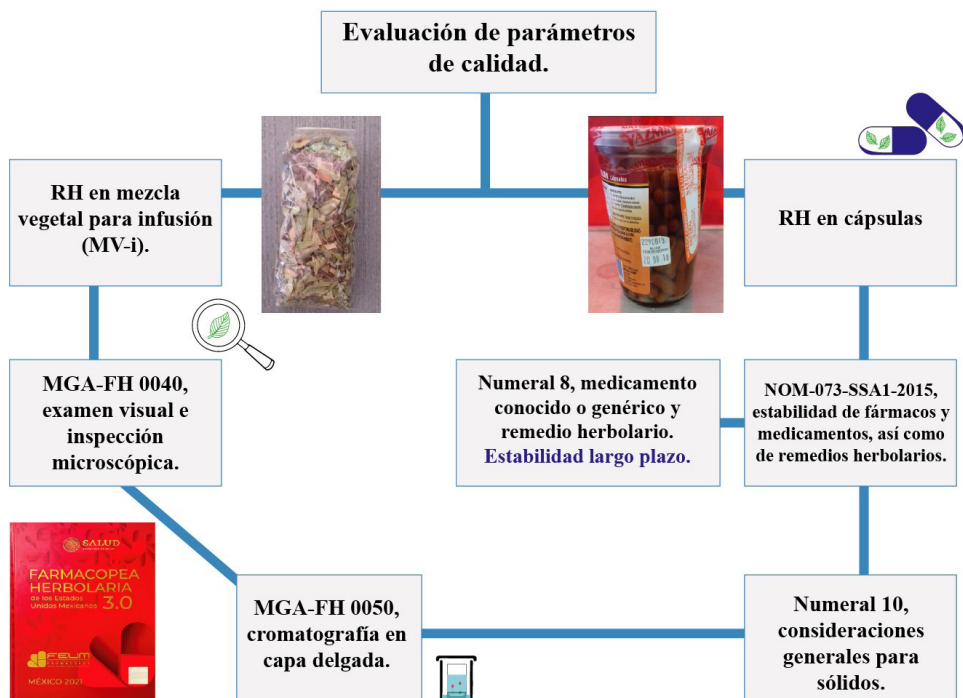
como de remedios herbolarios, almacenado bajo condiciones críticas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65\text{ \% HR} \pm 5\text{ \% HR}$, mediante perfiles cromatográficos con una frecuencia de análisis de 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses. La mezcla vegetal para infusión fue evaluada macroscópicamente y conforme a lo establecido en los Métodos Generales de Análisis MGA-FH 0040 y 0050 de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM).

2 MATERIALES

El remedio herbolario objeto de estudio se adquirió de manera comercial en la ciudad de Tepic, Nayarit en dos presentaciones: en cápsulas con número de lote 3361215 y otra a granel comercializada como mezcla vegetal para infusión (MV-i).

3 MÉTODOS

Figura 1. Metodología a seguir para evaluar la calidad de un remedio herbolario.



3.1 PARÁMETROS DE CALIDAD (NOM-073-SSA1-2015), PARA EL CASO DE LAS CÁPSULAS

De acuerdo con el apartado 8-Medicamento conocido o genérico y remedio herbolario de la NOM-073-SSA1-205, las condiciones de trabajo (tabla 1) fueron las siguientes:

Tabla 1. Variables utilizadas para evaluar la estabilidad del remedio herbolario en cápsulas conforme a lo establecido en la NOM-073-SSA1-205 para sólidos.

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad a largo plazo	30 °C ± 2 °C / 65 % HR ± 5 % HR	12 meses	0, 3, 6, 9 y 12 meses

Además, los parámetros evaluados conforme al Apartado 10- Consideraciones generales (prueba para sólidos) fueron: Apariencia/Descripción/Aspecto, color e identidad (inicial y final).

3.2 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA, PARA EL CASO DEL MV-i

La identificación de las especies vegetales contenidas en la mezcla del MV-i (Figura 2) se realizó separando por similitud morfológica y acorde a lo establecido en el MGA-FH 0040, examen visual e inspección microscópica de la FHEUM y en colaboración con la Dra. en C. Ana María Hanan Alipi por medio de métodos macroscópicos.

3.3 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

El MV-i se pulverizó en un molino de cuchillas, posteriormente se realizó la extracción vía maceración con una solución hidroalcohólica en proporción 85:15 etanol-agua, por triplicado y se dejó en reposo por un periodo de 72 h a temperatura ambiente. El disolvente se decantó y se eliminó por destilación rotatoria a presión reducida hasta obtener el extracto seco con la ayuda de un rotaevaporador.

En el caso de las cápsulas, desde un inicio se mantuvieron en un horno de convección a 30 °C ± 2 °C / 65 % HR ± 5 % HR, tomándose muestras (4 cápsulas) con una frecuencia de análisis de 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses, realizando la extracción de la misma forma que en el MV-i.

3.4 ENSAYO DE IDENTIDAD: MGA-FH 0050, CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (CCF)

Se llevó a cabo un análisis cromatográfico preliminar por cromatografía en capa fina de los extractos, con el objetivo de determinar cuál es la fase óptima para la elución de la mayor cantidad de metabolitos secundarios. Para esto, se utilizaron placas de sílica gel con base de aluminio 60 F₂₅₄ con 0.2 mm de espesor de capa.

Una vez obtenida la fase móvil ideal se procedió a evaluar todas las muestras por CCF. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta (UV) en dos longitudes de onda

y posteriormente se revelaron con ácido sulfúrico al 10 % a 100 °C para la oxidación de los compuestos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar los parámetros establecidos en la norma antes mencionada, se obtuvo lo indicado en la tabla 2:

Tabla 2. Resultados obtenidos al someter las cápsulas a estabilidad a largo plazo conforme lo establecido por la NOM-073-SSA1-205.

Frecuencia de análisis	Apariencia/Descripción/ Aspecto*	Color**	Identidad
0	✓	✓	02/sep/2016
1	✓	✓	05/oct/2016
3	✓	✓	08/dic/2016
6	✓	✓	06/mar/2017
9	✓	✓	05/jun/2017
12	✓	✓	04/sep/2017

***Apariencia:** Cápsulas lisas, un poco rígidas, a la vista se observa un completo llenado de las mismas.

Descripción: Cápsulas de gelatina dura, tamaño No.1

Aspecto: Correcto cierre, contenido en forma de polvo en tamaño irregular.

****Color:** Cápsula: Transparente opaco; Contenido: Beige arenoso.

Al evaluar el sistema contenedor-cierre:

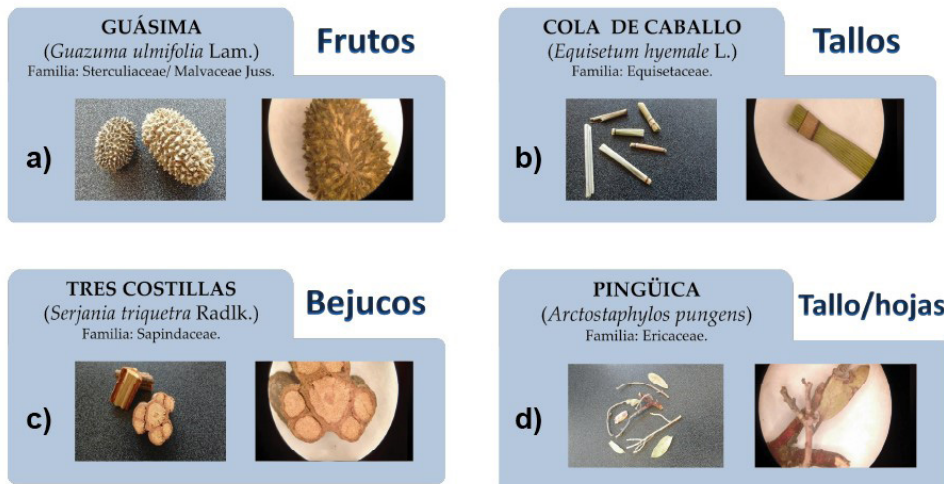
Sólo presenta **envase primario:** Frasco de plástico de tamaño mediano con su respectiva etiqueta, color ámbar, que contiene 2 sellos de seguridad.

Forma farmacéutica: Etiqueta: Cápsulas (400mg). Presentación con 150 cápsulas. Se encontró que el envase contaba con 148 cápsulas con un promedio de 402.7 mg c/u.

Ingredientes marcados en la etiqueta: Flor de peña (*Hieracium fendleri*), Cola de caballo (*Equisetum arvense*), Tres costillas (*Capsella bursa-pastoris*) y Guásima (*Guazuma ulmifolia*). De los cuales tres plantas muestran inconsistencias en cuanto al nombre científico indicado.

Al analizar el MV-i conforme a lo recomendado por el MGA-FH 0040, se identificaron 3 ingredientes reportados en la etiqueta del RH y uno diferente, como se observa en la figura 2, además de encontrar otras 9 plantas que no se pudieron identificar.

Figura 2. Vista en microscopio estereoscópico de las plantas identificadas a) Fruto de guásima, b) Tallo de cola de caballo, c) Bejuco de tres cosillas, d) Tallo y hoja de pingüica.



El control de calidad de las muestras de cápsulas se llevó a cabo por comparación cromatográfica con el extracto obtenido de MV-i utilizado como referencia. Después de probar diferentes fases móviles por CCF, se llegó a la conclusión de que la fase móvil ideal para este remedio herbolario es una mezcla de diclorometano/acetato de etilo en una proporción 9:1 (figura 3).

Figura 3. Cromatoplaqueta comparativa de los extractos de las cápsulas y el MV-i. Izquierda) Cromatoplaqueta observada en lámpara de luz ultravioleta a 254 nm; Centro) Cromatoplaqueta observada en lámpara de luz ultravioleta a 365 nm; Derecha) Cromatoplaqueta revelada con ácido sulfúrico al 10 % a 100 °C. Muestras: A) Cápsulas mes 0; B) Cápsulas mes 1; C) Cápsulas mes 3; D) extracto del MV-i; E) Cápsulas mes 6; F) Cápsulas mes 9; G) Cápsulas mes 12.



Al observar la cromatoplaqueta se puede corroborar la identidad de la muestra en cápsulas al haber comparado con la referencia (MV-i); así como también evidenciar que no se generaron productos de degradación derivados del almacenaje a condiciones críticas (tiempo o temperatura) al obtener en la cromatoplaqueta manchas similares en cuanto a color y ubicación en cada una de las muestras obtenidas por frecuencia de análisis.

5 CONCLUSIONES

Se identificaron los cuatro componentes mayoritarios del MV-i acorde a lo establecido en el MGA-FH 0040 que sirven como referencia para evaluar cualquier producto herbolario comercial. Como ensayo de identidad se propone realizar una cromatografía en capa fina, que, para esta mezcla en específico la fase móvil ideal a utilizar es diclorometano/acetato de etilo en proporción 9:1.

El RH en cápsulas cumple con el ensayo de identidad al no presentar variaciones en los compuestos obtenidos en la CCF bajo las condiciones de temperatura y humedad a lo largo de 12 meses, además de cumplir con los parámetros de estabilidad evaluados.

Con todo lo anterior, se propone así un ensayo de identidad como método de monitoreo de calidad de productos herbolarios que contengan la mezcla de *Guazuma ulmifolia*, *Equisetum hyemale*, *Serjania triquetra* y *Arctostaphylos pungens* conforme a los parámetros establecidos por la FHEUM, así como también para evaluar la estabilidad de productos comerciales a largo plazo conforme a la NOM-073-SSA1-2015.

REFERENCIAS

Agudelo-Botero, M., Valdez-Ortiz, R., Giraldo-Rodríguez, L., González-Robledo, M. C., Mino-León, D., Rosales-Herrera, M. F., ... & Dávila-Cervantes, C. A. (2020). Overview of the burden of chronic kidney disease in Mexico: secondary data analysis based on the Global Burden of Disease Study 2017. *BMJ open*, 10(3), e035285.

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 20(3), 200-216.

Bahmani, M., Baharvand-Ahmadi, B., Tajeddini, P., Rafieian-Kopaei, M., & Naghdi, N. (2016). Identification of medicinal plants for the treatment of kidney and urinary stones. *Journal of renal injury prevention*, 5(3), 129.

Balekundri, A., & Mannur, V. (2020). Quality control of the traditional herbs and herbal products: a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 1-9.

Bateman, J., Chapman, R. D., & Simpson, D. (1998). Possible toxicity of herbal remedies. *Scottish Medical Journal*, 43(1), 7-15.

Bauer, R., & Franz, G. (2010). Modern European monographs for quality control of Chinese herbs. *Planta medica*, 76(17), 2004–2011. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250532>

Bencheikh, N., Elbouzidi, A., Kharchoufa, L., Ouassou, H., Alami Merrouni, I., Mechchate, H., Es-safi, I., Hano, C., Addi, M., Bouhrim, M.; Eto, B. & Elachouri, M. (2021). Inventory of Medicinal Plants Used Traditionally to Manage Kidney Diseases in North-Eastern Morocco: Ethnobotanical Fieldwork and Pharmacological Evidence. *Plants*, 10(9), 1966.

Debjit, B., Pawan, D., Margret, C., & Kumar, K. P. S. (2009). Herbal drug toxicity and safety evaluation of traditional medicines. *Archives of Applied Science Research*, 1(2), 32-56.

- Diario Oficial de la Federación (2016). Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177.
- Food and Drug Administration. (2016). Botanical drug development guidance for industry. *Pharmaceutical Quality/CMC Revision*, 1.
- Goda, Y. (2022). Regulatory science of natural products. *Journal of Natural Medicines*, 1-16.
- Govea-Salas, M., Morlett-Chávez, J., Rodríguez-Herrera, R., & Ascacio-Valdés, J. (2017). Chapter 10: Some Mexican Plants Used in Traditional Medicine. En (Ed.), *Aromatic and Medicinal Plants-Back to Nature*, 191-200. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66637>
- Heinrich, M., Jalil, B., Abdel-Tawab, M., Echeverria, J., Kulić, Ž., McGaw, L. J., ... & Wang, J. B. (2022). Best Practice in the chemical characterisation of extracts used in pharmacological and toxicological research – The ConPhyMP – Guidelines. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 953205.
- Heydari, M., Rauf, A., Thiruvengadam, M., & Chen, X. (2022). Editorial: Clinical safety of natural products, an evidence-based approach. *Front. Pharmacol.* 13:960556. doi: 10.3389/fphar.2022.960556
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2019). Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica GPC-IMSS-335-19. México. Consultado el 13 de enero de 2023 en: <https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/335GER.pdf>
- Khan, M. A., Kassianos, A. J., Hoy, W. E., Alam, A. K., Healy, H. G., & Gobe, G. C. (2022). Promoting Plant-Based Therapies for Chronic Kidney Disease. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 27, 2515690X221079688.
- Lippert, A., & Renner, B. (2022). Herb–Drug Interaction in Inflammatory Diseases: Review of Phytomedicine and Herbal Supplements. *Journal of Clinical Medicine*, 11(6), 1567.
- Luan, F., Wu, Q., Yang, Y., Lv, H., Liu, D., Gan, Z., & Zeng, N. (2020). Traditional uses, chemical constituents, biological properties, clinical settings, and toxicities of *Abelmoschus manihot* L.: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1068.
- Miguel-Hernández, M., Romero-Quechol, G. M., & Cruz-Ojeda, G. A. (2020). Empoderamiento del paciente con insuficiencia renal crónica en el cuidado de la diálisis peritoneal en un hospital de segundo nivel. *Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 27(3), 146-153.
- Muyumba, N. W., Mutombo, S. C., Sheridan, H., Nachtergaeel, A., & Duez, P. (2021). Quality control of herbal drugs and preparations: The methods of analysis, their relevance and applications. *Talanta Open*, 4, 100070.
- Palhares, R. M., Gonçalves Drummond, M., dos Santos Alves Figueiredo Brasil, B., Pereira Cosenza, G., das Graças Lins Brandão, M., & Oliveira, G. (2015). Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PLoS one*, 10(5), e0127866.
- Rivera-Mondragón, A., Ortíz, O. O., Bijttebier, S., Vlietinck, A., Apers, S., Pieters, L., & Caballero-George, C. (2017). Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1500–1512. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1307421>

Sánchez, M., González-Burgos, E., Iglesias, I., Lozano, R., & Gómez-Serranillos, M. P. (2020). Current uses and knowledge of medicinal plants in the Autonomous Community of Madrid (Spain): A descriptive cross-sectional study. *BMC complementary medicine and therapies*, 20(1), 1-13.

Sansores-España, D., Pech-Aguilar, A. G., Cua-Pech, K. G., Medina-Vera, I., Guevara-Cruz, M., Gutiérrez-Solis, A. L., Reyes-García, J. G. & Avila-Nava, A. (2022). Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Management of Urolithiasis: A Review of Preclinical Evidence, Bioactive Compounds, and Molecular Mechanisms. *Molecules*, 27(6), 2008.

Schieppati, A., & Remuzzi, G. (2005). Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications. *Kidney International*, 68, S7-S10.

Secretaría de Salud (2021). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. 3ra edición.

Senanayake, S., Gunawardena, N., Palihawadana, P., Bandara, P., Haniffa, R., Karunarathna, R., & Kumara, P. (2017). Symptom burden in chronic kidney disease; a population based cross sectional study. *BMC nephrology*, 18(1), 1-8.

Senanayake, S., Gunawardena, N., Palihawadana, P., Suraweera, C., Karunarathna, R., & Kumara, P. (2018). Depression and psychological distress in patients with chronic renal failure: Prevalence and associated factors in a rural district in Sri Lanka. *Journal of psychosomatic research*, 112, 25-31.

Sofowora, A., Ogunbodede, E., & Onayade, A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 10(5), 210-229.

Stavrianidi A. (2020). A classification of liquid chromatography mass spectrometry techniques for evaluation of chemical composition and quality control of traditional medicines. *Journal of chromatography. A*, 1609, 460501. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460501>

World Health Organization (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. World Health Organization.

World Health Organization (2007). *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues*. World Health Organization.

World Health Organization (2013). *WHO Strategy for Traditional Medicine 2014-2023*. Geneva: WHO.

Yang, B., Xie, Y., Guo, M., Rosner, MH, Yang, H. y Ronco, C. (2018). Nefrototoxicidad y fitoterapia china. *Revista clínica de la Sociedad Americana de Nefrología: CJASN*, 13 (10), 1605.

Zhang, S. Q., Jin, H. T., Wei, F., & Ma, X. (2016). *Quality control and safety evaluation of natural products*.

Zhao, Y. Y., Zhang, S. Q., Wei, F., Fan, Y. M., Sun, F., & Bai, S. (2014). Quality control of natural product medicine and nutrient supplements 2014. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2014.

CAPÍTULO 9

PRESENCIA DEL SUGARCANE YELLOW LEAF VIRUS EN *Saccharum* SPP. EN MÉXICO Y FILOGENIA DE UN AISLADO DE COLIMA¹

Data de submissão: 11/01/2023

Data de aceite: 30/01/2023

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y
Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Tecomán
Laboratorio de Biotecnología
Tecomán, Colima, México
ORCID: 0000-0003-1949-1922

María Inés Barbosa Villa

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y
Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Tecomán
Laboratorio de Biotecnología
Tecomán, Colima, México
ORCID: 0000-0002-2453-4600

Karina de la Paz García Mariscal

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y
Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Tecomán
Laboratorio de Bioetanol
Tecomán, Colima, México
ORCID: 0000-0001-6149-3505

Claudia Yared Michel López

Universidad Autónoma de
Baja California (UABC)
Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA)
Ejido Nuevo León, Mexicali
Baja California, México
ORCID: 0000-0002-3595-1768

RESUMEN: La caña de azúcar es uno de los cultivos industriales más importantes a nivel mundial y es afectado por diversas enfermedades virales, incluido el Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV). En México este virus se ha detectado basado en sintomatología y °Brix; sin embargo, el diagnóstico basado en estos parámetros no es concluyente. El objetivo del estudio fue detectar la presencia y distribución del SCYLV en zonas cañeras del Occidente de México (Colima, Jalisco y Nayarit) y determinar el origen filogenético de un aislado de Colima. El trabajo se desarrolló en el Campo Experimental Tecomán durante 2013-2014. Se aisló el RNA total a partir de hojas colectadas y se realizaron las RT-PCR con oligonucleótidos específicos para SCYLV. En total se analizaron 233 muestras y la incidencia de plantas portadoras del SCYLV fue de 14.6%, afectando principalmente a los híbridos CP72-2086, Mex 69-290 y Atemex 96-40. El análisis BLAST mostró que la secuencia parcial CP de Colmex-317 (512 pb) es homóloga con secuencias de Brasil, China, India, Kenia y USA y además comparte porcentajes

¹ Esta información corresponde a un trabajo publicado previamente en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas y fue generada con el proyecto de investigación regional "Diagnóstico molecular de enfermedades en caña de azúcar" financiado por recursos fiscales del INIFAP.

de identidad superiores a 99% con otras secuencias provenientes de varios países. El análisis filogenético de Colmex-317 con secuencias parciales y genomas completos del SCYLV aislados de diversas partes del mundo reveló que el aislado mexicano pertenece al genotipo de Brasil (BRA) y se agrupó con secuencias de Brasil, China, Kenia y Sudáfrica. Sin embargo, es necesario evaluar un mayor número de aislados y secuencias de mayor longitud para determinar si el genotipo BRA es el único presente en México.

PALABRAS CLAVE: SCYLV. RNA. RT-PCR. *Saccharum* spp.

PRESENCE OF SUGARCANE YELLOW LEAF VIRUS IN SACCHARUM SPP. IN MEXICO AND PHYLOGENY OF AN ISOLATE OF COLIMA

ABSTRACT: Sugarcane is one of the most important industrial crops worldwide and is affected by different viral diseases, including *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). In Mexico this virus has been detected based on symptomatology and °Brix; however, the diagnosis based on these parameters is not conclusive. The objective of this work was detect the presence and distribution of SCYLV in sugarcane crops of western Mexico (Colima, Jalisco and Nayarit) and determine its phylogenetic origin of an isolate of Colima. This work was developed in the Campo Experimental Tecomán during 2013-2014. The total RNA was isolated from collected leaves and the presence of SCYLV was detected by RT-PCR using a pair of specific primers. In total, 233 samples were analyzed and the incidence of SCYLV in sugarcane plants was 14.6%, mainly affecting CP 72-2086, Mex 69-290 and Atemex 96-40 hybrids. The BLAST analysis showed that the partial CP sequence of Colmex-317 (512 bp) is homologous with sequences from Brazil, China, India, Kenya and USA and also shares identity percentages over 99% with other sequences from several countries. The phylogenetic analysis of Colmex-317 with partial sequences and complete genomes of SCYLV isolated from different parts of the world revealed that the Mexican isolate corresponds to the Brazil (BRA) genotype and formed a cluster with sequences from Brazil, China, Kenya and South Africa. However, it is necessary to evaluate a larger number of isolates and longer sequences to determine if the BRA genotype is the only one present in Mexico.

KEYWORDS: SCYLV. RNA. RT-PCR. *Saccharum* spp.

1 INTRODUCCIÓN

Los virus ocasionan las enfermedades más importantes en caña de azúcar a nivel mundial, causando grandes epidemias y pérdidas de enormes proporciones. Entre los patógenos virales de importancia económica a nivel mundial para el cultivo de la caña de azúcar se encuentran el *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV), agente causal del síndrome de la hoja amarilla (YLS). El SCYLV pertenece a la familia Luteoviridae, en la cual se ubican aquellos virus que ocasionan síntomas de amarillamiento en las plantas hospederas que infectan, incluida la caña de azúcar (Rott *et al.*, 2008). El síntoma característico ocasionado por el SCYLV en caña de azúcar es un amarillamiento intenso en la nervadura central de las hojas infectadas, el cual varía según la variedad y factores ambientales (Lockhart

y Cronjé, 2000). En variedades afectadas por SCYLV se han reportado pérdidas en rendimiento de 40-50% (Vega *et al.*, 1997), mientras que en plantas asintomáticas con este mismo virus las mermas son de 10-30% (Lehrer y Komor, 2008; Lehrer *et al.*, 2010). Por lo anterior, este virus es considerado en los programas de mejoramiento genético de varios países cañeros, principalmente Brasil, en los que la selección y eliminación de clones susceptibles seguido de pruebas de patogenicidad se han vuelto procedimientos rutinarios (Gonçalves *et al.*, 2012).

El SCYLV fue detectado por primera vez en Hawaii en el año de 1988 y en Brasil en 1990 (Vega *et al.*, 1997; Schenck *et al.*, 2001). Este virus se ha reportado en las áreas productoras de caña de azúcar en varios países. El SCYLV fue responsable de drásticas pérdidas económicas en el sureste de Brasil a comienzos de 1990 y actualmente, es el principal problema fitosanitario en los programas de mejoramiento genético de ese país (Gonçalves *et al.*, 2012). En México, los síntomas del YLS fueron observados por primera vez en el año de 1996 afectando a la variedad CP 72-2086 en la comunidad de La Margarita, Oaxaca. Ese mismo año se reportó su presencia en la misma variedad en Chiapas, Colima y Veracruz. También se detectó en Sinaloa afectando a la variedad Mex 57-473 (Flores, 1997). Sin embargo, el diagnóstico de la enfermedad realizado en México se ha basado en sintomatología típica de la enfermedad asociada a YLS y °Brix del raquis de la hoja. Lo anterior no es concluyente debido a que el amarillamiento es un síntoma muy general de varias enfermedades y deficiencias de micro y macronutrientes, además de que el patrón de coloración depende de variables como el genotipo y condiciones ambientales (Lockhart y Cronjé, 2000). Por otra parte, los niveles del porcentaje de los °Brix también se ven afectados (aumentando o disminuyendo) por acción de algunas enfermedades (Vasconcelos *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2012), al igual que por elementos químicos como el potasio (K), el cual tiene una función clave en la síntesis de azúcares y su translocación en los tallos de caña de azúcar, incrementando así los niveles de Pol y °Brix (Aucatoma *et al.*, 2015). Por lo anterior, no resulta confiable emitir diagnósticos basados en estos parámetros. Los métodos de detección de SCYLV más utilizados y fiables están basados en la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) y son los más utilizados en la actualidad por los programas de mejoramiento genético de la caña de azúcar en varias partes del mundo (Xie *et al.*, 2009; Joomun y Dookun, 2010; Aday *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015).

Con respecto al origen filogenético del SCYLV, a la fecha se han determinado 10 grupos genéticos diferentes: BRA (Brasil), CHN1, CHN2, CHN3 (China), COL (Colombia), CUB (Cuba), HAW (Hawái), IND (India), PER (Perú) y REU (Reunión) basados en el análisis de la diversidad genética de su genoma utilizando secuencias parciales y genomas

completos (Moonan y Mirkov, 2002; Abu Ahmad *et al.*, 2006; EISayed *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Chinnaraja *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2015). La diversidad genética de las poblaciones del SCYLV sugieren la existencia de grandes variaciones entre los aislados del virus, las cuales pueden afectar el grado de virulencia, transmisión y gravedad de los síntomas asociados con SCYLV. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia y distribución del SCYLV en zonas cañeras del Occidente de México (Colima, Jalisco y Nayarit) y determinar el origen filogenético de un aislado mexicano.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Se colectaron muestras foliares de diversas variedades de caña de azúcar sembradas comercialmente en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit durante los años 2013-2014. Las plantas presentaron sintomatología típica de YLS o fueron asintomáticas. Las muestras se envolvieron en bolsas plásticas y éstas en hieleras con refrigerantes térmicos para trasladarlas al laboratorio de biotecnología de plantas del Campo Experimental Tecomán del INIFAP ubicado en el km 35 de la carretera Colima-Manzanillo en Colima.

2.2 PURIFICACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA PUREZA E INTEGRIDAD DEL RNA

Aproximadamente 200 mg de tejido foliar fueron pulverizados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se depositó en tubos de 1.5 mL previamente enfriados en N₂ líquido y se homogeneizaron con 500 µL de Tripure (Roche). Se siguieron las recomendaciones del fabricante para la extracción del RNA total. Finalmente, el RNA obtenido fue resuspendido en agua libre de RNasa (0.01% DEPC) y almacenado a -70°C. La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) utilizando 1 µL del RNA total extraído y se midieron las relaciones de A_{260/280} y A_{230/280} para determinar su pureza. La integridad del RNA fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X y teñido con bromuro de etidio (BrEt) y visualizado en un transiluminador con luz ultravioleta (UVP).

2.3 CONTROL POSITIVO Y DETECCIÓN DEL SCYLV POR RT-PCR

La reacción de transcripción inversa (RT) del RNA total se realizó utilizando el kit “Reverse Transcription System” (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Los cDNA resultantes fueron utilizados como molde para la amplificación por PCR con el juego de oligonucleótidos SCYLV-F/SCYLV-R descritos por Xie *et al.* (2009). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL, conteniendo 12.5 µL de REDTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH), 1 µM de cada oligonucleótido, 3 µL de cDNA y H₂O grado molecular. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Labnet) con el siguiente programa: un ciclo de 50°C por 30 min y 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 1 min, seguido de una extensión final a 72°C por 5 min. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1 X y fueron cargados 12.5 µL de los productos de PCR; las muestras se corrieron con un voltaje de 120 V. Finalmente los geles se tiñeron con BrEt y se visualizaron en un transiluminador con luz UV (UVP) para el análisis de los resultados. Con el objetivo de contar con un control positivo para la detección del virus, el producto de PCR de 512 pb correspondiente a una muestra de una localidad de Tecomán, Colima fue purificada a partir del gel de agarosa con el kit “QIAquick Gel Extraction” (QIAGEN). El fragmento se clonó con el sistema “pGEM-T Easy” (Promega) y se transformó en células de *E. coli* JM109 (Promega), las cuales se hicieron competentes previamente con CaCl₂ de acuerdo a Riley *et al.* (2008). La comprobación del inserto clonado en el vector se realizó mediante PCR y análisis restrictivo. La extracción de DNA plasmídico de las colonias recombinantes que se utilizó como molde para la PCR se llevó a cabo de acuerdo a Engebrecht *et al.* (2001), mientras que para la reacción de digestión se utilizaron las enzimas de restricción *EcoR* I y *Not* I.

2.3 SECUENCIACIÓN, EDICIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA

El DNA plasmídico del fragmento clonado en *E. coli* fue secuenciado en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer en ambas direcciones por el método de terminación con el Big Dye (Applied Biosystems). La edición y el ensamblado de las secuencias “forward” y “reverse” se realizó con el programa CLC Main Workbench 7.0.3 (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>). Finalmente, se comparó la similitud de las secuencias obtenidas contra las reportadas para SCYLV en la base de datos del “National Center for Biotechnology information” (NCBI) empleando la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST). La secuencia fue depositada en la base de datos del NCBI.

2.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los análisis bioinformáticos se realizaron con el software CLC Main Workbench versión 7.0.3. Se llevó a cabo el análisis BLAST en NCBI con la secuencia del SCYLV

denominada ColMex-317 (NCBI: KT334298.1). Se seleccionaron y descargaron secuencias completas con los mayores porcentajes de identidad con ColMex-317 y se emplearon otras más de la misma base de datos con distintos orígenes geográficos (Cuadro 2). Posteriormente fue utilizada la herramienta de alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo MUSCLE y para la construcción del árbol filogenético se usó el método de máxima verosimilitud y UPGMA (Edgar, 2004). Se realizó un modelo de prueba para determinar el modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para los datos y se seleccionó Kimura 80. El análisis bootstrap consistió de 1,000 réplicas y se agregó como grupo externo la región CP del PRSV (NCBI: AJ012650.1). Finalmente, el árbol filogenético fue editado con el software TreeGraph 2.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El síntoma característico de amarillamiento intenso en la nervadura central de hojas de caña de azúcar, asociado con la presencia del SCYLV, se encontró en la mayor parte de muestras positivas al virus (Figura 1).

Figura 1. **Síntomas del síndrome de la hoja amarilla (YLS) en plantas de caña de azúcar.** Se observa sintomatología característica de amarillamiento intenso en nervaduras centrales asociados al SCYLV.

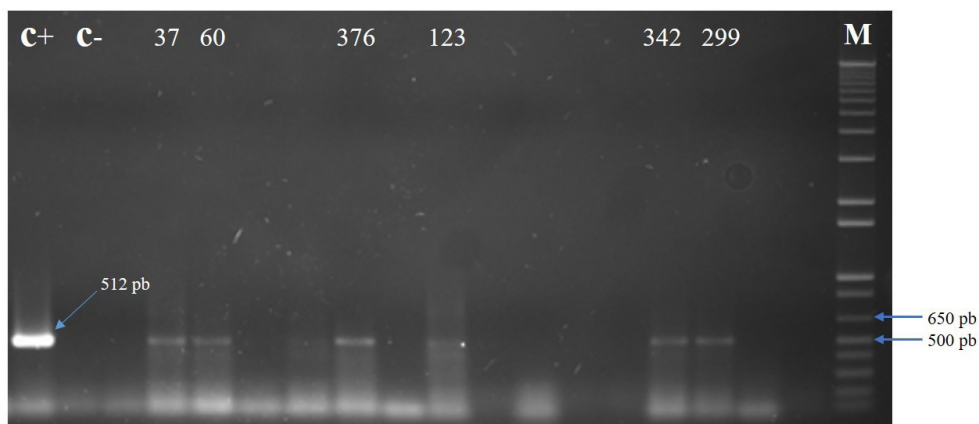


Sin embargo, algunas muestras con síntomas severos, similares a los mostrados en la Figura 1, resultaron negativas a SCYLV por RT-PCR, coincidiendo con lo reportado por Wang *et al.* (2012), quienes obtuvieron 129/634 muestras positivas al SCYLV, de las cuales 96 y 33 fueron de plantas sintomáticas y asintomáticas, respectivamente. Lo anterior sugiere que la infección con el virus solamente tiene cierto grado de asociación con los síntomas de amarillamiento en campo, ya que dicho síntoma es muy general para varias enfermedades de origen viral que afectan a plantas.

En caña de azúcar, las deficiencias de micro y macronutrientes generan síntomas de amarillamiento (McCray *et al.*, 2006), y podrían ser similares a los causados por el SCYLV. Además, el patrón de coloración también depende de variables como el genotipo y

condiciones ambientales (Lockhart y Cronjé, 2000). Por otra parte, la detección temprana del SCYLV en híbridos de *Saccharum* spp. es posible, mediante técnicas moleculares, debido a que puede haber niveles detectables del virus en etapas asintomáticas (Viswanathan *et al.*, 2009). En este estudio los productos de RT-PCR sometidos a electroforesis en gel de agarosa que mostraron la amplificación de fragmentos de ~512 pb del SCYLV fueron considerados como positivos al virus (Figura 2).

Figura 2. **Detección del *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) mediante RT-PCR en muestras de caña de azúcar procedentes de tres estados del Pacífico mexicano.** C+: control positivo. C-: Control negativo. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen). Los números corresponden a diferentes muestras positivas al virus.



De las 233 muestras foliares analizadas, 34 fueron positivas al virus, lo que representa una incidencia de 14.6%. El SCYLV se presentó en los tres estados del Pacífico de México que abarcó el presente estudio (Cuadro 1). En Colima, se detectó afectando principalmente la variedad CP 72-2086 en el municipio de Tecomán, mientras que, en Jalisco, el virus se detectó en Autlán, El Grullo, La Huerta, Cuautitlán y Zapotiltic, afectando a las variedades Mex 79-431, Mex 69-290 y Colmex 95-27. Finalmente, en Nayarit la zona de estudio comprendió los municipios de Jala, Santa María del Oro, Tepic y Xalisco, donde el SCYLV se encontró afectando las variedades Mex 69-290 y CP 89-2143. Este es el primer reporte basado en métodos moleculares para la detección del SCYLV en cultivos de caña de azúcar comerciales en México.

Cuadro 1. Relación de muestras de caña de azúcar positivas al SCYLV mediante RT-PCR en la región cañera del Occidente de México.

No.	Muestra	Estado	Municipio	Georeferencia	Variedad
1	347	*	*	*	<i>Saccharum</i> spp.
2	346	*	*	*	Colmex 95-27
3	2	Colima	Tecomán	N 18°56'06.52" W 104°00'03.54"	<i>Saccharum</i> spp.
4	37	Colima	Tecomán	N 18°48'33.23" W 103°50'37.89"	Mex 69-290

No.	Muestra	Estado	Municipio	Georeferencia	Variedad
5	148	Colima	Tecomán	N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
6	336	Colima	Tecomán	N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
7	27	Colima	Tecomán	N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
8	58	Colima	Tecomán	N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
9	60	Colima	Tecomán	N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
10	318	Colima	Tecomán	N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
11	325	Colima	Tecomán	N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
12	380	Colima	Tecomán	N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
13	409	Colima	Tecomán	N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
14	312	Colima	Tecomán	*	<i>Saccharum</i> spp.
15	317	Colima	Tecomán	N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
16	376	Colima	Tecomán	N 18°58.455' W 103°51.285'	CP 72-2086
17	401	Colima	Tecomán	N 18°57'47.88" W 103°50'15.24"	<i>Saccharum</i> spp.
18	405	Colima	Tecomán	N 18°57'47.88" W 103°50'15.24"	<i>Saccharum</i> spp.
19	123	Jalisco	Zapotiltic	N 19°38'42.58" W 103°24'31"	Atemex 9640
20	138	Jalisco	Zapotiltic	N 19°38'42.58" W 103°24'31"	Atemex 9640
21	340	Jalisco	La Huerta	N 19°31'07.39" W 104°32'11.61"	Atemex 96-40
22	342	Jalisco	Cuautitlán	N 19°26'49.58" W 104°24'10.45"	<i>Saccharum</i> spp.
23	344	Jalisco	Cuautitlán	N 19°26'54.74" W 104°23'40.70"	Mex 79-431
24	349	Jalisco	El Grullo	N 19°47'44.20" W 104°13'38.63"	Atemex 96-40
25	248	Jalisco	Zapotiltic	N 19°38'42.58" W 103°24'31"	Atemex 9640
26	281	Jalisco	*	*	Atemex 96-40
27	348	Jalisco	Autlán	*	Mex 69-290
28	217	Nayarit	Jala	N 21°05'08.59 W 104°25'56.82"	Mex 69-290
29	299	Nayarit	Santa María del Oro	N 21°20'23.8" W 104° 34'55.1"	Mex 69-290
30	169	Nayarit	Xalisco	N 21° 27'50.1" W 104° 53'11.4"	<i>Saccharum</i> spp.
31	176	Nayarit	Tepic	N 21° 27'17.7" W 104° 49'09.2"	<i>Saccharum</i> spp.
32	191	Nayarit	Santa María del Oro	N 21° 15'33.4" W 104° 29'54.3"	<i>Saccharum</i> spp.
33	192	Nayarit	Santa María del Oro	N 21° 15'33.4" W 104° 29'54.3"	<i>Saccharum</i> spp.
34	306	Nayarit	*	*	CP 89-2143

*Ausencia de información

En Cuba se determinó la distribución del SCYLV en diferentes provincias. Se analizaron 525 muestras de 35 zonas (348 ha), el virus se detectó por inmunopresión de tejidos y RT-PCR; en la mayoría de las zonas muestreadas fue alta la incidencia de síntomas asociados a esta enfermedad (82.29%) (Aday *et al.* 2014). En China, Gao *et al.* (2012), evaluaron la distribución del virus en las principales provincias de ese país sembradas con caña de azúcar en 22 híbridos de *Saccharum* spp. que mostraron síntomas

de YLS utilizando técnicas moleculares (RT-PCR, qRT-PCR) y serológicas (TBIA y DAC-ELISA). De las 22 muestras analizadas 19 fueron positivas al virus por RT-PCR, TBIA y/o DAC-ELISA, mientras que con la técnica de qRT-PCR todas las muestras resultaron positivas, lo que demuestra la elevada sensibilidad de la qRT-PCR en comparación con la RT-PCR y técnicas serológicas para detectar patógenos. En otro estudio Wang *et al.* (2012) analizaron muestras de caña de azúcar de la parte sur de China para detectar presencia del SCYLV. Los productos esperados de 1.3 kb fueron amplificados en 129/634 (20.3%) individuos por RT-PCR y el virus estuvo presente en 6 provincias. Finalmente, también en China, se analizaron 332 muestras foliares para detectar al virus por RT-PCR y se observó una incidencia de 24 -38%, dependiendo del área geográfica (Lin *et al.*, 2015). Estos trabajos evidencian que el SCYLV se ha detectado principalmente por técnicas moleculares, no solamente en China y Cuba como se describió, sino en diversos países del mundo como Argentina, Brasil, India y Kenia (Scagliusi *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2015; Amata *et al.*, 2016). La amplia distribución del SCYLV en distintas zonas cañeras del planeta se puede deber a la forma de reproducción de la caña de azúcar por semilla estaca, donde el traslado de germoplasma entre las regiones cañeras de un país a otro, en algunas ocasiones se da de manera descontrolada, transportando la carga patogénica a otras regiones. También la presencia de áfidos vectores constituye otro importante factor para la dispersión de este virus (Figueredo *et al.*, 2004).

En relación con el origen filogenético del aislado mexicano, la secuencia ColMex-317 fue depositada en la base de datos de NCBI con el registro KT334298. Se determinó que la secuencia de 512 pb corresponde a una región parcial del gen de la proteína de la cápside (CP) del SCYLV codificada por el ORF3. El análisis BLAST indicó que la secuencia ColMex-317 de 512 pb es homóloga (100% de identidad) con secuencias reportadas de Brasil, China, India, Kenia y USA, y comparte un elevado porcentaje de identidad con otras secuencias de diversos orígenes geográficos. Los resultados del análisis filogenético realizado con el fragmento ColMex-317 y otras secuencias del SCYLV (Cuadro 2) con las que comparte 96.29-100% de identidad se muestran en la Figura 3. Se observa la formación de cinco grupos, en los que se distinguen siete de los diez genotipos reportados para SCYLV: HAW, PER, BRA, REU, COL, CHN1 y CHN2 (Moonan y Mirkov, 2002; Abu Ahmad *et al.*, 2006; ElSayed *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Chinnaraja *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2015). No se consideraron secuencias de Cuba, India y CHN3. ElSayed *et al.* (2011) reportaron la formación de tres grupos principales: BRA, HAW-PER y REU utilizando diversos árboles filogenéticos construidos con fragmentos de distintas longitudes y genomas completos.

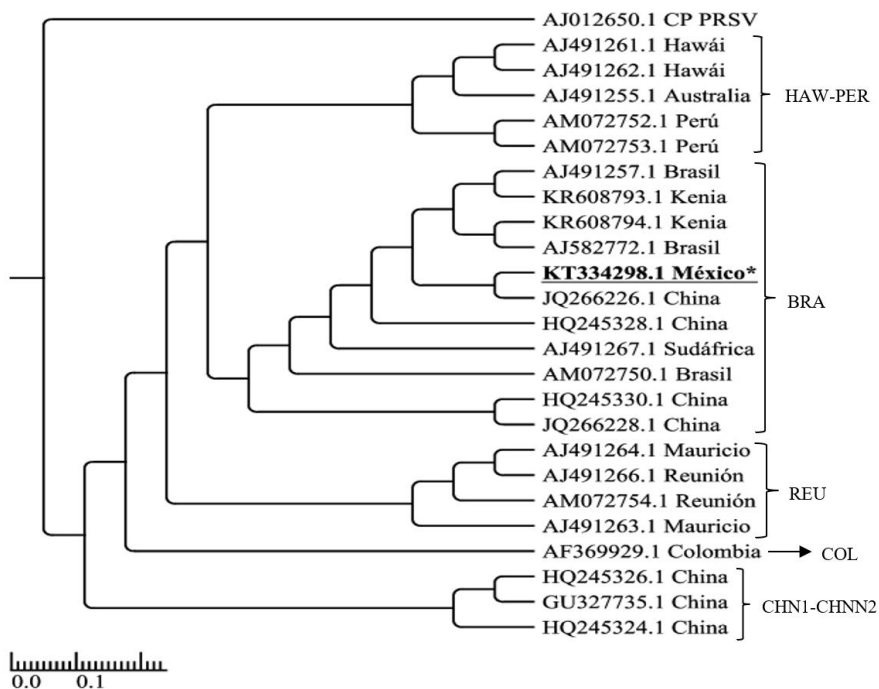
Cuadro 2. **Secuencias parciales y completas de los ORF y genomas completos del SCYLV obtenidas de la base de datos de NCBI y utilizadas en este estudio para el análisis filogenético.** Se incluye la secuencia CP del PRSV como grupo externo.

Nombre del aislado	Híbrido	Origen geográfico	Acceso NCBI	Tamaño de fragmento (pb)	Porción del genoma
Aus1	VMC71-238	Australia	AJ491255.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
BRA1	<i>Saccharum</i> spp.	Brasil	AJ582772.1	555	ORF3 y ORF4 parciales
BRA-YL1	SP71-6163	Brasil	AM072750.1	5,612	Genoma completo
Braz1	SP77-5181	Brasil	AJ491257.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
chn1	CP93-1309	China	GU327735.1	5,803	Genoma completo
CHN-FJ4	FN02-3924	China	JQ266226.1	2,915	ORF1, ORF2 y ORF5 parciales ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD3	YT86-368	China	JQ266228.1	2,876	ORF1, ORF2 y ORF5 parciales ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD-GZ10-1	CP93-1634	China	HQ245324.1	1,284	ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD-GZ10-3	CP93-1634	China	HQ245326.1	1,284	ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD-ZC1	<i>Saccharum</i> spp.	China	HQ245328.1	1,284	ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD-ZJ1-2	<i>Saccharum</i> spp.	China	HQ245330.1	1,284	ORF3 y OFR4 completos
ColMex-317	CP 72-2086	México, Colima	KT334298.1	512	ORF3 parcial
Haw1	H78-3606	USA, Hawái	AJ491261.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
Haw2	H87-4094	USA, Hawái	AJ491262.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
J55/487	<i>Saccharum</i> spp.	Kenia, Kilifi	KR608794.1	996	ORF3 completo
Kampala	<i>Saccharum</i> spp.	Kenia, Kilifi	KR608793.1	996	ORF3 completo
Maur1	M1658-78	Mauricio	AJ491263.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
Maur2	M2350-79	Mauricio	AJ491264.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
PER-YL1a	H50-7209	Perú	AM072752.1	5,612	Genoma completo
PER-YL1b	H50-7209	Perú	AM072753.1	5,612	Genoma completo

Nombre del aislado	Híbrido	Origen geográfico	Acceso NCBI	Tamaño de fragmento (pb)	Porción del genoma
Reun2	R85-1102	Reunión	AJ491266.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
REU-YL1a	R570	Reunión	AM072754.1	5,612	Genoma completo
SA1	N30	Sudáfrica	AJ491267.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
SCYLV-C4	CC84-75	Colombia	AF369929.1	2,832	ORF1, ORF2 y ORF5 parciales ORF3 y ORF4 completos
ChT-11	NA	México	AJ012650.1	924	Gen CP del PRSV

En otro estudio Chinnaraja *et al.* (2013) obtuvieron agrupaciones similares, además de otros clústeres correspondientes a otros genotipos reportados para SCYLV. En este estudio se obtuvo la misma tendencia de formación de tres clústeres principales antes mencionados, además de otros dos grupos donde se ubicaron el aislado de Colombia y en otro grupo secuencias de origen chino (Figura 3).

Figura 3. Árbol filogenético basado en el método UPGMA y máxima verosimilitud utilizando secuencias parciales y genomas completos del SCYLV. Se utilizó como grupo externo la secuencia CP del PRSV (*Papaya ringspot virus*) y se realizó análisis bootstrap con 1000 réplicas. Con un asterisco se resalta el aislado mexicano de este estudio. Genotipos HAW-PER: Hawái-Perú, BRA: Brasil, REU: Reunión, COL: Colombia y CHN: China.



Las variaciones genéticas entre los alineamientos de las secuencias que conformaron el árbol filogenético fueron de 0-18 nucleótidos, siendo las más diversas las secuencias de los genotipos CHN1 y CHN2, las cuales compartieron con la secuencia ColMex317 (KT334298.1) porcentajes de identidad de 96.29, 96.68 y 98.63% para CHN1 (HQ245326.1), CHN1 (GU327735.1) y CHN2 (HQ245324.1), respectivamente. El resto de las secuencias tuvieron porcentajes de identidad elevados con ColMex317, superiores al 99%. La secuencia de origen mexicano se agrupó con secuencias de Brasil, China, Kenia y Sudáfrica, por lo que probablemente su origen sea brasileño debido a que todas las secuencias de este grupo corresponden al genotipo BRA, sin embargo, es necesario analizar un mayor número de secuencias y de mayor longitud nucleotídica.

Varios autores han reportado un grupo exclusivo para cepas de Reunión (genotipo REU) (Wang *et al.*, 2012; Chinnaraja *et al.* 2013; Amata *et al.*, 2016; ElSayed *et al.*, 2018). En este estudio secuencias de Reunión y Mauricio fueron agrupadas en un clúster, donde los dos aislamientos REU que resultaron homólogos entre sí compartieron 99.41 y 99.61% de identidad con dos secuencias de Mauricio: AJ491264.1 y AJ491263.1, respectivamente. Sin embargo, dada la poca variabilidad genética y la cercanía geográfica de estas dos islas (Reunión y Mauricio) podría tratarse del mismo genotipo REU. La mayor cantidad de secuencias que consideró este trabajo correspondieron al genotipo BRA del SCYLV, que es el más abundante según se observa en reportes previos (Wang *et al.*, 2012; Chinnaraja *et al.* 2013; Amata *et al.*, 2016).

En China el análisis filogenético de 141 secuencias procedentes de diversas partes de ese país y el mundo mostró que todos los aislados de SCYLV se agruparon en 8 genotipos, de estos, 107 aislados de China se clasificaron en tres genotipos (BRA, HAW, CHN3), donde el genotipo BRA fue el más prevaleciente y fue detectado en todas las zonas muestreadas (102/107) (Lin *et al.*, 2015). En Mauricio, África, se identificó al SCYLV y se determinaron sus variantes genéticas. El genotipo REU se detectó en 10 variedades, mientras que otras 4 presentaron la variante genética BRA-PER. Fue detectada una infección mixta de los genotipos CUB y REU en la variedad Co6304, mientras que la Q88 estuvo coinfectada por genotipos BRA-PER y REU (Joomun y Dookun, 2010). En estos trabajos se utilizaron oligonucleótidos específicos para discriminar entre variantes genéticas de los aislamientos del SCYLV; sin embargo, en este estudio no se utilizaron estos iniciadores para ese fin. Por lo anterior, hace falta realizar estudios con los oligonucleótidos utilizados en los trabajos descritos anteriormente para determinar las variantes genéticas presentes en nuestro país, tomando en cuenta aislamientos provenientes de las regiones cañeras del sureste de México, que es en donde se concentra la zona cañera más importante. Los resultados de este estudio ayudan a comprender la

distribución de este virus en cultivos de caña de azúcar y dan una primera aproximación del origen filogenético del SCYLV aislado de México.

4 CONCLUSIONES

En los estados de Colima, Jalisco y Nayarit se detectó la presencia del SCYLV, agente causal del síndrome de la hoja amarilla en las principales zonas cañeras de varios municipios. Este virus se encuentra ampliamente distribuido en las zonas cañeras del Occidente de México, probablemente por la propagación por semilla estaca infectada y presencia de áfidos vectores. El análisis filogenético donde se incluyó el aislado mexicano indicó que el virus tiene un origen brasileño y corresponde al genotipo BRA debido a que se agrupó con tres aislados de ese país, entre otros más de diversos orígenes geográficos. En futuros trabajos sobre el SCYLV en México se deben utilizar regiones nucleotídicas de mayor longitud o teniendo en cuenta que el genoma de este virus es relativamente pequeño (5,800 nucleótidos aproximadamente) se pueden emplear genomas completos para obtener más información de su variabilidad genética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu Ahmad, Y.; Royer, M.; Daugrois, J. H.; Costet, L.; Lett, J. M.; Victoria, J. I.; Girard, J. C. and Rott, P. 2006. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. *Plant Disease*. 90(9):1156-1160.

Aday, D. O. C.; O-Hechavarría, M. L. L.; Zardón, N. M. A.; Rodríguez, L. E.; Mesa, L. J. M.; Puchades, I. Y.; Delgado, P. J. y Díaz, M. F. R. 2014. Distribución del *Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar* en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. 29(3):177-184.

Amata, R. L.; Fernandez, E.; Filloux, D.; Martin, D. P.; Rott, P. and Roumagnac, P. 2016. Prevalence of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane producing regions in Kenya revealed by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Plant Disease*. 100(2):260-268.

Aucatoma, G. B.; Castillo, R. O.; Mendoza, J. M. y Garcés, F. O. 2015. Factores que afectan la calidad de la caña de azúcar. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador – CINCAE. Carta informativa CINCAE. 17(1):1-8.

Chinnaraja, C.; Viswanathan, R.; Karuppaiah, R.; Bagyalakshmi, K.; Malathi, P. and Parameswari, B. 2013. Complete genome characterization of *Sugarcane yellow leaf virus* from India: evidence for RNA recombination. *European Journal of Plant Pathology*. 135(2):335-49.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5):1792-1797.

ElSayed, A. I.; Boulila, M.; Odero, D. C. and Komor, E. 2018. Phylogenetic and recombination analysis of sorghum isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Pathology*. 67(1):221-232.

ElSayed, A. I.; Weig, A. and Komor, E. 2011. Molecular characterization of Hawaiian *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes and their phylogenetic relationship to strains from other sugarcane-growing countries. *European Journal of Plant Pathology*. 129(3):399-412.

- Engbrecht, J.; Brent, R. and Kaderbhai, M. A. 2001. Minipreps of Plasmid DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*. 15:ll:1.6:1.6.1-1.6.10.
- Figueredo, L.; Hernández, L. y Linares, B. 2004. Relación epidemiológica entre áfidos (Homoptera: Aphididae) y enfermedades virales en el cultivo caña de azúcar en los valles de los ríos Turbio y Yaracuy, Venezuela. *Caña de azúcar*. 22(01):5-19.
- Filippone, M. P.; Perera, M. F.; Salgado, M.; García, M. G.; Vellicce, G. R. y Castagnaro, A. P. 2010. Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en la Argentina: ajuste metodológico y aplicaciones. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*. 87(2): 01-11.
- Flores Cáceres, S. 1997. Las enfermedades de la caña de azúcar en México. C. Gómez-Núñez (Ed). Córdoba, Veracruz, México. 285 p.
- Gao, S. J.; Lin, Y. H.; Pan, Y. B.; Damaj, M. B.; Wang, Q. N.; Mirkov, T. E. and Chen, R. K. 2012. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Sugarcane yellow leaf virus* isolates from China. *Virus Genes*. 45(2):340-349.
- Gonçalves, M. C.; Pinto, L. R.; Souza, S. C. and Landell, M. G. A. 2012. Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 6(2):108-116.
- Joomun, N. and Dookun, A. S. 2010. Occurrence of three genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus* in variety collection in Mauritius. *Sugar Technology*. 12(3-4):312-316.
- Lehrer, A. T. and Komor, E. 2008. Carbon dioxide assimilation by virus-free sugarcane plants and by plants which were infected by *Sugarcane yellow leaf virus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 73(6):147-153.
- Lehrer, A.; Yan, S. L.; Fontaniella, B.; El-Sayed, A. and Komor, E. 2010. Carbohydrate composition of sugarcane cultivars that are resistant or susceptible to *Sugarcane yellow leaf virus*. *Journal of General Plant Pathology*. 76(1):62-68.
- Lin, Y. H., Wu, X. B.; Liu, Y. H.; Xiao, S. H.; Zhou, G. H.; Chen, R. K.; Fu, H. Y. and Gao, S. J. 2015. Molecular detection, genetic diversity and distribution of *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes in China. *Tropical Plant Pathology*. 40(3):200-207.
- Lockhart, B. E. and Cronjé, C. P. R. 2000. Yellow leaf syndrome. In: *A Guide to Sugarcane Diseases*. pp. 291-295. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft and A. S. Saumtally (Eds). CIRAD Publications Service. Montpellier, France.
- McCray, J. M.; Ezenwa, I. V.; Rice, R. W. and Lang, T. A. 2006. Sugarcane plant nutrient diagnosis. Florida Cooperative Extension Service Pub. SS-AGR-129. <http://edis.ifas.ufl.edu/sc075>.
- Moonan, F. and Mirkov, T. E. 2002. Analyses of the genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*: evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. *Journal of Virology*. 76(3):1339-1348.
- Riley, S. P.; Woodman, M. E. and Stevenson, B. 2008. Culture of *Escherichia coli* and Related Bacteria. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 00:4.2:4.2.1-4.2.25.
- Rott, P.; Mirkov, T. E., Schenck, S. and Girard, J. C. 2008. Recent advances in research on *Sugarcane yellow leaf virus*, the causal agent of sugarcane yellow leaf. *Sugarcane International*. 26(3):18-22.

Scagliusi, S. M.; Basu, S. K.; Gouvea, J. A. and Vega, J. 2009. Comparison of two diagnostic methods for evaluation of *Sugarcane yellow leaf virus* concentration in Brazilian sugarcane cultivars. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 3(1):26-30.

Schenck, S.; Lehrer, A. T. and Wu, K. K. 2001. Yellow leaf syndrome. Hawaii Agriculture Research Center, Pathology Report 68.

Tiwari, A. K.; Vishwakarma, S. K. and Rao, G. P. 2012. Increasing incidence of sugarcane grassy shoot disease in Uttar Pradesh, India and its impact on yield and quality of sugarcane. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2(2):63-67.

Vasconcelos, A. C. M.; Gonçalves, M. C.; Pinto, L. R.; Landell, M. G. A. and Perecin, D. 2009. Effects of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and root system development. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 3(1):31-35.

Vega, J.; Scagliusi, S. M. and Ulian, E. C. 1997. Sugarcane Yellow Leaf Disease in Brazil: Evidence of Association with a Luteovirus. *Plant Disease*. 81(1):21-26.

Viswanathan, R.; Karuppaiah, R.; Malathi, P.; Kumar, V. G. and Chinnaraja, C. 2009. Diagnosis of *Sugarcane yellow leaf virus* in asymptomatic sugarcane by RT-PCR. *Sugar Technology*. 11(4):368-372.

Wang, M. Q.; Xu, D. L.; Li, R. and Zhou, G. H. 2012. Genotype identification and genetic diversity of *Sugarcane yellow leaf virus* in China. *Plant Pathology*. 61:986-993.

Xie, Y.; Wang, M.; Xu, D.; Li, R. and Zhou, G. 2009. Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 162(1-2):64-68.

CAPÍTULO 10

CHARACTERIZATION OF PHENOLOGICAL STAGES AND GRAPE QUALITY OF NINETEEN PORTUGUESE GRAPEVINE VARIETIES PRESENT IN THE DOURO REGION

Data de submissão: 03/01/2023

Data de aceite: 20/01/2023

Rosa Matias⁵

Polytechnic Institute of Leiria
Leiria, Portugal

Ivo Fartouce¹

Research fellow of
INNOVINE&WINE project
University of Trás-os-Montes and
Alto Douro
Vila Real, Portugal

<https://orcid.org/0000-0001-5220-9314>

João Paulo Moura^{2,3}

University of Trás-os-Montes and
Alto Douro
Vila Real, Portugal

Aureliano Malheiro^{1,2}

University of Trás-os-Montes and
Alto Douro
Vila Real, Portugal

Joana Amaral Pinto¹

Research fellow of
INNOVINE&WINE project
University of Trás-os-Montes and
Alto Douro
Vila Real, Portugal

Ana Alexandra Oliveira^{1,2}

University of Trás-os-Montes and
Alto Douro
Vila Real, Portugal

Paula Cristina Oliveira^{2,3}

University of Trás-os-Montes and
Alto Douro
Vila Real, Portugal

Elza Amaral⁴

University of Trás-os-Montes and
Alto Douro
Vila Real, Portugal

ABSTRACT: The present work aimed to evaluate the most suitable grapevine varieties in a specific site of the Douro Region, along two consecutive years characterized by different weather conditions. It was analyzed the mesoclimate in which the grapevine varieties were inserted through bioclimatic indexes. It was determined the Growing Degree Days (GDD) necessary for the occurrence and duration of following periods: from budburst to flowering; flowering; from flowering to veraison; veraison; and from veraison to harvest. For each grapevine variety, the variation of the

¹ Department of Agronomy, School of Agrarian and Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

² Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITAB), University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

³ Engineering department, School of Science and Technology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

⁴ Centre of Mathematics (CMAT-UTAD) 5000-801 Vila Real, Portugal.

⁵ Computer Science and Communication Research Centre (CIIC), DEI ESTG, Polytechnic Institute of Leiria, 2411-901 Leiria, Portugal.

Growing Degree Days in different periods was evaluated and classified as low, medium and high. Grape quality was assessed by the total soluble solids, the total polyphenols, the tannins and the total anthocyanins. The results explored differences between grapevine varieties on the Growing Degree Days along the growing season and also on the grape quality. Grapevine varieties with longer growing seasons, high GDD from veraison to harvest and a progressive maturation may be better adapted to the warming scenarios. Aragonez, Roseira, Tinta Carvalha, Tinta Francisca, Touriga Franca and Touriga Fêmea showed high GDD from veraison to harvest, which highlight their better adaptation to the warmer months, based on observed weather conditions of studied years. Roseira and Tinta Francisca presented the most balanced grape quality parameters, revealing to be suitable minor grapevine varieties in this specific site of the Douro Region, exposed to different weather conditions.

KEYWORDS: Minor grapevine varieties. Bioclimatic indexes. Growing Degree Days. Maturation.

CARACTERIZAÇÃO DOS ESTADOS FENOLÓGICOS E DA QUALIDADE DA UVA DE DEZANOVE CASTAS PORTUGUESAS PRESENTES NA REGIÃO DO DOURO

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar as castas de videira mais adequadas num local específico da Região Demarcada do Douro, ao longo de dois anos consecutivos caracterizados por condições climáticas distintas. Foi analisado o mesoclima em que as castas estavam inseridas através de índices bioclimáticos. Foram determinados os Graus-Dia de crescimento (GDD) necessários para a ocorrência e a duração dos seguintes períodos: do abrolhamento à floração; floração; da floração ao pintor; pintor; e do pintor à vindima. Para cada casta avaliou-se a variação dos GDD em diferentes períodos e classificou-se em baixo, médio e alto. A qualidade da uva foi avaliada pelos sólidos solúveis totais, polifenóis totais, taninos e antocianinas totais. Os resultados exploraram diferenças entre castas nos GDD ao longo do ciclo vegetativo e também na qualidade da uva. As castas com períodos de crescimento mais longos, GDD mais elevados desde o pintor até à vindima e uma maturação progressiva podem adaptar-se melhor a cenários de aquecimento. Aragonez, Roseira, Tinta Carvalha, Tinta Francisca, Touriga Franca e Touriga Fêmea apresentaram GDD elevados desde o pintor até à vindima, o que destaca a sua melhor adaptação aos meses mais quentes, com base nas condições climáticas observadas nos anos estudados. Roseira e Tinta Francisca apresentaram os parâmetros de qualidade da uva mais equilibrados, revelando serem castas minoritárias aptas para este local específico da Região Demarcada do Douro, expostas a diferentes condições climáticas.

PALAVRAS-CHAVE: Castas minoritárias. Índices bioclimáticos. Graus-dia de crescimento. Maturação.

1 INTRODUCTION

Climate variability influences wine grape production, particularly in the Mediterranean region as the Douro Region, Portugal (Dinis *et al.*, 2014). However, global and regional model simulations to Portugal project a scenario of warming, increase of near surface temperature and dramatic changes of all temperature related climate indices.

Impacts are higher in summer and autumn and in the interior of the country (Miranda et al., 2002). Each site has its specific weather conditions which influence the type of wine that can be produced. The specificity of each site is called *terroir*, that is interaction between many factors, including climate, soil, variety and human practices (Van Leeuwen and Seguin, 2006; Van Leeuwen et al. 2004). The maturation time of variety must be adequate to each site weather conditions in such a way that full maturation is reached by the end of the growing season (Van Leeuwen and Seguin, 2006). Within the weather conditions, the temperature have a high importance in the growing season, grapevine yield and grape quality (Barnuud et al., 2014; Malheiro et al., 2013; Santos et al., 2013; Jones, 2012). Timing and duration of each phenological stage are influenced by air temperature and depends on grapevine varieties. The relation between temperature and phenological stages has been supported by several studies (Ramos et al. 2018; Ramos, 2017; Fraga et al., 2016; Fraga et al., 2015; Neumann et al., 2014; Lopes et al., 2008). The monthly maximum temperature that anticipates phenological stages, such as budburst and flowering, have a great influence at the date these events occur (Tomasi et al., 2011). Fraga (2014a) indicated that the Growing Degree Days (GDD) throughout the growing season allow us to identify which varieties are better adapted to a given site and to define which more resistant to long periods of high temperatures. Therefore, varieties with low GDD have more adaptive difficulty to prolonged temperature increases over time. The same author described that varieties such as Touriga Franca and Tinto Cão would better adapt to a temperature increases, while varieties such as Vinhão will have less adaptability (Fraga, 2014a). The grapevine genetic regulation mechanisms, such as gene production and the adaptation mechanisms, such as self-regulation (Fraga et al., 2012; Brito et al., 2004) allows a high resistance to water and thermal stresses (Saleh et al., 2018). Bioclimatic indexes can be used to assess whether the site is suitable for a good grapevine production (Barnuud et al., 2014; Santos et al., 2013; Jones, 2012; Malheiro et al., 2010). The GDD is related to grapevines growth and development, wine production and its quality (Fraga et al., 2016; Neumann et al., 2014). Considering base temperature at 10 °C, GDD values were pointed out for the growing season in the Douro Region, ranges from 1776 to 2241 (Magalhães et al., 1995) and has estimated an increase of 600 by 2070 (Fraga, 2014a). The Huglin Index (HI) is used to evaluate the grapevine thermal needs to complete its phenological stages until maturation. It relates those needs to the thermal characterization of a given site, determining whether it meets the thermal needs of a particular grapevine variety (Jones et al., 2005; Huglin, 1978). Santos et al. (2012) defined a minimum vegetative growth limit of 850 for GDD and 900 for HI. Lacona et al. (2012) verified that anthocyanins concentration decreased when GDD and HI increased, while

tannins concentration increased when GDD and HI increased. The Hydrothermal Index of Branas (IBBL) combines the humidity effect (through precipitation) and temperature during the growing season to evaluate the susceptibility risk for diseases, such as downy mildew (Branas *et al.*, 1946). Lorenzo *et al.* (2012) registered HI values until 2200 and above 2000 for IBBL in Galiza (North of Spain). Same authors verified that when IBBL increased, production and quality decreased. They projected to future scenario a tendency to the increase of GDD and HI as well as the decrease of IBBL (Lorenzo *et al.*, 2012). The Cold night Index (CI) relates to the night minimum temperatures during the last month of maturation stage (Tonietto *et al.*, 2004). Fraga (2014a) reported an increase of night temperatures during the last month of maturation (usually in September), where monthly minimum temperatures can reach to 16 °C by 2070 in Douro Region. During the night, the optimal temperatures for maturation can be reached, having a significant effect in the anthocyanins' synthesis (Kliewer and Torres cited by Martínez de Toda, 2011). The optimal temperature for anthocyanins' synthesis ranges from 17 to 26 °C (Pirie cited Martínez de Toda, 2011; Sadras *et al.*, 2007). Temperatures above 30 °C can damage biosynthetic pathways, promoting the degradation of anthocyanins' components which decreases its concentration (Mori *et al.*, 2007). Temperatures above 35 °C inhibit the anthocyanin synthesis (Magalhães, 2008; Mori *et al.*, 2007; Lopes, 1994). Greer (2017) determined a maximum limit of 30 °C to biomass accumulation in bunches for Semillon grapevine variety. Several countries are currently recovering and characterizing autochthonous varieties, nearly extinct in some cases, as potential producers of quality wines (Loureiro *et al.*, 2017; Milella *et al.*, 2016; Dobrei *et al.*, 2015; Merkouropoulos *et al.*, 2015). For example, Loureiro *et al.* (2017) referred that the prospection, recovery and study of minor grapevine varieties are important to preserve the genetic resources of a region. Additionally, the authors considered that the conservation of the existing varieties can allow to face the new challenges for the viticulture such as future warming scenarios (Loureiro *et al.*, 2017). The present work aimed to evaluate the most suitable grapevine varieties in a specific site of the Douro Region, along two consecutive years characterized by different weather conditions. The GDD needed to reach some growing season periods of 19 grapevine varieties was assessed and related to the grape quality. The vineyard mesoclimate was analysed by several bioclimatic indexes. The GDD values were calculated for the following periods: from budburst to flowering; flowering; from flowering to veraison; veraison; and from veraison to harvest. The variation of GDD in the different growing season periods was evaluated for each grapevine variety and were classified as low, medium and high. The grape quality was measured as total soluble solids, total polyphenols, tannins, and total anthocyanins.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 DESCRIPTION OF THE STUDY SITE AND THE PLANT MATERIAL

Data were collected on a vineyard with a grapevine collection located in Pinhão (41°10'26.28"N, 7°31'47.03"W; 375 m) at Cima-Corgo, Douro Region (Northern Portugal) during two consecutive years (2017 and 2018). The vineyard is exposed to the north (northeast direction). The soil was characterized by silty-loam, low organic matter content (below 1%) and acid pH. The temperature and precipitation values were monitored by an automatic weather station (IMT280, iMETOS, Weiz, Austria) located near the vineyard (41°10'47.36"N, 7°32'05.79"W; 230m). The vineyard was systematized by traditional terraces and grafted in 1940 on *Rupestris du Lot* rootstock. The grapevines, spaced 1 m within and 1.20 m between rows, were pruned to a short 2-bud spurs. The data were obtained from 56 selected grapevines, where 19 red varieties (*Vitis vinifera*) were identified by SSR (simple sequence repeat) markers: Aragonez, Camarate, Casculho, Castelão, Cornifesto, Malvasia Preta, Marufo, Mourisco de Semente, Nevoeira, Roseira, Tinta Carvalha, Tinta da Barca, Tinta Francisca, Tinto Cão, Touriga Fêmea, Touriga Franca, Touriga Nacional, Trincadeira and Vinhão. According to IVV ranking of varieties most planted in Portugal (IVV, 2018), Camarate, Casculho, Cornifesto, Malvasia Preta, Mourisco de Semente, Nevoeira, Roseira, Tinta Carvalha, Tinta da Barca, Tinta Francisca and Touriga Fêmea were considered minor grapevine varieties, since they are not included in the first 20 ranking positions. According to Eiras-Dias *et al.* (2016), minor grapevine varieties are those that were not planted over a long period and consequently are mainly present old vineyards.

2.2 EXPERIMENTAL DESIGN

The experimental design was composed by 56 grapevines selected in vineyard through different ampelographic characteristics and subjected to genetic identification. These 56 grapevines were selected based on the potential of production and quality described by the farmer. The study identified 19 grapevine varieties. All determinations were performed to the 56 grapevines (3 grapevines per variety) and data were treated for each grapevine. The samples to analyse the grape quality had 10 random berries per grapevine. All grapevine varieties were subjected to the same weather and soil conditions. Grapevines were managed without irrigation. Cultural practices and phytosanitary treatments were the same to all grapevines.

2.3 PHENOLOGICAL PERIODS ANALYSED AND BIOCLIMATIC INDEXES CALCULATED

The phenological stages of each grapevine from budburst to harvest were monitored and determined by the visual observation using the Baggiolini scale. Five periods of the growing season were considered: from budburst to flowering (B-I); flowering (I); from flowering to veraison (I-M); veraison (M); and from veraison to harvest. Considering vegetative zero at 10 °C, calculations of bioclimatic indexes (Table 1) were performed through minimum, mean and maximum temperatures; precipitation and insolation (INMG, 1988).

Table 1. Bioclimatic indexes used for the weather characterization.

GDD (Winkler, 1974)	HI (Huglin, 1978)
$GDD = \sum_{1apr}^{30set} (T - 10)$ <p>T: daily mean temperature (°C).</p>	$HI = \sum_{1apr}^{30set} \left[\frac{(T - 10) + (T_{max} - 10)}{2} \right] K$ <p>T: daily mean temperature (°C); Tmax: daily maximum temperature (°C); K: coefficient of 40° latitude.</p>
IBBL (Branas <i>et al.</i> , 1946)	CI (Tonietto <i>et al.</i> , 2004)
$IBBL = \sum_{apr}^{set} P T_m$ <p>P: monthly precipitation (mm); Tm: monthly mean temperature (°C).</p>	<p>CI = Tmin of last month of maturation Tmin: monthly minimum temperature (°C).</p>
Other indexes used	
HTC (Selianinov, 1928)	LTI (Kenny and Shao, 1992)
$HTC = \left[\sum_{apr}^{set} P / X \right] 10$ <p>P: monthly precipitation (mm); X: sum of Winkler (°C).</p>	<p>LTI = MTWM (75 – latitude) MTWM: daily mean temperature of the hottest month (°C); 40° latitude.</p>
PH (Branas <i>et al.</i> , 1946)	
$PH = X H 10^{-6}$ <p>X: sum of Winkler (°C); H: sum of monthly insolation (hours).</p>	

GDD - Growing Degree Days, index of the sum of Winkler active temperatures, **HI** - Heliothermic Index of Huglin; **IBBL** - Branas Hydrothermal Index; **CI** - Cold night Index; **HTC** - Selianinov Hydrothermal Coefficient; **LTI** - Latitude-Temperature Index; **PH** - Heliothermic Product of Branas.

For the five periods considered, the GDD values of each variety were calculated. After that, three equal intervals between the maximum and minimum GDD were used to classify the varieties about GDD required for each period in the two years. These intervals were presented in Table 2.

Table 2. Intervals used by collected data to classify the varieties according to the GDD required in the five periods within the growing season. Values presented (in degree-days) were obtained by average of the two studied years.

	B - F	F	F - V	V	V - H
Interval	294 - 368	83 - 163	765 - 996	183 -392	499 - 747
Low	<319	<110	<842	<253	<582
Medium	319≤ GDD ≤344	110≤ GDD ≤136	842≤ GDD ≤919	253≤ GDD ≤323	582≤ GDD ≤664
High	>344	>136	>919	>323	>664

B - F: from budburst to flowering; **F**: flowering; **F - V**: from flowering to veraison; **V**: veraison; **V - H**: from veraison to harvest.

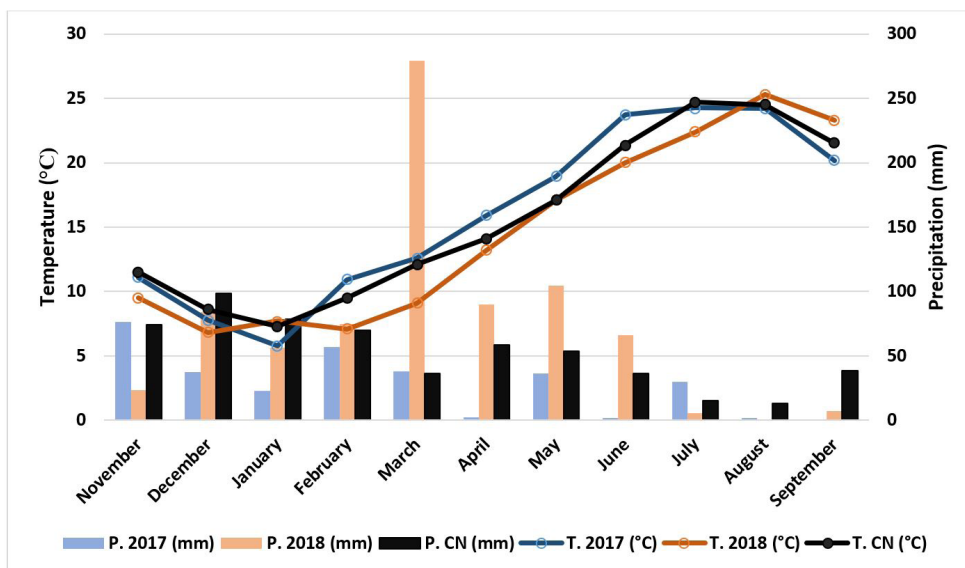
2.4 GRAPE QUALITY

The grape quality was assessed by the total soluble solids on the homogenate pulp, while the total polyphenols, the tannins and the total anthocyanins were measured in the seeds and skins, following OIV methods (2006). Total polyphenols and tannins values are expressed in mg of epicatechin per gram of berry and total anthocyanins values are expressed in mg of malvidine-3-glucoside per gram of berry. Results are showed as average values of the two years ± standard deviation. The quality parameters were compared for each grapevine variety, applying a linear projection represented by the radial visualization (RadViz) (Matias, 2017; Rubio-Sánchez *et al.*, 2015).

3 RESULTS AND DISCUSSION

The old vineyards in the Douro Region are characterized by the high diversity of varieties and its heterogeneous distribution. Thus, a study focusing on the old vineyards in the Douro can be limited by the not exist single-varietal vineyards on the same soil-climatic conditions. Furthermore, the number of vineyards with the same age, diversity of varieties and soil-climatic conditions in the Douro Region is scarce. Therefore, and although in this study the number of grapevines per variety can be considered insufficient, this reflects the old vineyards' composition in the Douro region. Concerning the weather conditions of studied site presented in Figure 1, 2017 and 2018 presented differences in the monthly temperature and precipitation values. Along the growing season, 2017 was warmer and drier than 2018, with the exception of August and September temperatures.

Figure 1 - Temperature and precipitation values for 2017 and 2018. CN: Climatological normal "1971-2000".



The growing season average temperature of 2017 was 21.2 °C, while in 2018 was 20.2 °C. These average temperatures were higher than those indicated by Jones (2013) for Cima-Corgo (Douro Region). Precipitation values from April to September, were 72.6 mm for 2017 and 274.2 mm for 2018. Comparing these with the Climatological Normal "1971-2000" that registered 20.6 °C and 215.8 mm, these two consecutive years demonstrated the different weather conditions existing in the Douro Region. The phenological stages in 2017 were two or three weeks earlier than 2018, which could be explained by the higher temperature values registered in 2017. From the beginning of veraison to harvest, were observed seventeen days above 35 °C in 2017 and twelve days in 2018. According to the bioclimatic indexes presented in Table 3, the grapevines from the two years were exposed to similar warmer conditions and different water circumstances.

Table 3. Bioclimatic indexes calculated for the weather characterization.

Bioclimatic Index	2017	2018	Value ranges	Classification
GDD	2055	1881	1850 < GDD < 2120	Hot
HI	2821	2571	2400 < HI < 3000	Warm
IBBL	1545	4608	IBBL < 3000; GDD > 1550	Exceptional quality
			4000 < IBBL < 5000; GDD > 1550	Good quality

Bioclimatic Index	2017	2018	Value ranges	Classification
CI	16.6	16.3	14 < CI < 18 °C	Temperate nights
HTC	0.35	1.46	HTC < 0.4	Extreme drought
			HTC > 1	No drought
LTI	849	886	LTI > 700	Hot climate grape
PH	3.2	2.9	PH > 2,6	Production viable zone

GDD - Growing degree-days, index of the sum of Winkler active temperatures, **HI** - Heliothermic Index of Huglin; **IBBL** - Branas Hydrothermal Index; **CI** - Cold night Index; **HTC** - Seliainov Hydrothermal Coefficient; **LTI** - Latitude-Temperature Index; **PH** - Heliothermic Product of Branas.

The GDD values of vineyard were within those presented by Magalhães *et al.* (1995) for the Douro Region and more specifically within the values for the Cima-Corgo indicated by Jones (2013). The HI showed higher values those presented by Jones (2013) for Cima-Corgo, caused by the higher temperatures registered in the studied years. The CI exhibited above 16 °C to monthly minimum temperature what reached the conditions predicted for 2070 in the Douro Region pointed out by Fraga (2014a). The HTC values corroborate the dryness in 2017. Among the two years, comparing HTC with IBBL on grape quality, it was evident the influence of the different weather conditions on grapevine varieties. For the two years, the GDD from budburst to harvest were similar for all varieties, ranging from 1820 (Nevoeira) to 1850 (Malvasia Preta). The GDD values of different periods are presented in Figures 2 and 3. GDD values did not showed a strong relationship between the growing season periods' duration. For example, a short period from budburst to flowering does not imply a short period from flowering to veraison, which was also verified by Tomasi *et al.* (2011). For the majority of grapevine varieties, the period with highest GDD was from flowering to veraison. Ramos (2017) also found that this period had the highest GDD values. Comparing the shorter periods (flowering and veraison), the period with lowest GDD values was the flowering for the majority of grapevines analysed (Figure 3).

Figure 2. Chronological evolution in growing season of the periods: from budburst to flowering; from flowering to veraison; from veraison to harvest with the corresponding GDD. Data are presented for 2017 and 2018.

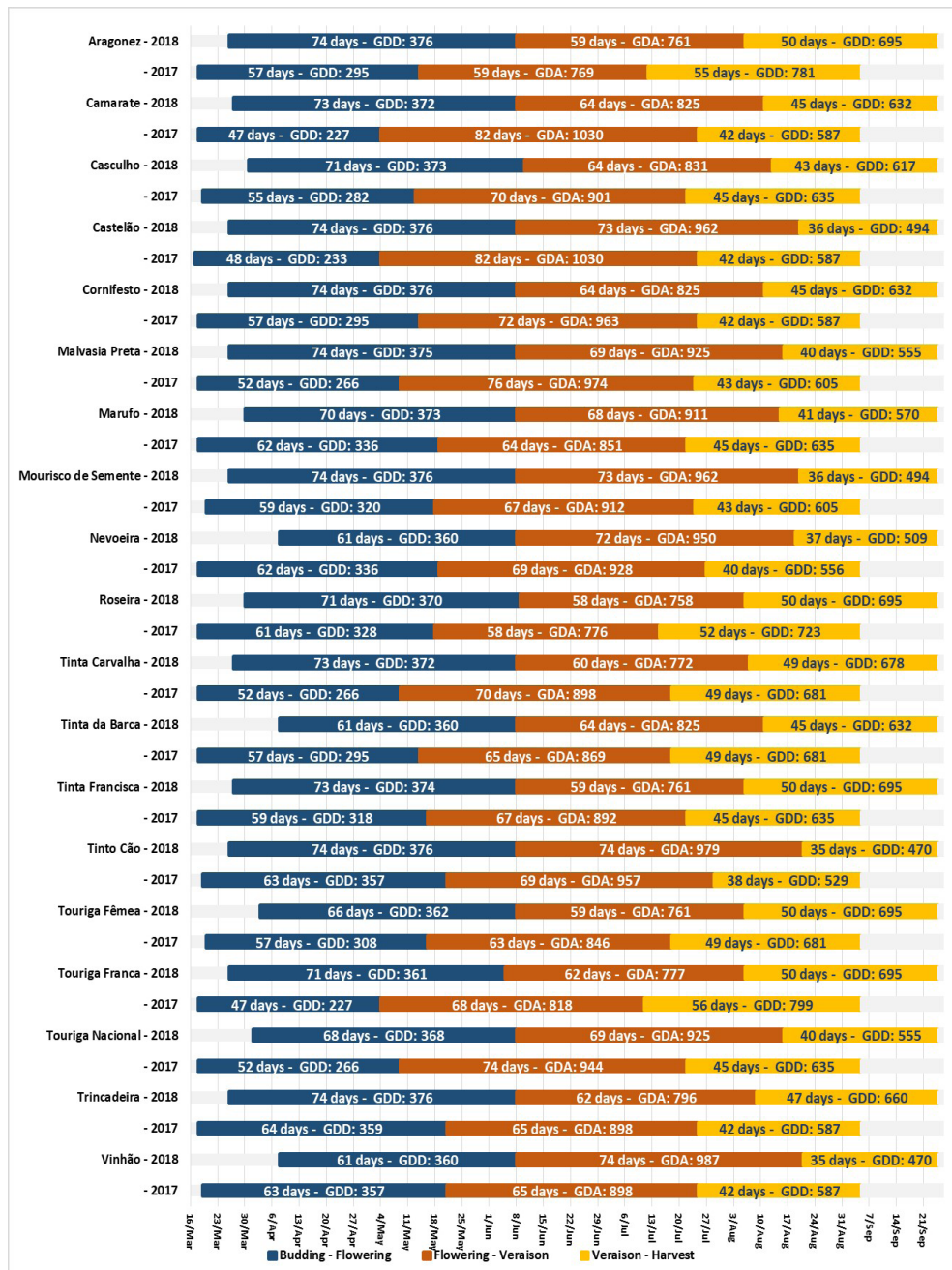
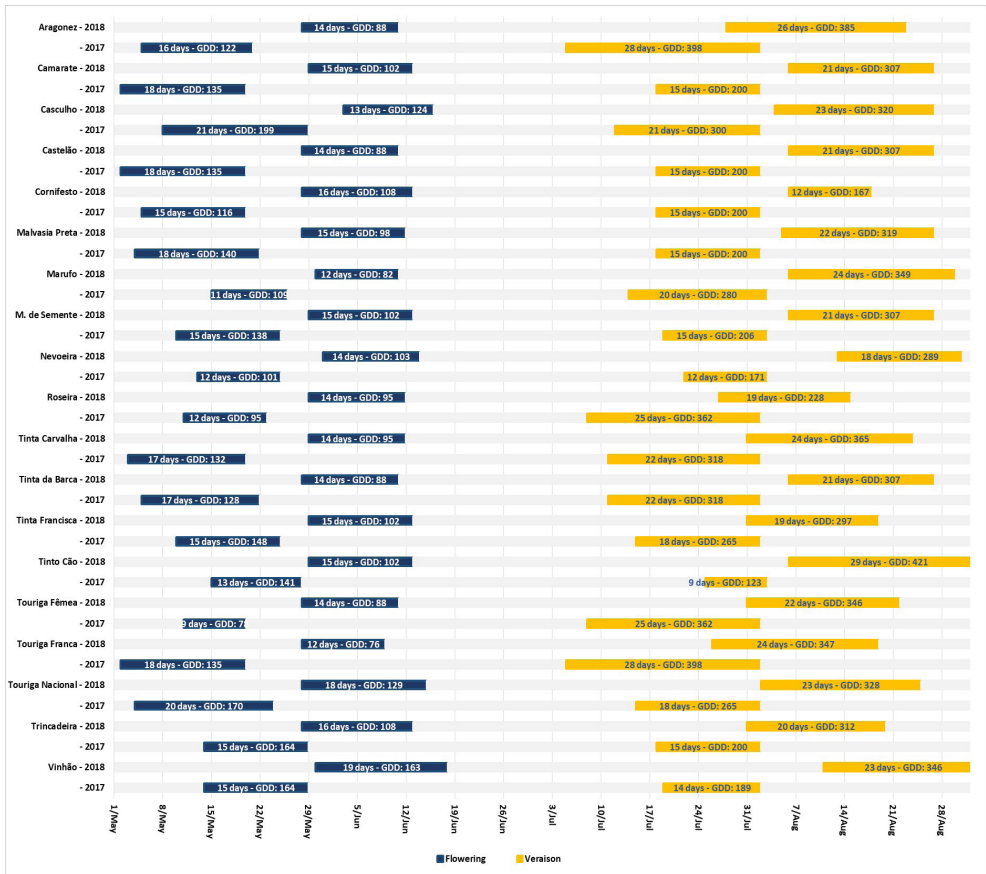


Figure 3. Chronological evolution of flowering and veraison periods with the corresponding GDD. Data are presented for 2017 and 2018.



The classification of the growing season periods were applied to the two years, the results are illustrated in Table 4. According to this classification, Vinhão, Nevoeira or Marufo varieties showed high GDD values in budburst-flowering period and simultaneously, had a later flowering in both years (Figure 2 and 3). Touriga Franca and Castelão showed, at the same time, low GDD values in budburst-flowering period (Table 4) and an early flowering (Figure 2 and 3). During budburst-flowering period, Lopes *et al.* (2008) observed similar results, with Vinhão having a high GDD and Touriga Franca a low GDD. Concerning the duration of flowering, Touriga Nacional exhibited longest flowering in both years.

Table 4. Classification of GDD in the five growing season periods, with ranges of values considered for each period (average of the two studied years).

	B - F	F	F - V	V	V - H
Aragonez	Medium	Low	Low	High	High
Camarate	Low	Medium	High	Medium	Medium
Casculho	Medium	High	Medium	Medium	Medium
Castelão	Low	Medium	High	Medium	Low
Cornifesto	Medium	Medium	Medium	Low	Medium
Malvasia Preta	Medium	Medium	High	Medium	Low
Marufo	High	Low	Medium	Medium	Medium
Mourisco de Semente	High	Medium	High	Medium	Low
Nevoeira	High	Low	High	Low	Low
Roseira	High	Low	Low	Medium	High
Tinta Carvalha	Low	Medium	Low	High	High
Tinta da Barca	Medium	Low	Medium	Medium	Medium
Tinta Francisca	High	Medium	Low	Medium	High
Tinto Cão	High	Medium	High	Medium	Low
Touriga Fêmea	Medium	Low	Low	High	High
Touriga Franca	Low	Low	Low	High	High
Touriga Nacional	Low	High	High	Medium	Medium
Trincadeira	High	Medium	Medium	Medium	Medium
Vinhão	High	High	High	Medium	Low

B - F: from budburst to flowering; **F**: flowering; **F - V**: from flowering to veraison; **V**: veraison; **V - H**: from veraison to harvest.

During flowering-veraison period, Vinhão, and Nevoeira presented, simultaneously, high GDD (Table 4) and later veraison (Figure 2 and 3). On contrary, varieties such as Aragonez, Touriga Franca and Roseira showed a low GDD and an early veraison. For the same period, Lopes *et al.* (2008) mentioned that Aragonez and Touriga Franca had low GDD, considering Touriga Franca as a variety with an earlier veraison. Concerning the duration of veraison in the present study, Aragonez and Touriga Franca exhibited a longer veraison in both years. Although no relationship between the growing season periods could be established, it seems to be relevant that varieties presenting high GDD during veraison (Aragonez, Tinta Carvalha, Touriga Fêmea and Touriga Franca), had low GDD in flowering-veraison period. These varieties did not present high GDD variability between the two years in flowering-veraison and veraison periods, which may mean that these varieties were poorly affected by the different weather conditions in these periods. During the veraison-harvest period, Aragonez, Touriga Franca, Roseira, Tinta Francisca, Touriga

Fêmea and Tinta Carvalha presented high GDD. Similarly, Lopes *et al.* (2008) also showed that Touriga Franca had high GDD during the same period. Varieties as Vinhão, Castelão, Tinto Cão, Malvasia Preta, Nevoeira and Mourisco de Semente demonstrated low GDD in veraison-harvest period. In this period, the varieties that showed the higher GDD variability between the two years were Vinhão, Touriga Franca and Mourisco de Semente. During the warmer months the accumulation of GDD was higher and the future scenarios' projections indicate an increase of temperatures, especially in summer, where the maturation will occur under increasingly warm conditions being likely to accelerate it (Duchene *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2002). Table 5 shows the quality parameters analysed of all varieties and the variability of the two years, observed by the standard deviation.

Table 5. Quality parameters of 19 grapevine varieties (average of the two studied years).

	TSS (°Brix)	Polyphenols (mg/g)	Tannins (mg/g)	Anthocyanins (mg/g)
Aragonez	24.3±0.6	13.1±2.1	5.2±0.7	1.7±0.3
Camarate	19.1±1.4	10.3±2.2	4.3±0.2	1.0±0.1
Casculho	18.0±0.4	9.3±1.2	4.0±1.0	1.0±0.2
Castelão	22.3±0.6	8.1±1.8	2.2±0.4	1.3±0.3
Cornifesto	20.9±0.4	9.6±2.0	3.6±0.1	1.3±0.3
Malvasia Preta	21.3±1.5	12.6±2.4	4.3±1.6	1.6±0.4
Marufo	24.3±1.0	5.6±0.9	2.0±0.5	0.4±0.0
Mourisco de Semente	19.6±0.3	8.2±1.9	3.7±1.6	0.6±0.2
Nevoeira	18.2±0.2	9.0±1.9	3.9±0.9	0.7±0.2
Roseira	20.6±0.6	10.2±2.6	3.8±0.7	1.2±0.4
Tinta Carvalha	20.6±1.1	8.0±1.1	3.5±1.6	0.6±0.3
Tinta da Barca	19.6±0.1	11.7±0.9	4.2±1.6	1.1±0.1
Tinta Francisca	19.9±0.1	10.5±1.9	3.8±0.8	1.0±0.1
Tinto Cão	21.9±0.3	20.7±2.5	5.0±1.4	1.9±0.5
Touriga Fêmea	24.1±0.5	10.4±2.5	3.5±0.9	1.2±0.3
Touriga Franca	19.4±0.2	14.1±2.0	4.3±1.9	1.6±0.3
Touriga Nacional	21.2±1.7	12.5±2.5	3.9±1.2	1.7±0.4
Trincadeira	21.6±0.0	10.6±3.0	3.3±0.6	1.6±0.1
Vinhão	22.6±1.6	19.1±3.6	5.8±1.3	3.1±0.3

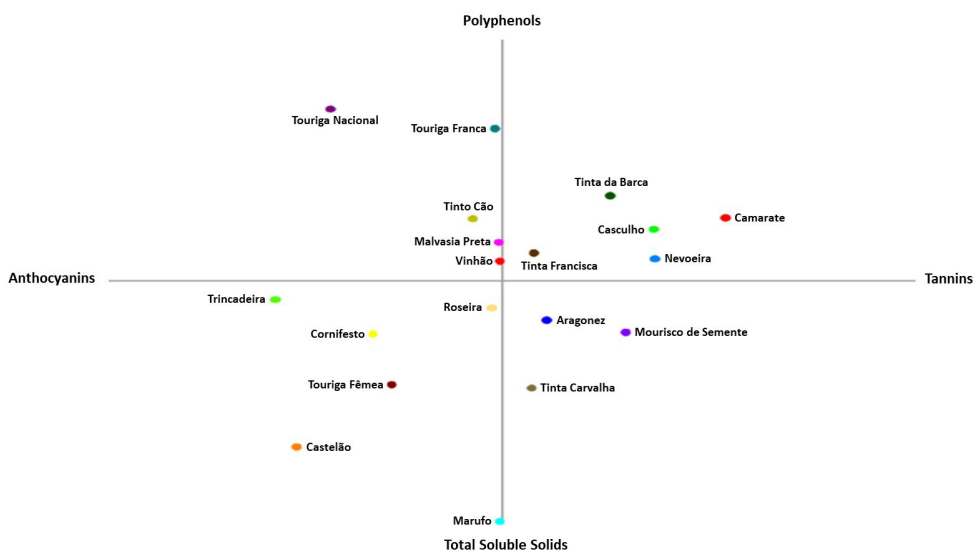
TSS- total soluble solids. **Total polyphenols and tannins**: mg epicatechin / g berry; **total anthocyanins**: mg malvidine /g berry.

Considering the two years, varieties with low GDD during maturation such as Castelão, Malvasia Preta, Tinto Cão and Vinhão showed a fast evolution of quality

parameters such as the total soluble solids. This fast evolution may demonstrate the influence that high temperatures had on these varieties during maturation in these two years. It should be highlighted that Vinhão presented later veraison, as previously described. Vinhão and Tinto Cão showed long growing season periods until veraison, with high GDD. The same occurred with Malvasia Preta, specifically from flowering to veraison. Fraga (2014a) indicated Tinto Cão and Malvasia Preta as varieties with good adaptability to different climatic conditions. The author analysed the same adaptability aspects in several grapevines varieties, concluding that Touriga Franca also presented a good adaptability to different climatic conditions, moreover higher GDD mean values than Tinto Cão and Malvasia Preta (Fraga, 2014a). In the present study, the GDD mean values did not showed significant differences between the grapevine varieties, as observed by Fraga (2014a). The values observed in this study indicate close GDD values for all varieties between 2017 and 2018, including Malvasia Preta (1850), Touriga Franca (1838) and Tinto Cão (1833). As previously described, Touriga Franca presented high GDD from veraison to harvest and among the varieties with high GDD in this period, was the variety that exhibited the higher phenolic maturation simultaneously with Aragonez. However, Aragonez presented higher total soluble solids and seems to be at its ideal maturation. According to the quality parameters of 2017 and 2018, defined in this study, the prospect of increasing temperatures in the maturation period may cause higher changes in the Aragonez quality profile, when compared to Touriga Franca. Touriga Franca's quality can still be improved through a longer maturation period, since it exhibited a low value of total soluble solids. Among the varieties with high GDD in veraison-harvest period, Tinta Carvalha had the lower phenolic maturation. Other varieties, such as Marufo and Touriga Fêmea, also presented elevated total soluble solids. However, at the same time, Marufo showed lower phenolic richness and lower GDD from veraison to harvest compared to Touriga Fêmea. Marufo was referred by Fraga et al. (2015) as being a variety with low adaptability in warm regions, as in accordance with the results obtained for the present study. Touriga Fêmea had a phenolic composition similar to Tinta Francisca and Roseira. Tinta Francisca and Roseira showed similar GDD behaviours during the growing season with high GDD in maturation. Furthermore, the balance between total soluble solids and phenolic composition may reveal a good resistance potential to the prospects of warming future scenarios. Comparing the varieties with high GDD in veraison-harvest period, Tinta Francisca presented the lowest quality parameters variability between the two years, according to the standard deviation. Regarding all varieties in study, Marufo demonstrated to be the lowest affected by the different weather conditions between 2017 and 2018.

Camarate, Casculho, Mourisco de Semente, Nevoeira and Tinta da Barca could benefit from a longer maturation period, leading to a complete phenolic maturation, an important advantage to obtain higher quality. Since Mourisco de Semente and Nevoeira also demonstrated a longer growing season until veraison, could be interesting to study their GDD until ideal maturation to evaluate if maturation is progressive. Figure 4 shows a linear projection applied to the quality parameters and represented by the radial visualization (RadViz). This data visualization allowed the identification of the most influencer parameters for each variety. The proximity between the data point and the parameters (total soluble solids, total polyphenols, tannins and total anthocyanins) highlights the influence of a parameter on the grapevine variety.

Figure 4. Linear projection relating four vectors: total soluble solids, total polyphenols, tannins and total anthocyanins.



Marufo was mostly influenced by the total soluble solids parameter, having low values for the remaining ones. Touriga Franca demonstrated to be more influenced by the total polyphenols. Trincadeira was the variety where the anthocyanins mostly stood out when compared with the other parameters. The same happened with the tannins for the Camarate. In the varieties Vinhão, Malvasia Preta, Tinta Francisca and Roseira the quality parameters were balanced.

4 CONCLUSIONS

This study analysed 19 Portuguese grapevine varieties during two consecutive years, revealing differences on GDD values in the growing season periods and also on

the grape quality. The data was obtained from a specific site (Pinhão, Douro Region) with the same weather conditions. According to this study, it can be pointed out the grapevine varieties with longer growing seasons, high GDD from veraison to harvest and finally with a progressive maturation. These balanced characteristics may provide a better adaptation to the warming scenarios. Aragonez, Roseira, Tinta Carvalha, Tinta Francisca, Touriga Franca and Touriga Fêmea showed high GDD from veraison to harvest, which highlight their better adaptation to the warmer months, based on observed weather conditions of studied years. However, according to the total soluble solids values, Aragonez and Touriga Fêmea seemed to be at their ideal maturation, possibly indicating a higher grape quality vulnerability with the increase of temperature. Among the most adapted grapevine varieties pointed out in this study (Aragonez, Roseira, Tinta Carvalha, Tinta Francisca, Touriga Franca and Touriga Fêmea), Roseira and Tinta Francisca presented the most balanced grape quality parameters, revealing to be suitable minor grapevine varieties in this specific site of the Douro Region, exposed to different weather conditions.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of European Investment Funds by FEDER/COMPETE/POCI-Operacional Competitiveness and Internationalization Programme, under Project POCI-01-0145-FEDER-006958 and National Funds by FCT - Portuguese Foundation for Science and Technology, under the project UID/AGR/04033/2019. The authors acknowledge the financial support of European Investment Funds by FEDER/NORTE2020 under the project INNOVINE&WINE, NORTE-01-0145-FEDER-000038.

REFERENCES

- Barnuud N., Zerihun A., Gibberd M., Bates B., 2014. Berry composition and climate: responses and empirical models. *Int. J. Biometeorol.*, **58**, 1207-1223. doi:10.1007/s00484-013-0715-2
- Branas J., Bernon G., Levadoux L., 1946. *Éléments de viticulture générale*. impr. Delmas, Montpellier, France.
- Brito M., Moutinho-Pereira J., Brites M., Magalhães N., 2004. Caracterização ecofisiológica de cinco castas tintas da Região Demarcada do Douro. Actas do 6º. Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, 26-28 maio, Évora, volume 1, 159-166 pp.
- Eiras-Dias J., Cunha J., Brazão J., Clímaco P., 2016. Promover e valorizar as castas minoritárias: O exemplo da casta Malvasia de Colares. *Vida Rural*, Junho, 36-38 pp.
- Fraga H., Malheiro A., Moutinho-Pereira J., Santos J.A., 2012. An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food Energy Secur.*, **1**(2), 94-110. doi:10.1002/fes3.14

- Fraga H., 2014a. Zonagem vitícola na Europa: cenários climáticos e medidas de adaptação. Tese de doutoramento. UTAD, Vila Real. 198pp.
- Fraga H., Malheiro A., Moutinho-Pereira J., Santos J.A., 2014b. Climate factors driving wine production in the Portuguese Minho region. *Agric. For. Meteorol.*, **185**, 26-36. doi:10.1016/j.agrformet.2013.11.003
- Fraga H., Santos J.A., Malheiro A., Oliveira A.A., Moutinho-Pereira J., Jones G., 2015. Climatic suitability of Portuguese grapevine varieties and climate change adaptation. *Int. J. Climatol.*, **36**(1), 1-12. doi:10.1002/joc.4325
- Fraga H., Santos J.A., Moutinho-Pereira J., Carlos C., Silvestre J., Eiras-Dias J., Mota T., Malheiro A., 2016. Statistical modelling of grapevine phenology in Portuguese wine regions: observed trends and climate change projections. *J. Agric. Sci.*, **154**(5), 795-816. doi:10.1017/S0021859615000933
- Greer D., 2017. Responses of biomass accumulation, photosynthesis and the net carbon budget to high canopy temperatures of *Vitis vinifera* L. cv. Semillon vines grown in field conditions. *Enviro. Exp. Bot.*, **138**, 10-20. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.03.001
- Dinis L.-T., Correia C., Ferreira H., Gonçalves B., Gonçalves I., Coutinho J.F., Ferreira M.I., Malheiro A., Moutinho-Pereira, J., 2014. Physiological and biochemical responses of Semillon and Muscat Blanc à Petits Grains winegrapes grown under Mediterranean climate. *Sci Horti.*, **175**, 128-138. doi:10.1016/j.scienta.2014.06.007
- Dobrei A., Dobrei A.G., Nistor E., Iordanescu O., Sala F., 2015. Local Grapevine Germplasm from Western of Romania – an Alternative to Climate Change and Source of Typicity and Authenticity. *Agric. & Agric. Sci. Proc.*, **6**, 124-131. doi: 10.1016/j.aaspro.2015.08.048
- Huglin P., 1978. Nouveau mode d'évaluation des possibilités héliothermiques d'un milieu viticole. Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture. Académie d'agriculture de France, Paris, France.
- Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica., 1988. O Clima de Portugal, Normas Climatológicas da região Entre Douro e Minho e Beira Litoral, correspondentes a 1941 - 1970. Fascículo XL, volume 1 - 1ª região, Lisboa. 70pp.
- IVV., 2018. Castas mais utilizadas. Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural. Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., Lisboa.
- Intergovernmental Panel on Climate Change., 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: Core Writing Team, Pachauri, R.K., Meyer, L.A. (Eds.), IPCC, Geneva, Switzerland. 151 pp.
- Jones G., Duchêne E., Tomasi D., Yuste J., Braslavská O., Schultz H., Martínez C., Boso S., Langellier F., Perruchot C., Guimberteau G., 2005. Changes in European winegrape phenology and relationships with climate. Paper presented at the Proc. XIV GESCO Symposium, Geisenheim, Germany, August, 23-26.
- Jones G., 2013. Uma Avaliação do Clima para a Região Demarcada do Douro: Uma análise das condições climáticas do passado, presente e futuro para a produção de vinho. Associação para o Desenvolvimento da Viticultura Duriense. Vila Real, Portugal. 102pp.
- Jones N.K., 2012. The influence of recent climate change on wine regions in Quebec, Canada. *J. Wine Res.*, **23**, 103-113. doi:10.1080/09571264.2012.678933
- Kenny G., Shao J., 1992. An assessment of a latitude-temperature index for predicting climate suitability for grapes in Europe. *J. Hort. Sci.*, **67**(2), 239-246. doi:10.1080/00221589.1992.11516243

Lacona T., Sanna M., Spanna F., Schubert A., 2012. Berry Polyphenols and Climatic Variability in Nebbiolo Grapes. IS Viti&Climate: Effect of Climate Change on Production and Quality of Grapevines and Their Products. *Acta Hort.*, 931.

Lopes J., Eiras-Dias J., Abreu F., Clímaco P., Cunha J., Silvestre J., 2008. Exigências térmicas, duração e precocidade de estados fenológicos de castas da coleção ampelográfica nacional. *Ciência Téc. Vitiv.*, **23**, 61-71.

Lopes C., Egipto R., Pedroso V., Pinto P., Braga R., Neto M., 2017. Can berry composition be explained by climatic indices? Comparing classical with new indices in the Portuguese Dão region. IX International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology. *Act. Hortic.*, 1157.

Lorenzo M., Taboada J., Lorenzo J., Ramos A., 2012. Influence of climate on grape production and wine quality in the Rías Baixas, north-western Spain. *Reg Environ Change*, **13**, 887-896. doi:10.1007/s10113-012-0387-1

Loureiro M., Moreno-Sanz P., Suárez B., 2017. Agronomical characterization of minority grapevine cultivars from Asturias (Spain). *Cienc. Tec. Vitivinic.*, **32**(2), 102-114. doi:10.1051/ctv/20173202102

Magalhães N., Oliveira A.A., Caeiro L., 1995. Contributo para a caracterização climática das regiões vitícolas de Portugal Continental. 3º *Simpósio Vitivinícola do Alentejo*, Évora, 1, 81-90.

Malheiro A., Santos J.A., Fraga H., Pinto J.G., 2010. Climate change scenarios applied to viticultural zoning in Europe. *Clim Res.*, **43**(3), 163-177. doi:10.3354/cr00918

Malheiro A., Campos R., Fraga H., Eiras-Dias J., Silvestre J., Santos J.A., 2013. Winegrape phenology and temperature relationships in the Lisbon Wine Region, Portugal. *J Int Sci Vigne Vin*, **47**(4), 287-299. doi:10.20870/oeno-one.2013.47.4.1558

Matias R., 2017. Establishing a Cooperation Between RadViz and SOM to Improve the Analyst Visual Experience. In: Martínez de Pisón F., Urraca R., Quintián H., Corchado E. (eds) *Hybrid Artificial Intelligent Systems*. HAIS 2017. Lecture Notes in Computer Science, vol 10334, pp. 354-366. Springer.

Merkouropoulos G., Michailidou S., Alifragkis A., Zioziou E., Koundouras S., Argiriou A., Nikolai N., 2015. A combined approach involving ampelographic description, berry oenological traits and molecular analysis to study native grapevine varieties of Greece. *Vitis*, **54** (Special Issue), 99-103.

Milella R., Pisani R., Mastrofrancesco L., Alba V., Giannandrea M., Gasparro M., Caputo A., 2016. Phenolic characterization and antioxidant capacity of ten autochthonous vines grown in southern Italy. In: *Proc. 39th World Congress of Vine and Wine, Bento Goncalves, Brazil*. Office International de la Vigne et du Vin, BIO Web of Conferences, 7 (Art. 01019). doi:10.1051/bioconf/20160701019

Miranda P.M., Coelho F.E., Tomé A.R., Valente M.A., Carvalho A., Pires C., Pires H.O., Pires V. C., Ramalho C., 2002. "20th century Portuguese Climate and Climate Scenarios", in Santos, F.D., K. Forbes, and R. Moita (eds), 2002, *Climate Change in Portugal: Scenarios, Impacts and Adaptation Measures (SIAM Project)*, 23-83, *Gradiva*, 454 pp.

Mori K., Goto-Yamamoto N., Kitayama M., Hashizume K., 2007. Effect of high temperature on anthocyanin composition and transcription of flavonoid hydroxylase genes in 'Pinot noir' grapes (*Vitis vinifera*). *J. Hort. Sci. Biotech.*, **82**, 199-206. doi: 10.1080/14620316.2007.11512220

Moutinho-Pereira J., Correia C., Goncalves B., Bacelar E., Torres-Pereira J., 2004. Leaf gas exchange and water relations of grapevines grown in three different conditions. *Photosynthetica*, **42**, 81-86. doi:10.1023/B:PHOT.0000040573.09614.1d

Neuman P, Matzarakis A., 2014. Estimation of wine characteristics using a modified Heliothermal Index in Baden-Wurttemberg, SW Germany. *Int. J. Biometeorol.*, **58**, 407-415. doi:10.1007/s00484-013-0637-z

OIV, 2006. *Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts*. Organization Internationale de la Vigne et du Vin, Paris.

Ramos M., Jones G., Yuste J., 2018. Phenology of Tempranillo and Cabernet-Sauvignon varieties cultivated in the Ribera del Duero DO: observed variability and predictions under climate change scenarios. *OENO One*, **52**(1). doi:10.20870/oenone.2018.52.1.2119

Ramos M., 2017. Projection of phenology response to climate change in rainfed vineyards in north-east Spain. *Agric. For. Meteorol.*, **247**, 104-115. doi:10.1016/j.agrformet.2017.07.022

Rubio-Sánchez M., Raya L., Diaz F., Sanchez, A., 2015. A comparative study between RadViz and Star Coordinates. *IEEE transactions on visualization and computer graphics*, **22**(1), 619-628.

Sadras V., Moran M., 2013. Asymmetric warming effect on the yield and source:sink ratio of field-grown grapevine. *Agric. For. Meteorol.*, **173**, 116-126. doi:10.1016/j.agrformet.2012.12.005

Saleh O., Harb J., Karrity A., Arif M., Frank W., 2018. Identification of differentially expressed genes in two grape varieties cultivated in semi-arid and temperate regions from West-Bank, Palestine. *Agri Gene*, **7**, 34-42. doi:10.1016/j.aggene.2017.11.001

Santos J.A., Malheiro A., Pinto J.G., Jones G., 2012. Macroclimate and viticultural zoning in Europe: observed trends and atmospheric forcing. *Clim Res.*, **51**(1), 89-103. doi:10.3354/cr01056

Santos J.A., Grätsch S., Karremann M., Jones G., Pinto J.G., 2013. Ensemble projections for wine production in the Douro Valley of Portugal. *Clim Change*, **117**(1-2), 211-225. doi:10.1007/s10584-012-0538-x

Selianinov G., 1928. On agricultural climate valuation (in Russian). *Proc. Agric. Meteorol.*, **20**, 165-177

Tomasi D., Jones G., Giust M., Lovat L., Gaiotti F., 2011. Grapevine Phenology and climate change: relationships and trends in the Veneto Region of Italy for 1964–2009. *Am. J. Eno. Vit.*, **62**, 329-339. doi:10.5344/ajev.2011.10108

Tonietto J., Carbonneau A., 2004. A multicriteria climatic classification system for grape growing regions worldwide. *Agric. For. Meteorol.*, **124**(1-2), 81-97. doi:10.1016/j.agrformet.2003.06.001

Winkler A. 1974. *General viticulture*. University of California Press, California, USA.

Van Leeuwen C., Friant P., Chone X., Tregoat O., Koundouras S., Dubourdieu D., 2004. Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *Am. J. Eno. Vit.*, **55**(3), 207-217.

Van Leeuwen C., Seguin, G., 2006. The concept of terroir in viticulture. *J. Wine Res.*, **17**(1), 1-10. doi:10.1080/09571260600633135

CAPÍTULO 11

INFLUENCIA DE LAS BRISAS DE TIERRA Y MAR SOBRE EL MICROCLIMA DE LA CANOPIA

Data de submissão: 21/12/2022

Data de aceite: 05/01/2023

Gerardo Echeverría Grotiuz

Profesor Adjunto

Departamento de Producción Vegetal

Facultad de Agronomía

Universidad de la República

Uruguay

<https://orcid.org/0000-0002-3051-9255>

Nicolás Demetriuk

Docente

Departamento de Producción Vegetal

Facultad de Agronomía

Universidad de la República

Uruguay

<https://www.linkedin.com/in/nicolas-demetriuk-014bb636/?originalSubdomain=uy>

RESUMEN: En el territorio costero del Río de la Plata se ubica el 93% de la superficie vitícola de Uruguay. La exposición marina puede considerarse un factor capaz de influir sobre el mesoclima y en consecuencia sobre la fisiología del viñedo. En este trabajo, se procesó información horaria del viento durante el período estival de los años 2011 a 2014, procedente de seis estaciones meteorológicas distribuidas a lo largo de la costa del Río de la Plata. La dirección, velocidad y frecuencia del viento se correlacionó con la temperatura

y humedad relativa de canopia de nueve viñedos experimentales de la misma zona. Los resultados muestran que, por efecto de las brisas de mar y tierra, la temperatura media de la canopia desciende hasta una distancia de 29.2 km de la costa. La proximidad al mar también se asoció con aumento en la cantidad de horas con temperaturas óptimas para fotosíntesis y temperaturas nocturnas más altas. La influencia sobre la humedad relativa no pudo ser verificada. A nivel espacial, las condiciones climáticas del viñedo resultaron diferentes a lo largo de la costa y a diferentes distancias del mar, confirmando la influencia marina sobre el terroir vitícola.

PALABRAS CLAVE: Brisas de mar y tierra. Microclima de canopia. Viñedo. Costa del Río de la Plata.

LAND AND SEA BREEZES INFLUENCES OVER THE CANOPY MICROCLIMATE

ABSTRACT: In the seaside of the Río de la Plata is located the 93% of the Uruguayan viticultural surface. The maritime exposition could be considered a factor able to influence over the mesoclimate and in consequence over the physiology of the vineyard. In this work, it was processed the hourly wind information, collected in the summery period of years 2011 to 2014, coming from 6 weather Station distributed all along the Río de la Plata coast. The wind direction, velocity and frequency was correlated with temperature and relative humidity of the canopy in nine experimental

vineyards of the same zone. The results show that, by sea and land breezes effect, the mean temperature decreased until 29.2 km from the coast. Proximity to the sea was also associated with an increase in the number of hours with optimal temperatures for photosynthesis and higher nighttime temperatures. The influence over relative humidity in the vineyards was no consistent. At spatial level, the climate conditions of the vineyard resulted different along the coast and with different distances to the sea, confirming the maritime influence on the viticultural terroir.

KEYWORDS: Land and sea breezes. Canopy microclimate. Vineyard. Rio de la Plata seaside.

1 INTRODUCCIÓN

En el territorio costero del Río de la Plata se ubica el 93% de la superficie vitícola de Uruguay. La exposición marina puede considerarse un factor capaz de influir sobre el mesoclima y en consecuencia sobre la fisiología del viñedo. Es necesario cuantificar los umbrales climáticos óptimos y extremos para procesos tales como la fotosíntesis y la respiración, a fin de determinar la aptitud vitícola de una región.

La circulación general de la atmosfera observada en latitudes bajas y medias del hemisferio sur, está dominado por los anticiclones subtropicales. Además del régimen global, la circulación local en la costa uruguaya del Río de la Plata se encuentra fuertemente influida por las brisas de mar y tierra, durante el semestre cálido (Bidegain *et al.*, 2009), y es coincidente con el período de desarrollo vegetativo de la vid.

La brisa marina es un fenómeno de circulación atmosférica local que se produce en regiones costeras de todo el mundo. Este evento puede tener una duración de entre varios minutos a algunas horas y está presente dos veces al día en sentido contrario (Abbs y Physick 1992).

La ocurrencia de circulaciones a lo largo del cinturón costero determina un clima marítimo que está delimitada hacia el interior por la posición más frecuente del frente de la brisa (Planchon *et al.*, 1997), que puede reducir las temperaturas extremas, proporcionar humedad y desencadenar precipitaciones en la costa (Zhang *et al.*, 2005). La brisa marina o System Breeze Sea (SBS) ocurre por contraste térmico entre la superficie de la tierra y el mar, que genera un gradiente de presión asociado. El gradiente se incrementa a lo largo del día y moviliza una capa de aire marino en niveles bajos de la atmósfera, desde el mar hacia la tierra (Miller *et al.*, 2003). Hacia la noche, la pérdida radiativa diferencial provoca un enfriamiento de las capas de aire adyacentes, que será más intenso sobre el continente, generando una masa de aire que invade el océano, desarrollándose una circulación conocida como brisa terrestre (Abbs y Physick 1992).

Cuando la topografía no significa una barrera a la penetración de la brisa, como es el caso de una pequeña colina, puede funcionar amplificando y anticipando la SBS con

respecto a una llanura costera (Banta *et al.*, 1993). Las características típicas del suelo también influyen el gradiente espacial y la intensidad del fenómeno (Schumann *et al.*, 1991).

Las tasas diarias de rotación de los vientos en superficie muestran una breve detención durante la media tarde y un estancamiento durante la noche. Esta velocidad de rotación irregular se explica por la composición semi-diurna de la fuerza del gradiente de presión, generada por calentamiento solar no sinusoidal en el transcurso de un día (Sakazaki y Fujiwara 2008).

Generalmente la brisa es precedida por condiciones de calma, cuando el forzante de escala sinóptica es brevemente equilibrado por el forzante térmico creado localmente (Ohashi y Kida 2002).

La determinación de la extensión de tierra adentro de la circulación de la brisa marina es un problema complejo, dependiente del contraste de temperatura tierra/mar, la fuerza de Coriolis, la topografía y fricción de la superficie terrestre, la estabilidad, y otros factores (Miller *et al.*, 2003). La penetración de la brisa marítima sobre tierra es estimada entre 15 y 50 km en las zonas templadas, en tanto que el desplazamiento de la brisa terrestre es siempre menor, siendo en zonas templadas 10 km (Reyes y Pares 1983). Los pronósticos precisos de penetración, dependen de un estudio de campo para cada sitio. La brisa del mar en Cape Town, penetró hasta por lo menos 35 km tierra adentro a las 17:00 hs, con un efecto de enfriamiento que declinaba rápidamente con la distancia de la costa (Bonnardot *et al.*, 2002), en tanto que, estudios realizados en New England, indican una penetración usualmente inferior a los 20 km (Colby 2004).

En el año 2009 se publicó el Mapa eólico de Uruguay (MIEM-DNETN 2009), que confirma una tendencia general de disminución del viento desde el SE (costa del océano Atlántico) al NW (región continental) del país, así como la influencia de la topografía. Un estudio específico de las brisas de mar y tierra junto al Río de la Plata, confirmó la presencia del fenómeno en cinco estaciones meteorológicas distribuidas en la zona costera y a una distancia del mar entre 0,7 km y 33,5 km (Pienika y Cataldo 2012).

A fin de determinar la influencia del viento marino sobre la aptitud vitícola del territorio ubicado en la costa uruguaya del Río de la Plata, en este trabajo se estudió: la presencia y rotación diaria de las brisas, la penetración en el continente y sus efectos sobre la temperatura y la humedad de la canopia.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó adelante en 9 viñedos de 6 regiones de la costa del Río de la Plata, durante los años 2011, 2012, 2013 y 2014.

La información de variables climáticas se obtuvo de distintas estaciones y servicios, instaladas y operadas según normas técnicas de la Organización Mundial de Meteorología y distribuidas en todo el territorio costero. Se utilizaron datos de estaciones convencionales de la Dirección Nacional de Meteorología de Uruguay (DNM), el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y el Servicio de Oceanografía e Hidrografía de la Armada (SOHMA) y de estaciones automáticas “Vantage Pro2” (Davis Instruments, Hayward, CA,U.S.A) en adelante (“Davis”) operadas por empresas vitícolas y la Facultad de Agronomía-UDELAR. Tabla 1.

Tabla 1. Ubicación y tipo de Estación Meteorológica.

Zona (Departamento)	Latitud / Longitud	Altura (m)	Tipo de estación
La Estanzuela (Colonia)	-34.3300 / -57.6800	81	Convencional
Mal Abrigo (San José)	-34.1167 / -56.9333	128	“Davis”
Las Brujas (Canelones)	-34.6700 / -56.3300	32	Convencional
Sayago (Montevideo)	-34.8333 / -56.2167	41	“Davis”
Punta Brava (Montevideo)	-34.9300 / -56.1500	3	Convencional
Empalme Olmos (Canelones)	-34.6667 / -55.9000	45	“Davis”
Laguna del Sauce (Maldonado)	-34.8700 / -55.1000	34	Convencional
Guardia Vieja (Maldonado)	-34.7333 / -55.3000	60	“Davis”

A las series de datos se le aplicaron test de validación según la norma UNE 500540 (2004). Aquellas que no superaron los niveles básicos fueron eliminadas y las que permanecían con datos “sospechosos” luego de los primeros filtros, fueron validados o rechazados luego de una inspección visual.

Con el objetivo de analizar la frecuencia de la dirección de la brisa en la costa, filtraron los datos de velocidad optando por los de baja intensidad, entre 7 y 25 km .h⁻¹ (1,94 a 6,94 m .s⁻¹). Se analizó el período diciembre-marzo, durante el cual las condiciones de alta energía relativa incidente promoverían brisas de mar y tierra. Se analizó la dirección del viento a través del estudio de la frecuencia en todo el período y de la frecuencia en dos momentos del día: a las 9 y 18 horas.

El ensayo se realizó en nueve parcelas de viñedos comerciales de la variedad Tannat, distribuidos a lo largo de la costa del Río de la Plata. Las parcelas más alejadas mantienen una distancia aproximada de 270 km. El sistema de conducción utilizado en espaldera y poda tipo Guyot. Las filas a una distancia de 2.5 m, presentaban una orientación predominante N-S. Figura 1 y Tabla 2.

Figura 1. Ubicación de regiones y parcelas (Plots).



Tabla 2. Coordenadas de las parcelas de ensayo.

Sitio	Coordenadas	
	Latitud	Longitud
Parcela 1	-34,3912	-57,8749
Parcela 2	-34,3862	-57,8512
Parcela 5	-34,1184	-57,9418
Parcela 3	-34,6075	-57,2403
Parcela 4	-34,8841	-57,3207
Parcela 6	-34,6551	-57,7927
Parcela 7	-34,6561	-57,7925
Parcela 8	-34,7053	-57,0553
Parcela 9	-34,7394	-57,0194

Dentro de la canopia de cada parcela, se instalaron sensores HOBO U23 ProV2 (® Onset Computer Corporation) para medición horaria de temperatura y humedad. Los sensores se ubicaron en la zona de racimos.

Los datos de temperatura y humedad de viñedos se correlacionaron con los datos de vientos y la distancia al mar.

Estudio de caso. En las parcelas 8 y 9 se realizó un estudio de caso, analizando la relación entre la evolución diaria de la velocidad e intensidad del viento y la temperatura y

humedad del viñedo. Estas parcelas se ubican a 6 km de distancia y presentan diferencias en su posición topográfica.

Se estudió la correlación y luego se hicieron regresiones entre la distancia al mar, la temperatura y humedad del viñedo en el período estival. Para conocer hasta que distancia del mar se mantenía una correlación positiva o negativa con las variables meteorológicas, se determinó el máximo o mínimo de cada curva de regresión. Este punto se interpretó como la distancia máxima de influencia marina sobre la variable medida en la canopia.

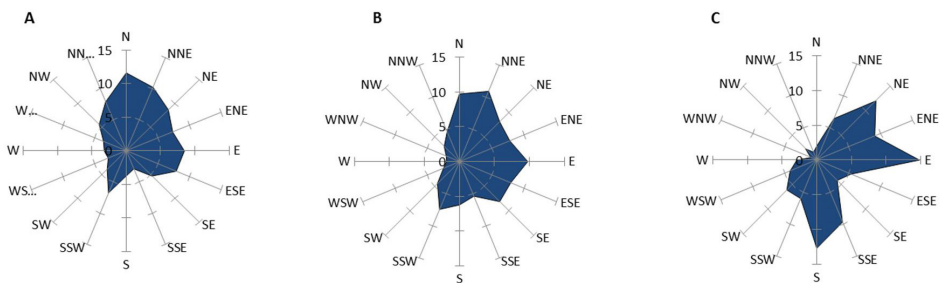
Los datos se procesaron mediante Software InfoStat 2016.

3 RESULTADOS

3.1 ESTUDIO DEL VIENTO

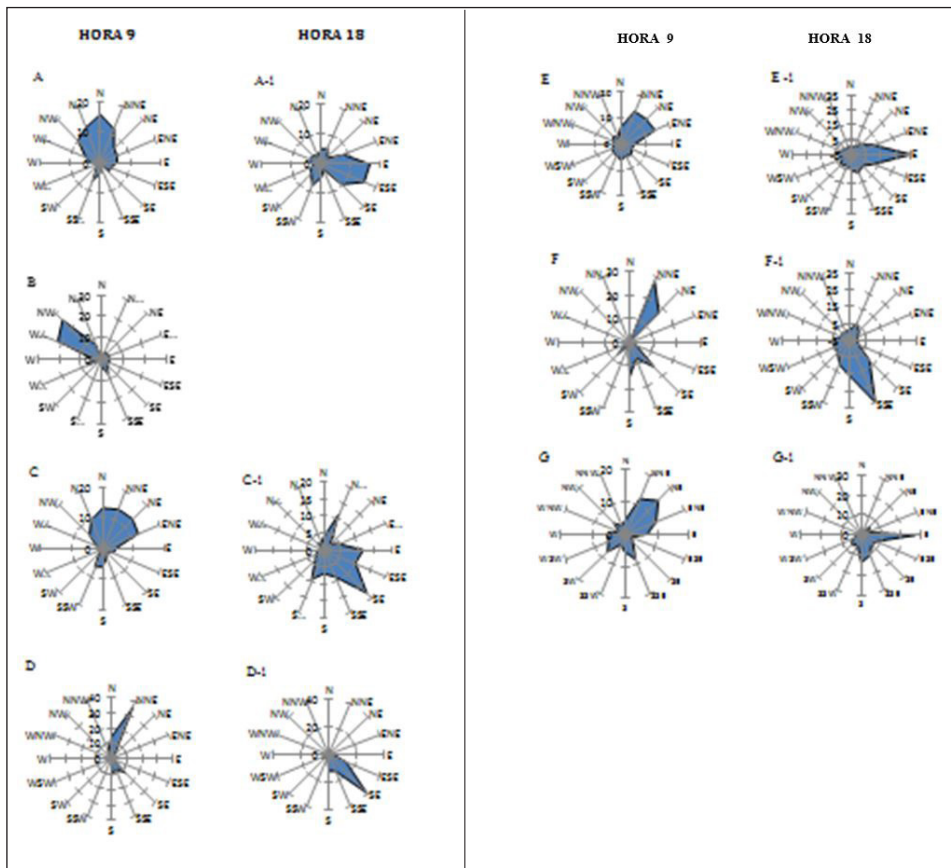
El estudio de vientos de baja intensidad (7 a 25 km .h-1) desde diciembre a marzo de los años 2011, 2012, 2013 y 2014, muestran un predominio de brisas procedentes del cuadrante 1 (0 a 90 °) y 2 (>90 ° a 180°). Analizando tres puntos de la región se observa que, en Colonia del Sacramento, ubicado en el oeste, hay un predominio mayor del componente N, en tanto que en Laguna del Sauce, ubicado en el este, hay un predominio mayor del componente E y S. Esto evidencia una rotación de las brisas en sentido horario desde el W al E de la costa, con mayor influencia del Océano Atlántico. Figura 2.

Figura 2. Frecuencia diaria de la dirección de las brisas de mar y tierra en Colonia del Sacramento (A) en el W de la costa, Juanicó (B) en centro y Laguna del Sauce (C) en el E.



El análisis de las brisas de la mañana (hora 9) y la tarde (hora 18) muestra diferencias en su procedencia según proximidad al mar y zona de la costa.

Figura 3. Dirección de las brisas. Frecuencia diaria de la dirección de la brisa, a la hora 9 y hora 18. Los datos corresponden a los meses de enero a marzo, de los años 2011, 2012, 2013 y 2014. Los sitios se presentan ordenados de W a E de la costa. Referencias: Colonia del Sacramento (A), Mal Abrigo (B), Las Brujas (C), Sayago (D), Punta Brava (E), Empalme Olmos (F) y Laguna del Sauce (G). (No se presentan datos de la hora 18 en sitio B).



A la hora 9 predominan las brisas con componente N, fundamentalmente desde el cuadrante 1. Si se analiza la región evolucionando desde el W, Colonia del Sacramento, hacia el E, Laguna del Sauce, se observa una rotación en sentido horario de la brisa matinal. Esta tendencia se refuerza con la proximidad del mar. Cuando se analizan las brisas a la hora 18, se observa un predominio del cuadrante 2 y una mayor presencia del componente E en las proximidades de la costa, efecto que se refuerza con la mayor exposición oceánica. Estos resultados revelan con claridad el efecto de brisas.

Una situación particular se revela en la zona de Guardia Vieja (datos gráficos no presentados), con una frecuencia importante de brisas procedentes desde el W, WSW y SW durante la hora 9. Este sitio es el de mayor proximidad al Océano Atlántico y presenta condiciones topográficas muy diferentes a las demás regiones estudiadas. La estación

meteorológica de referencia está instalada, en la ladera W de Sierra Ballena, a 60 m sobre el nivel del mar. El paisaje es abierto, frente a la Laguna del Sauce que posee un espejo de agua de aproximadamente 30 km². En la zona de viñedos el terreno presenta una pendiente superior al 8.5%.

3.2 MICROCLIMA DE LA CANOPIA: TEMPERATURAS

Durante el año 2013 la temperatura media de canopia registró diferencias significativas entre los sitios del W en Colonia del Sacramento (Parcela 1 y Parcela 2), con los demás viñedos, a excepción de Punta Yeguas (Parcela 5). En la zona E se registró la temperatura media más baja en la Parcela 9. Tabla 3.

Tabla 3. Temperatura media de canopia y distribución horaria según rango, para el período 23.12 a 28.02, de ciclos productivos 2013 y 2014. Referencias: T_m = temperatura media, T>32 °C=porcentaje de horas con temperaturas superiores a 32 °C, T 20 a 32 °C=porcentaje de horas con temperaturas entre 20 y 32 °C, s/d = sin datos por serie incompleta.

Sitio	Año 2013			Año 2014		
	T _m °C	T > 32 °C (% horas)	T 20 a 32°C (% horas)	T _m °C	T>32°C (% horas)	T 20 a 32°C (% horas)
1	23.7 a	5.2	68.3	24.1 a	8.9	66.6
2	23.7 a	5.1	67.4	24.1 a	9.6	65.2
5	23.2 ab	1.4	73.1	s/d	s/d	s/d
7	23.1 b	9.7	56.9	s/d	s/d	s/d
8	23.1 b	9.0	54.0	23.3 b	9.4	57.0
3	22.9 b	7.6	55.2	23.1 b	7.7	59.3
6	22.7 b	8.7	55.7	s/d	s/d	s/d
9	22.6 b	6.9	52.6	22.6 c	6.4	56.7

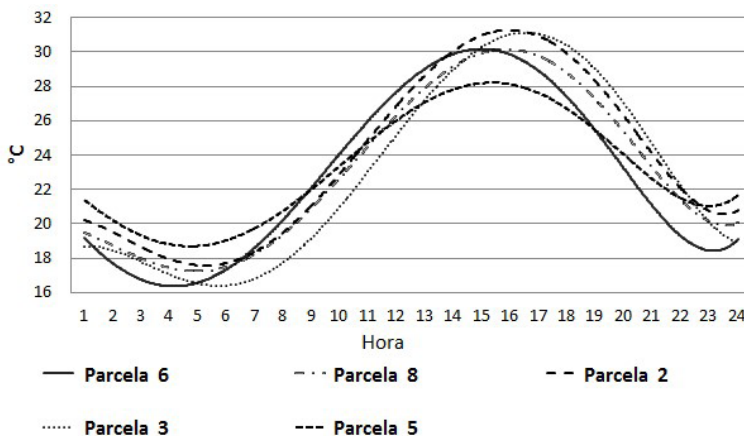
Medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes Test: Tukey, p<0.05.

La comparación interanual (2013 y 2014) de las temperaturas medias entre zonas tiene un ajuste perfecto ($r=1$; $p=0.0003$).

El análisis por rango de temperatura media de canopia “20°C a 32°C” (rango óptimo para fotosíntesis), también muestra una correlación muy alta entre años ($r=0.99$; $p=0.0013$); en tanto no se registró correlación para el rango superior a 32°C.

La evolución diaria de las temperaturas de canopia presenta una evolución particular, dependiente del emplazamiento del viñedo. Figura 4.

Figura 4. Tendencia polinómica ($R^2 > 0.95$) de la evolución diaria de temperatura de canopia en cinco parcelas estudiadas. Período 23.12.2012 a 28.02.2013.



La Parcela 6 ubicada en el centro geográfico presenta menores temperaturas entre las 16hs y 4 hs, mientras que, entre las 8 hs y las 13 hs supera a los demás sitios. A partir de las 13 hs y hasta la noche, los sitios de Colonia del Sacramento (Parcela 1 y Parcela 2) junto a Parcela 3 registran temperaturas medias superiores a los demás viñedos. En la Parcela 5 se registra la menor amplitud térmica. La tendencia en las temperaturas nocturnas marca el siguiente orden descendente: Parcela 5, Parcela 1, Parcela 2, Parcela 4, Parcela 8, Parcela 3, Parcela 6, Parcela 9.

3.3 MICROCLIMA DE LA CANOPIA: HUMEDAD RELATIVA

El contraste de medias permite identificar el efecto año. Tabla 4. El 2014 fue el año más húmedo seguido por 2013 y 2012. En 2012 el sitio más húmedo fue Parcela 5 y los menos húmedos Parcela 7 y Parcela 8. En 2013 los más húmedos son Parcela 9 seguido de Parcela 8 y los menos húmedos Parcela 3, Parcela 6 y Parcela 2. En 2014 el más húmedo es Parcela 9 y el menos húmedo Parcela 2. En la comparación dentro de cada región, se observa que Parcela 9 es más húmedo que Parcela 8 y Parcela 1 más húmedo que Parcela 2.

En relación a la distribución de horas con más de 89 % HR en 2013 y 2014, los sitios de la costa de Maldonado (Parcela 8 y 9) junto a Parcela 3 presentan porcentajes más altos, en tanto que los viñedos de Colonia registraron los porcentajes más bajos. En 2013 Parcela 5 tuvo valores más bajos aún que los registrados en Colonia.

Tabla 4. Humedad relativa media de canopia y frecuencia de cantidad de horas con porcentajes de humedad superior a 89% (%HR>89%), período 08.01 a 28.02, de ciclos productivos 2012, 2013 y 2014. Referencias: s/d = sin datos por serie incompleta.

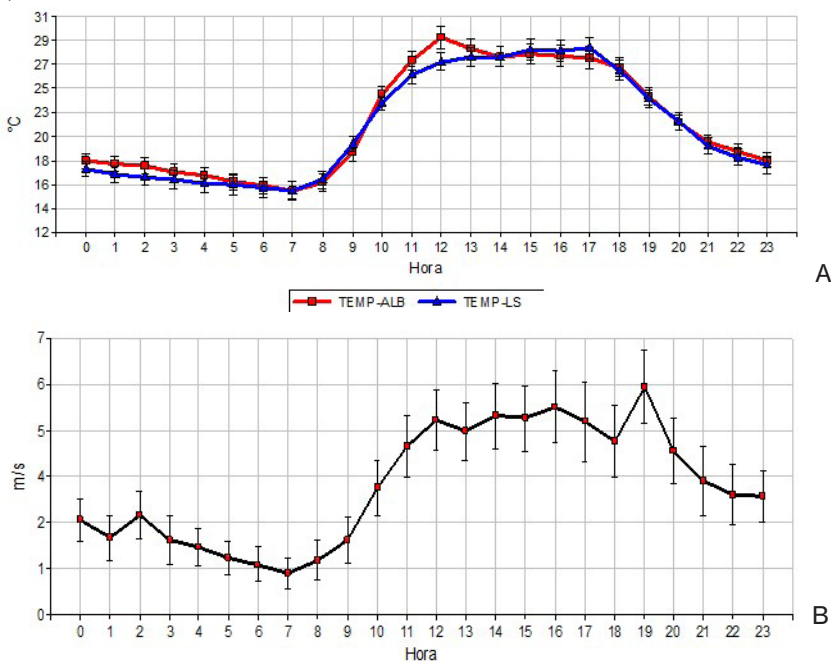
Sitio	% de HR media año 2012	% de HR media año 2013	% de HR media año 2014	%HR >89% año 2013	%HR >89% año 2014
Parcela 9	s/d	75.6 a	84.1 a	32.4	47.3
Parcela 8	71.6 c	74.7 ab	81.5 b	29.4	39.6
Parcela 3	s/d	72.5 c	81.9 b	28.6	43.0
Parcela 7	70.0 c	73.3 bc	s/d	26.4	s/d
Parcela 6	74.3b	71.4 c	s/d	22.2	s/d
Parcela 1	s/d	73.4 bc	82.3 b	18.8	35.0
Parcela 2	s/d	72.2 c	79.5 c	17.4	34.4
Parcela 5	77.5 a	72.9 bc	s/d	12.6	s/d
Media	72.7 b	73.3 b	81.7 a		

Medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes Test: Tukey, $p < 0.05$.

3.4 ESTUDIO DE CASO: BRISAS Y TEMPERATURA DE CANOPIA

Se evaluó la relación entre temperaturas de canopia en las Parcelas 8 y 9 del departamento de Maldonado, ubicadas a 6 km una de otra. La evolución de la temperatura diaria de cada Parcela y la velocidad del viento en estación de referencia se presentan en Figura 5.

Figura 6. Evolución de la temperatura horaria (A) y velocidad de la brisa (B) en Febrero de 2013. Referencias: ALB = Parcela 8, LS = Parcela 9.



Las temperaturas son superiores durante la noche y mediodía en Parcela 8. A partir de la hora 12 la temperatura de Parcela 8 desciende bruscamente para alinearse con respecto a Parcela 9 hasta el final del día. La brisa tiene su menor intensidad durante la noche y asciende con la temperatura del día. Luego de las 19 horas comienza un descenso de la velocidad que se prolonga hasta poco después del amanecer del día siguiente. La evolución de la dirección promedio del viento durante el día se mantuvo desde el segundo cuadrante. El ángulo de rotación promedio diario del viento fue inferior a los 48 °, con una tendencia desde el SE a ESE durante la noche y primeras horas de la mañana, para ir tomando una dirección con mayor peso del S-SSE durante el resto del día. La velocidad del viento tuvo correlación positiva con la dirección ($r = 0,41$; $p < 0,0001$), es decir, el giro en sentido horario de la brisa se asocia con aumentos de intensidad.

3.5 RELACIÓN ENTRE DISTANCIA AL MAR Y VARIABLES CLIMÁTICAS DEL VIÑEDO

Se estableció una regresión entre la distancia al mar (dm) de cada viñedo, con variables térmicas y de humedad de la canopia. Se definió el límite (máximo o mínimo) de las curvas de regresión, para determinar a qué distancia cesaba la influencia del mar.

Tabla 5.

Tabla 5. Fórmulas de ajuste para la regresión distancia al mar (x) vs: temperatura media (Tmed); % de horas de temperatura elevada (>32°C) y rango de temperatura óptimo para fotosíntesis (20-32°C). Medias de las variables térmicas desde 23.12 al 28.02, de las zafras 2013 y 2014. Distancia al mar en km (dm), límite de la función Mínimo o Máximo.

(Y)	(dm) ²	(dm)	Constante	Límite (dm) Mínimo o Máximo	R ²	p-valor
Tmed 2013 °C	0,0012	-0,07	23,66	29,17	0,63	0,0480
>32°C 2013	-0,0100	0,50	3,13	25,00	0,68	0,0500
20-32°C 2013	0,0300	-1,64	72,69	27,33	0,97	0,0001
Tmed 2014 °C	0,0021	-0,12	24,41	28,57	0,86	0,0070
>32°C 2014	ns	ns	ns	ns	ns	0,2850
20-32°C 2014	0,0200	-0,96	68,14	24,00	0,99	<0,0001

De acuerdo a los resultados, existe influencia marina sobre la temperatura media de canopia que disminuye hasta una distancia a la costa de 29.17 km y 28.57 km según el año. El porcentaje de horas diurnas en el rango de temperatura óptimo para fotosíntesis (20 a 32°C) desciende, desde la costa hacia el continente, hasta los 27,33 km o 24,00 km. Finalmente el porcentaje de horas con temperaturas superiores a 32 °C aumenta hasta los 25 km en 2013, en tanto que no se pudo establecer correlación en 2014.

La temperatura nocturna durante el mes de febrero, cuando ocurre buena parte de la maduración, tiene correlación negativa con la distancia al mar, a excepción del sitio Parcela 3 donde no habría influencia.

El estudio de la amplitud térmica de viñedos (a excepción de la Parcela 3) durante el mismo período, aumenta hasta los 13 km, para luego descender lentamente. Su comportamiento se representa en la ecuación (1).

$$y = -0.02x^2 + 0.52x + 10.55 \quad (1)$$

Dónde:

y = amplitud térmica diaria expresada en °C

x = distancia al mar expresada en km

4 DISCUSIÓN

La mayor dificultad en el desarrollo de una estadística de días de brisa, consiste en separar los componentes determinados por la circulación local de origen térmico y las debidas a los movimientos de escala sinóptica (Salvador y Millán 2003). Sin embargo, las estimaciones realizadas previamente para una zona más amplia de la región estudiada, que incluyó también la costa Atlántica (Colby et al 2004) refuerzan los resultados obtenidos en este trabajo.

La dirección diaria de la brisa según la localización en la costa se ve reforzada por su proximidad a la costa y, en particular su cercanía con el Océano Atlántico. En la rotación de los vientos, además de las diferencias en el gradiente térmico mar-tierra, estaría implicada la fuerza de Coriolis (Salvador y Millán 2003), desviando la trayectoria del flujo a la izquierda en el Hemisferio Sur, según lo señalado por García Skabar (2017).

En el estudio de caso, el descenso “brusco” de temperatura a partir de la hora 12 en la Parcela 8, respecto a la Parcela 9, se explicaría porque a partir de esa hora la intensidad de la brisa alcanza el primer pico de velocidad (superior a $5\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) y su dirección es de 154° , alineada perfectamente con la dirección de las filas del viñedo. Esa brisa, que actúa como un frente frío, no afecta del mismo modo la Parcela 9 que se encuentra “protegida” por una elevación perpendicular a la dirección del viento. Por otra parte, la presencia de brisa matinal originada desde el W, WSW y SW, observada en la zona de Guardia Vieja podría explicarse por la topografía. Se plantea como hipótesis la posibilidad la existencia de una brisa de “Valle”, que asciende en horas de la mañana desde la Laguna del Sauce hacia el viñedo.

Las fuertes implicaciones del clima sobre el funcionamiento de la vid, hacen necesario cuantificar los umbrales climáticos óptimos y extremos para los procesos

fisiológicos, tales como la fotosíntesis y respiración, a fin de determinar la aptitud vitícola de una región (Urrutia, 1993). En tal sentido, se determinó que, durante los meses de enero-febrero de los años 2013 y 2014 la temperatura media de canopia y la cantidad de horas dentro del rango óptimo para fotosíntesis registró diferencias entre los sitios con una tendencia que disminuye de W a E, con excepción de Parcela 5 (Punta Yeguas) que fue similar a lo indicado para el W.

En relación a la humedad de canopia, el contraste de medias permite identificar el efecto año, siendo el 2014 el más húmedo, seguido por 2013 y 2012. Los resultados también mostraron diferencias entre sitios, encontrando los valores más altos de humedad en las Parcelas 5 y 9.

La distribución relativa en la cantidad de horas dentro del rango de humedad predisponente para la aparición de enfermedades fúngicas, mostraron que los predios del E junto a Parcela 3 (Mal Abrigo) tuvieron los valores más altos, en tanto que los más bajos se registraron en el W y en Parcela 5 en 2013.

Las tendencias en la temperatura y humedad en la costa del Río de la Plata son consistentes con las diferencias de irradiación solar (datos no presentados) que siguen una tendencia decreciente de W-E durante los meses de verano.

Las diferencias en el microclima de canopia responden fundamentalmente a las características sinópticas, pero también, serían resultado de fenómenos meteorológicos locales que afectan las temperaturas, la humedad, las precipitaciones, y la superficie del flujo de aire (Zhang *et al.*, 2005). Los resultados presentados confirmarían esta afirmación.

El momento del día en que se produce la máxima intensidad de la brisa marina depende de la proximidad al mar y la latitud, entre otros factores. En la costa de la Bahía de Todos los Santos, México, sobre el Trópico de Cáncer, la mayor intensidad de la brisa se alcanza a la hora 14 (Reyes y Pares 1983). En tanto que para la Bahía de Arauco, Chile, ubicada aproximadamente 2 ° al sur de la latitud de las parcelas 8 y 9 estudiadas en Uruguay, la máxima intensidad de la brisa marina se produce alrededor de las 16 hs (Urrutia 1993).

El análisis detallado de los resultados permite concluir que existe influencia evidente del mar sobre la temperatura de la canopia, hasta los 18 a 20 km que permanece, según sea la variable, hasta los 24,0 y 29,2 km. La proximidad al mar promueve mayor temperatura nocturna, menor temperatura diurna y en consecuencia menor amplitud térmica, pero mayor porcentaje de horas con temperaturas óptimas para fotosíntesis. Los rangos de distancia bajo influencia marina resultaron similares a la distancia de penetración de la brisa marina en otras regiones del mundo: 35 km en Cape Town, a las 17:00 hs, con un

efecto de enfriamiento que declina rápidamente con la distancia de la costa (Bonnardot *et al.*, 2002) o usualmente inferior a los 20 km en New England (Colby 2004).

La relación entre distancia al mar y humedad relativa de la atmósfera no mostró resultados coherentes. Solo pudo demostrarse la correlación en el año 2013, en que se verificó correlación positiva entre la humedad superior al 89 % y la distancia. El año 2013 fue el único de los cuatro estudiados clasificado como “Neutro”, según el fenómeno El Niño Southern Oscillation (ENSO). Es posible que el efecto de las condiciones a escala sinóptica no permitiera discriminar en los años 2011, 2012 y 2014, la influencia de los factores geográficos sobre la humedad de la canopia. Finalmente, se plantea como hipótesis un papel relevante del “grado de apertura del paisaje”. Esto surge por comparación de situaciones dentro de cada zona y dentro de cada predio, en la que los registros de humedad relativa son menores para las posiciones topográficas más altas y abiertas.

De acuerdo a las características particulares de cada sitio y año se generaron diferencias en las condiciones de temperaturas y humedad del viñedo capaces de modificar los rendimientos, la fenología, la composición de la uva (Soar *et al.*, 2008), así como la puntuación general de la cosecha y la calidad del vino (Jones y Davis 2000).

5 CONCLUSIÓN

El presente estudio investigó las características de los vientos de baja intensidad en la zona vitícola de la costa Uruguaya del Río de la Plata, por sus fuertes implicaciones sobre funcionamiento de la vid.

Se caracterizó el comportamiento de los vientos durante el ciclo vegetativo, en particular de las brisas de mar y tierra durante los meses de verano, para seis regiones vitícolas. El grado de influencia de la brisa sobre el microclima del viñedo es dependiente de la distancia a la costa y del volumen de la masa de agua (del Río de la Plata u Océano Atlántico).

Los resultados justifican una profundización de los estudios para conocer con mayor profundidad, la incidencia de la brisa sobre las variables de respuesta de la planta y definir el potencial vitícola del terroir.

REFERENCIAS

Abbs, D. and Physick, L. (1992): Sea-breeze observations and modelling: a review. 349 Australian Meteorological Magazine, 41, 7-19.

Banta, R. M., Olivier, L. D., & Levinson, D. H. (1993). Evolution of the Monterey Bay sea-breeze layer as observed by pulsed Doppler lidar. *Journal of Atmospheric Sciences*, 50(24), 3959-3982.

- Bidegain, M., Severova, V., & De los Santos, B. (2009). Climatología Regional de Base. *Climatología de base de variables climáticas, nivel medio del mar y mapas de riesgo geológico, Informe N° II: Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Ciencias. Proyecto URU/07/G32.*
- Bonnardot, V., Carey, V., & Cautenet, S. (2002). Diurnal wind, relative humidity and temperature variation in the Stellenbosch-Groot Drakenstein wine-growing area. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 23(2), 62-71.
- Colby, F. P. (2004). Simulation of the New England sea breeze: The effect of grid spacing. *Weather and forecasting*, 19(2), 277-285.
- García Skabar, Y. (2007). *Análisis enriquecidos, evaluación de su impacto en el pronóstico y su aplicación para describir circulaciones de mesoescala en el centro y norte de Argentina* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Jones, G. y R. E. Davis. 2000. *Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. Am. J. Enol. Vitic.* 51(3): 249
- Miller, S. T. K., Keim, B. D., Talbot, R. W., & Mao, H. (2003). Sea breeze: Structure, forecasting, and impacts. *Reviews of geophysics*, 41(3).261.
- Ohashi, Y., & Kida, H. (2001). Observational results of the sea breeze with a weak wind region over the northern Osaka urban area. *Journal of the Meteorological Society of Japan. Ser. II*, 79(4), 949-955.
- Planchon, O., & Cautenet, S. (1997). Rainfall and sea-breeze circulation over south-western France. Miller, S. T. K., Keim, B. D., Talbot, R. W., & Mao, H. (2003). Sea breeze: Structure, forecasting, and impacts. *Reviews of geophysics*, 41(3).
- Pienika, R., & Cataldo, J. (2012). Análisis estadístico de datos climáticos aplicado a la clasificación de zonas vitícolas en Uruguay. In *II Congreso Latinoamericano de Ingeniería de Vientos (CLIV)(La Plata, 5, 6 y 7 de diciembre de 2012).*
- Reyes, S. Y., & Parés, A. (1983). Análisis de componentes principales de los vientos superficiales sobre la bahía de todos santos. *Geofísica Internacional*, 22(2).
- Sakazaki, T., & Fujiwara, M. (2008). Diurnal variations in summertime surface wind upon Japanese plains: Hodograph rotation and its dynamics. *Journal of the Meteorological Society of Japan. Ser. II*, 86(5), 787-803.
- Salvador, R; Millán, M. (2003). Análisis histórico de las brisas en Castellón. *TETHYS, Revista de Meteorología*, 2:21-19. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7411981>
- Schumann, E. H., Illenberger, W. K., & Goschen, W. S. (1991). Surface winds over Algoa Bay, South Africa. *S. Afr. J. Sci.*, 87, 202-207.
- Soar, C. J., Sadras, V. O., & Petrie, P. R. (2008). Climate drivers of red wine quality in four contrasting Australian wine regions. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(2), 78-90.
- Urrutia, A. 1993. Análisis del comportamiento de la pluma del río Biobío en base a un estudio de sus campos de temperatura, salinidad, densidad y de movimiento. *Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales*, EULA, Universidad de Concepción, 195 pp.
- Zhang, Y., Chen, Y. L., Schroeder, T. A., & Kodama, K. (2005). Numerical simulations of sea-breeze circulations over northwest Hawaii. *Weather and forecasting*, 20(6), 827-846.

CAPÍTULO 12

CAPTURA DE CARBONO EN EL SUELO CON PRÁCTICAS DE MANEJO AGRONÓMICO EN MAÍZ PARA GRANO DE TEMPORAL

Data de submissão: 04/01/2023

Data de aceite: 20/01/2023

Humberto Ramírez-Vega

Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de los Altos
Tepatitlán de Morelos, Jalisco
México
ORCID: 0000-0002-5935-4618

Hugo Ernesto Flores-López

Campo Experimental
Centro Altos de Jalisco. INIFAP
Tepatitlán de Morelos, Jalisco
México
ORCID: 0000-0003-0847-2347

Gloria Vidrio-Llamas

Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de los Altos
Tepatitlán de Morelos, Jalisco
México
ORCID: 0000-0001-7466-5206

Irma Julieta González-Acuña

Campo Experimental
Santiago Ixcuintla. INIFAP
Santiago Ixcuintla, Nayarit
México
ORCID: 0000-0002-0027-1359

Celia de la Mora-Orozco

Campo Experimental
Centro Altos de Jalisco. INIFAP
Tepatitlán de Morelos, Jalisco
México
ORCID: 0000-0002-3675-6569

RESUMEN: El calentamiento global terrestre y el cambio climático están entre los principales problemas que enfrenta actualmente la humanidad. Es causado por la emisión de gases con efecto de invernadero, entre ellos el CO₂. Una manera de mitigación del cambio climático es la captura de carbono orgánico en el suelo (COS) en sistemas cultivo como maíz. El objetivo del presente estudio fue evaluar prácticas de manejo agronómico sobre la captura de COS en maíz para grano de temporal en Tepatitlán de Morelos, Jalisco. El estudio se realizó en 2019 y 2020, en el experimento de largo plazo del CECEAJAL sembrada con maíz en condiciones de temporal. Este experimento integra prácticas de manejo de labranza, cobertura de suelo con residuos de maíz, tipos de surco y dos tipos de fertilización en 18 tratamientos. El porcentaje de carbono orgánico medido en el suelo se utilizó el método de Dumas, con análisis para densidad aparente del suelo y profundidad de 20 cm. En el análisis de información se aplicó estadística descriptiva, con el programa EXCEL. Los resultados muestran que los factores que constituyen los tratamientos

estudiados analizados de manera individual, todos muestran pérdida de COS, pero cuando se analizaron sus interacciones, solo los tratamientos de labranza de conservación, con 50% de residuos, surco ancho y fertilización orgánica, y el tratamiento de labranza de conservación, con 100% de residuos, surco ancho y fertilización mineral tuvieron captura de COS positiva. Es necesario rediseñar los tratamientos involucrando manejo integrado de nutrientes, prácticas de conservación de agua, aumento en la fertilidad del suelo y rotación de cultivos.

PALABRAS CLAVE: Estiércol. Labranza de conservación. Fertilización química.

SOIL CARBON CAPTURE WITH AGRONOMIC MANAGEMENT PRACTICES IN RAINFED CORN FOR GRAIN

ABSTRACT: Terrestrial global warming and climate change are among the main problems currently facing humanity. It is caused by the emission of greenhouse gases, including CO₂. One way to mitigate climate change is the sequestration of organic carbon in the soil (SOC) in crop systems such as corn. The objective of this study was to evaluate agronomic management practices on SOC capture in corn for rainfed grain in Tepatitlán de Morelos, Jalisco. The study was carried out in 2019 and 2020, in the long-term experiment of CECEAJAL planted with corn under rainfed conditions. This experiment integrates tillage management practices, soil cover with maize residues, furrow types, and two types of fertilization in 18 treatments. The percentage of organic carbon measured in the soil was used using the Dumas method, with analysis for bulk density of the soil and depth of 20 cm. In the information analysis, descriptive statistics were applied, with the EXCEL program. The results show that the factors that constitute the studied treatments analyzed individually, all show loss of SOC, but when their interactions were analyzed, only the conservation tillage treatments, with 50% residues, wide furrow and organic fertilization, and the conservation tillage treatment, with 100% residues, wide furrow and mineral fertilization had positive COS capture. It is necessary to redesign the treatments involving integrated nutrient management, water conservation practices, increase in soil fertility and crop rotation.

KEYWORDS: Manure. Conservation tillage. Chemical fertilization.

1 INTRODUCCIÓN

El calentamiento global terrestre y el cambio climático están entre los principales problemas que enfrenta actualmente la humanidad. Estos problemas se consideran se han originado por la emisión de los denominados gases de efecto de invernadero, principalmente la liberación de dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera terrestre procedente de la quema de combustibles fósiles. En los últimos años México ha contribuido con más de 471.2 Mt de CO₂e en 2018, pero se ha reportado que el sector agropecuario aportaba el 12.3% de las emisiones de CO₂e, principalmente de como N₂O y CH₄, por emisiones de actividades agrícolas debidas a la aplicación de fertilizantes nitrogenados, cultivos de arroz, y quema de residuos agrícolas y actividades pecuarias por fermentación entérica

y manejo del estiércol (INECC. 2018). Una manera de mitigación del cambio climático es con la captura de carbono en el suelo dentro de los sistemas cultivo (Paustian et al., 1997).

Jarecki y Lal (2005) mencionaron que los suelos del mundo contienen la mayor reserva de carbono orgánico terrestre (Corg) y son potencialmente un importante sumidero de C para compensar las emisiones de CO₂. En suelos agrícolas existen dos factores importantes que influyen el secuestro de C: 1) la entrada de C al suelo, que depende del rendimiento de los cultivos, la rotación, la fertilización y la aplicación de sustancias orgánicas como abonos y otros biosólidos, y 2) el manejo del suelo, como la labranza del suelo y el mantenimiento de los residuos de cultivos, donde la agricultura sin labranza (ASL) es un sistema de manejo que reduce la pérdida de materia orgánica del suelo (MOS). Sin embargo, la efectividad del manejo de ASL en el secuestro de carbono orgánico del suelo (COS) depende del clima y las propiedades del suelo (Lal, 2004).

El COS influye en la mayoría de las propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo vinculadas con su: 1) calidad, 2) sustentabilidad y 3) capacidad productiva por lo que, con un manejo sustentable del suelo, el COS debe mantenerse o aumentarse (Martínez et al., 2008). Este autor mencionó que el COS se vincula con la cantidad y disponibilidad de nutrientes del suelo, al aportar elementos como el N normalmente deficitario, por esta razón el COS está asociado con la MOS que proporciona coloides de alta capacidad de intercambio catiónico, con efecto en las propiedades físicas edáficas manifestadas en la modificación de la estructura y la distribución del espacio poroso del suelo. El objetivo del presente estudio fue evaluar prácticas de manejo agronómico sobre el contenido de Carbón Orgánico del Suelo en maíz para grano de temporal en Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Campo Experimental Centro Altos de Jalisco (CECEAJAL), del Centro de Investigaciones Regionales Pacífico Centro del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, localizado en Tepatitlán de Morelos, Jalisco. El clima de acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por Enriqueta García es (A)C(w₁)(w₂)(e)g, con lluvia promedio anual es de 869 mm, temperaturas máxima, mínima y media promedio anuales de 25.7, 7.7 y 16.7 °C, respectivamente. El suelo del CECEAJAL es una mezcla fina isotérmica, Udic Rhodustalf. La pendiente del terreno es 2.1 %.

Se evaluó la concentración de Carbón Orgánico del Suelo (COS) en experimento de largo plazo del CECEAJAL, sembrada con maíz en temporal, experimento establecido en 2012. Los tratamientos que contiene esta plataforma son 18, con la combinación de

los factores: 1) tres tratamientos con labranza, 2) tres coberturas del suelo con residuos de la cosecha anterior de maíz, 3) surcos anchos y angostos, y 4) fertilización con dos productos mineral y orgánico (Gallinaza), como se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos de manejo agronómico utilizados en experimento de largo plazo del Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco.

NÚM. TRAT.	ROTACIÓN	PRACTICA DE LABRANZA	RESIDUOS DE CULTIVO (%)	TIPO DE CAMA	FERTILIZACIÓN
1	M-M	Tradicional 1 (Barbecho+ 2 pasos de rastra)	30	Surco angosto	Orgánica
2	M-M	Tradicional 1 (Barbecho+ 2 pasos de rastra)	30	Surco angosto	Química
3	M-M	Tradicional 2 (3 pasos de rastra)	30	Surco angosto	Orgánica
4	M-M	Tradicional 2 (3 pasos de rastra)	30	Surco angosto	Química
5	M-M	Conservación	30	Surco ancho	Orgánica
6	M-M	Conservación	30	Surco ancho	Química
7	M-M	Conservación	30	Surco angosto	Orgánica
8	M-M	Conservación	30	Surco angosto	Química
9	M-M	Conservación	50	Surco ancho	Orgánica
10	M-M	Conservación	50	Surco ancho	Química
11	M-M	Conservación	50	Surco angosto	Orgánica
12	M-M	Conservación	50	Surco angosto	Química
13	M-M	Conservación	100	Surco ancho	Orgánica
14	M-M	Conservación	100	Surco ancho	Química
15	M-M	Conservación	100	Surco angosto	Orgánica
16	M-M	Conservación	100	Surco angosto	Química
17	TESTIGO Manejo de maíz, control biótico especial	Conservación	50	Surco angosto	Orgánica
18	TESTIGO Manejo de maíz con control biótico convencional	Conservación	50	Surco angosto	Química

El contenido de carbono orgánico en el suelo (COS) se midió antes del inicio de lluvias del 2019 y 2020. Se muestreo el suelo a una profundidad de 20 cm en cada uno de los 18 tratamiento, solo en la repetición uno. El análisis del suelo para medir el porcentaje de COS se realizó en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del INIFAP en el Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. Se utilizó el método de Dumas, con un equipo analizador Elemental Flash 2000. La densidad aparente del suelo se determinó con el método de probeta. El contenido de Carbono Orgánico en el suelo (Corg) se calculó con la formula siguiente: $Corg = \%COS \times DaxProf$, donde *Corg* es el contenido de COS en suelo (tonC/ha), %COS es el porcentaje de concentración de carbono orgánico del suelo (%), Da es la densidad aparente (g/cm³) y Prof es la profundidad del suelo del muestreo (cm), en este caso de 20 cm (González-Molina et al., 2008). La tasa de cambio del COS se determinó con a expresión: $\Delta COS = COS_{2020} - COS_{2019}$. El análisis de información se aplicó estadística descriptiva, con el programa EXCEL.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 presenta el contenido de carbono orgánico en el suelo (COS) de cada factor evaluado en 2019 y 2020, y la tasa de cambio de COS ocurrida en estos años, correspondientes a la repetición número 1 del experimento de largo plazo. Se observa que de acuerdo con la tasa de cambio de COS todos los factores de los tratamientos tuvieron pérdida de carbono orgánico, por el valor negativo en el valor de COS. La labranza del manejo del suelo con barbecho + 2 paso de rastra mostró la mayor pérdida de COS, mientras con 3 pasos de rastra fue menor. Los residuos de la cosecha con mayor la pérdida de COS fue con 30% y menor con 100%. La fertilización orgánica mostró pérdida de COS más alta y menor con fertilización mineral. El surco ancho presentó menor pérdida de COS y mayor con surco angosto.

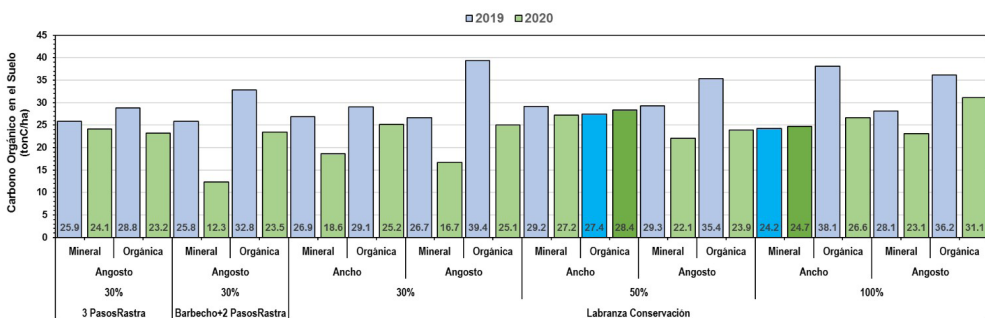
Cuadro 1. Contenido de carbono orgánico en el suelo de acuerdo con los componentes de cada tratamiento, en la repetición número 1 del experimento de largo plazo del Campo Experimental Centro Altos de Jalisco en 2019 y 2020.

Tratamiento	Carbono Orgánico en el suelo (tonC/ha)		
	2019	2020	ΔCOS
Labranza			
Barbecho + 2 Pasos de Rastra	29.3	17.9	-11.4
Labranza Conservación	31.0	24.2	-6.9
3 Pasos Rastra	27.4	23.7	-3.7
Residuos (%)			
30	29.4	21.1	-8.3
50	31.0	24.6	-6.4
100	31.7	26.4	-5.3

Tratamiento	Carbono Orgánico en el suelo (tonC/ha)		
	2019	2020	ΔCOS
Fertilización			
Orgánica	33.6	25.6	-8.0
Mineral	27.3	21.2	-6.1
Surco			
Ancho	29.2	25.1	-4.0
Angosto	31.1	22.6	-8.5

Sin embargo, en la Figura 1 se muestran las interacciones entre los factores de los tratamientos estudiados sobre tasa de cambio en el COS (ΔCOS). En esta figura se observa que el suelo en 2019 tenía mayor contenido de COS, con reducción de COS para 2020 en casi todos los tratamientos, produciendo una ΔCOS negativa, lo que implicó pérdida de carbono orgánico. Solo dos tratamientos tuvieron ΔCOS positivo, el tratamiento de labranza de conservación, con 50% de residuos, surco ancho y fertilización orgánica, y el tratamiento de labranza de conservación, con 100% de residuos, surco ancho y fertilización mineral, ambos indicados con colores diferentes en la Figura 1.

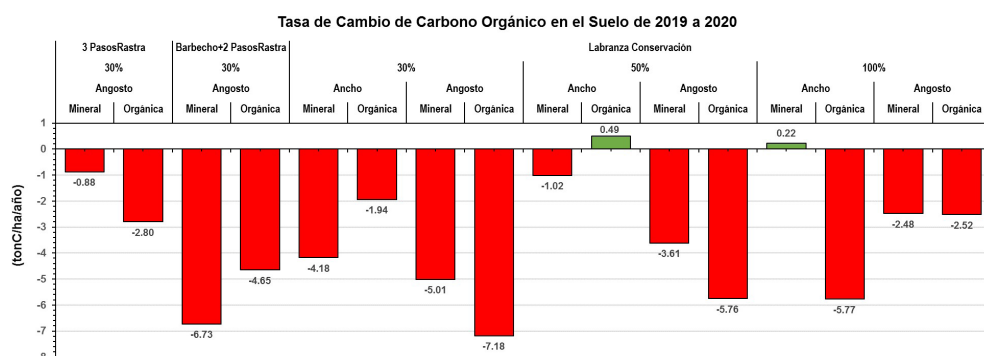
Figura 1. Contenido de Carbono Orgánico del Suelo por efecto de la fertilización, tipo de surco, porcentaje de residuos de maíz de la cosecha anterior y el tipo de labranza medidos en 2019 y 2020, en temporal de Tepatitlán de Morelos, Jalisco.



Las ΔCOS en los tratamientos estudiados se muestran en la Figura 2. No se observa un patrón en las interacciones de los tratamientos, pero las mayores pérdidas de carbono orgánico se observan en labranza con barbecho más dos pasos de rastra con 30% de residuos, surco angosto y fertilización mineral, y en labranza de conservación con 30% de residuos, surco angosto y fertilización orgánica. Dado que el experimento se desarrolló en condiciones temporal, los resultados obtenidos reflejan la complejidad de los procesos involucrados en la captura de carbono con las prácticas de manejo utilizadas (Tremblay *et al.*, 2012). La captura de COS se atribuye con importante influencia por la

disponibilidad de nutrientes en la zona radical y controlada por los efectos integrados de las propiedades del suelo, las características de las plantas y las interacciones entre las raíces de las plantas y los microorganismos (Zhang et al., 2010). De acuerdo con otros estudios, es necesario rediseñar el manejo del cultivo, considerando el rendimiento meta y la extracción de nutrientes durante el temporal, utilizando manejo integrado de nutrientes (Trivedi et al., 2020; Wang et al., 2007), el uso de otros productos orgánicos como como el estiércol de bovino (Salazar-Sosa et al., 2010), prácticas que permitan la conservación del agua en el suelo (Wang et al., 2011), rotación de cultivos (Lal, 2010), entre otros.

Figura 2. Tasa de Cambio en el contenido de Carbono Orgánico del Suelo (ΔCOS) por factores de tratamientos en estudio: fertilización, tipo de surco, porcentaje de residuos de maíz de la cosecha anterior y tipo de labranza en 2019 y 2020, en temporal de Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.



4 CONCLUSIONES

El análisis individual de los factores que constituyeron los tratamientos en estudio, mostraron pérdida de carbono orgánico en el suelo (Corg). Pero con la interacción de los factores en estudio, solo dos tratamientos mostraron tasa de cambio en el carbono orgánico del suelo. Es necesario rediseñar el manejo del cultivo para aumentar la captura de carbono en el suelo, considerando el manejo integrado de nutrientes, prácticas que permitan la conservación del agua en el suelo, rotación de cultivos, entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

González-Molina, L., J. D. Etchevers-Barra y C. Hidalgo-Moreno. 2008. Carbono en suelos de ladera: factores que deben considerarse para determinar su cambio en el tiempo. *Agrociencia*, 42:741-751.

INECC. 2018. Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero. Tomado de: <https://www.gob.mx/inecc/acciones-y-programas/inventario-nacional-de-emisiones-de-gases-y-compuestos-de-efecto-invernadero> Fecha de acceso: 20-12-2022.

Jarecki, M.K., and R. Lal. 2005. Soil organic carbon sequestration rates in two long-term no-till experiments in Ohio. *Soil Science*, 170(4):280-291.

- Lal, R. 2004. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. *Science*, 304:1623-1627.
- Lal, R. 2010. Carbon Sequestration Potential in Rainfed Agriculture. *Indian J. Dryland Agric. Res. & Dev.*, 25(1):1-16.
- Martínez H., E., J.P. Fuentes E. y E. Acevedo H. 2008. Carbono orgánico y propiedades del suelo. *R.C. Suelo Nutr. Veg.*, 8:68-96.
- Paustian, K., O. Andrén, H.H. Janzen, R. Lal, P. Smith, G. Tiad, H. Tiessen, M. Van Noordwijk, and P.L. Woorner. 1997. Agricultural soils as a sink to mitigate CO₂ emissions. *Soil Use and Management*, 13:230-244.
- Salazar-Sosa, E., H. I. Trejo-Escareño, J. D. López-Martínez, C. Vázquez-Vázquez, J. S. Serrato-Corona, I. Orona-Castillo y J.P. Flores-Márgez. 2010. Efecto residual de estiércol bovino sobre el rendimiento de maíz forrajero y propiedades del suelo. *Terra Latinoamericana*, 28:381-390.
- Trivedi, A., R. Bhattacharyya, D. R. Biswas, S. Das, T. K. Das, P. Mahapatra, D. K. Shahi, and C. Sharma. 2020. Long-term impacts of integrated nutrient management with equivalent nutrient doses to mineral fertilization on soil organic carbon sequestration in a sub-tropical Alfisol of India. *CARBON MANAGEMENT*. 11(5):483–497.
- Wang, T.C., L. Weia, H.Z. Wang, S.C. Ma, and B.L. Ma. 2011. Responses of rainwater conservation, precipitation-use efficiency and grain yield of summer maize to a furrow-planting and straw-mulching system in northern China. *Field Crops Research* 124:223–230.
- Wang, X., D. Cai, W.B. Hoogmoed, U.D. Perdok, and O. Oenema. 2007. Crop residue, manure and fertilizer in dryland maize under reduced tillage in northern China: I. grain yields and nutrient use efficiencies. *Nutr Cycl Agroecosyst*, 79:1-16.

CAPÍTULO 13

RECURSOS GENÉTICOS DEL MAÍZ DESPOJO Y RESISTENCIA

Data de submissão: 15/01/2023

Data de aceite: 03/02/2023

Yolanda Cristina Massieu Trigo
https://sia.xoc.uam.mx/sia/profesor_investigador/resp.php?index=18525

RESUMEN: El texto da elementos para comprender la problemática en torno a los recursos genéticos (RG). Se comienza situando las principales características del conflicto a nivel internacional, que tienen que ver con la acelerada destrucción de la biodiversidad y los RG que contiene, distinguiendo entre los RG silvestres y agrícolas. Se especifica en estos últimos para situar el análisis en México referente al maíz, del cual el país posee una riqueza importante por ser centro de origen y diversificación de la planta. Se menciona la existencia de una tecnología ancestral agroecológica, aún presente en México, que han conservado las variedades nativas de maíz. Se consideran el valor de esta diversidad genética y las amenazas hacia ella. Se complementa con una breve descripción de las políticas gubernamentales actuales en el país, pues por primera vez en décadas hay esfuerzos por apoyar a los pequeños productores y la siembra de la milpa.

PALABRAS CLAVE: Maíz. Diversidad genética. Amenazas. Milpa.

MAIZE GENETIC RESOURCES. DISPOSSESSION AND RESISTANCE

ABSTRACT: This essay gives items concerning genetic resources (GR) problema. It starts describing main characteristics of this conflict in the world, that are related to recent accelerated biodiversity extinction and its GR, making a difference between wild and agricultural ones. I specify in the latter about maize in Mexico, a country that is center of origin of the plant and possesses a wide diversity of maize races and varieties. At this point I mention an antique agroecology technology named as milpa, which has preserved native maize varieties. I consider this diversity's value and threats it faces. As a complement, I make an analysis of recent government programs that support small scale producers and milpa production.

KEYWORDS: Maize. Genetic diversity. Threats. Milpa.

1 INTRODUCCIÓN

El objetivo de este capítulo es fundamentar la importancia de los recursos genéticos (RG) agrícolas, específicamente del maíz en México, para la producción de alimentos, mantenimiento de los ecosistemas y supervivencia de la humanidad, ante una crisis socioambiental global que se ha agravado con la pandemia de COVID 19.

Inicio con consideraciones generales sobre la trascendencia de los RG, y específico acerca de la milpa, policultivo ancestral mesoamericano aún practicado por los campesinos mexicanos, que ha conservado la diversidad genética del maíz mexicano. Describo los programas del gobierno mexicano actual que buscan favorecer a los campesinos y la siembra de la milpa, en los que hay una valoración positiva, por primera vez en décadas, de la agricultura campesina y los RG del maíz. En el mismo apartado documento las amenazas al sistema milpa y la diversidad genética del maíz mexicano.

2 EL CONFLICTO DE LOS RECURSOS GENÉTICOS (RG) AGRÍCOLAS

El Convenio de Diversidad Biológica define los RG como “el material genético de valor real o potencial. Esta norma reafirma en su presentación que “los Estados tienen derechos soberanos sobre sus propios recursos biológicos” (Naciones Unidas, 1992: 4). La diferencia entre RG y recursos biológicos radica en que en los primeros la valoración de mercado está directamente relacionada con la utilización del material genético del ser vivo, y en los segundos la utilidad y valor mercantil pueden deberse a otras características. Los RG y biológicos son entendidos como parte de la biodiversidad en su conjunto y su importancia ha crecido desde el inicio de la ingeniería genética en los años 90, dado que es la principal fuente de material genético para elaborar nuevos productos biotecnológicos, como medicinas y alimentos (Massieu y Chapela, 2006: 329).

El conflicto respecto al acceso y uso de los RG se debe a que frecuentemente se colectan por grandes corporaciones y gobiernos de países centrales en países periféricos (los más ricos en biodiversidad), y no hay retribución para las comunidades locales, indígenas y mestizas que los han preservado por generaciones. Este conflicto existe a partir de que hay beneficios económicos por su colecta, dado que la ingeniería genética, dominada por un puñado de países centrales, permite su manipulación y uso de manera semejante a un insumo industrial.

A partir de la Cumbre de la Tierra en 1992, donde se originó el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), se han sucedido acuerdos y tratados internacionales acerca del acceso y los derechos de comunidades indígenas, y el reparto equitativo de beneficios para la utilización sustentable de los recursos biológicos.

Hay concepciones diferentes en cuanto a la utilización de los recursos en las empresas interesadas en la colecta y la cosmovisión de las comunidades locales. Si se analizan las narrativas de comunidades indígenas mexicanas con respecto a la relación con la naturaleza, los otros seres vivos y la agricultura, se encuentra que priva el criterio

de usarlos, pero no abusar en aras de conseguir mayor ganancia. La relación no es necesariamente armónica, y se caracteriza por concebir a seres vivos y otras fuerzas naturales como animados, en una relación horizontal con el ser humano. Este último debe tener un comportamiento respetuoso, so pena de sufrir castigos, como los cazadores que dejan heridos a los animales o matan hembras preñadas. Frecuentemente plantas, animales y fuerzas naturales están presentes en mitos fundacionales, y existe la noción de realidades paralelas al mundo real y capacidad de otros seres vivos para moverse de un plano al otro (Massieu, 2018: 157-161).

El conflicto RG-CT se concibe desde dos ángulos: las variedades vegetales agrícolas y la vida silvestre. Durante los primeros años del siglo XX únicamente hubo preocupación por las variedades agrícolas, y hasta finales de este siglo la noción de RG se amplía a la vida silvestre. Esto está estrechamente relacionado con el descubrimiento en los años cincuenta de la molécula de ADN por Watson y Crick (y antes por Rosalind Franklin) (Garritz, 2002), y la posibilidad de manipulación de dicha molécula hereditaria a partir de los ochentas.

En el nivel internacional, considerar a los RG agrícolas como parte de la biodiversidad en su conjunto, que implica que la regulación es similar a la de la vida silvestre, ha enfrentado oposición de los países centrales y las corporaciones agrobiotecnológicas y alimentarias, puesto que acepta a las variedades comerciales.

Es así que, al no estar plenamente resuelto este conflicto a nivel de regulación internacional, son frecuentes los casos de colectas de RG del sur global para empresas del Norte, sin que haya compensación alguna para las comunidades de origen. Una vez expuesta una breve descripción expuesta del conflicto respecto a los RG, paso al caso del maíz en México.

3 LOS RG DEL MAÍZ EN MÉXICO

México es centro de origen del maíz, su domesticación data de hace entre 7,000 o 9,000 años, según la fuente (Gil *et al*, 2015; McClung *et al*, 2001), se dio a partir de sus parientes silvestres, aún presentes, el teocintle y el tripsacum. La identificación de estos ancestros ha sido útil como indicador del origen en México y Mesoamérica, y para descartar otros posibles centros de origen.

En restos arqueológicos de hace 8,310 años se encontró polen de teocintle en la cueva de Guilá Naquitz, Oaxaca, y mazorcas en ese mismo lugar con una antigüedad de 5,420 años; en el Valle de Tehuacán, Puebla, se encontraron mazorcas de hacer 4, 770 años (Gil *et al*, 2015), o 5,520 según McClung *et al* (2001: 133). Esta domesticación del maíz

y otras plantas comestibles generó la base de la alimentación mesoamericana y originó una asombrosa diversidad genética sembrándose viva en el campo, mayoritariamente por campesinos e indígenas. Aunque la modernización de la Revolución Verde (RV), de la 2a mitad del siglo XX, indujo la siembra masiva de unas cuantas variedades híbridas de alto rendimiento, comercializadas principalmente por empresas transnacionales, sigue la siembra de variedades nativas estrechamente ligadas a la cultura, frecuentemente en el sistema milpa. Se han sucedido investigaciones diversas desde 1951 que han documentado la existencia de decenas de razas de maíz (Cuadro 1).

Cuadro 1: Colectas de razas nativas de maíz mexicano (1951-2011).

Autor del muestreo	Año	No. De razas encontradas
Welhausen et al	1951	32
Ortega et al	1991	41
Sánchez et al	2000	59
Conabio	2011	64

Fuente: Elaboración propia a partir de Welhausen et al (1951); Ortega et al (1991); Gil et al (2015) y Conabio (2011).

Las variedades nativas, frecuentemente sembradas en el sistema milpa, son diversas y no necesariamente tienen las características de alta productividad y homogeneidad de las variedades híbridas comerciales (Ávila *et al*, 2014; Massieu y Noriero, 2018), pero contienen genes que incluyen resistencias y adaptabilidad ante el cambio climático (CC).

3.1 LA MILPA. UN CULTIVO ANCESTRAL AGROECOLÓGICO

La pervivencia del policultivo ancestral denominado milpa, pese a que por décadas ha existido una presión gubernamental y de mercado para que sea sustituido por el monocultivo industrial de alto rendimiento, encarna una memoria biocultural (Toledo y Barrera, 2008: 13-28) con un modelo de agricultura sustentable. La milpa consiste en 3 cultivos básicos (maíz, frijol y calabaza), y otras plantas comestibles, silvestres o cultivadas y tiene virtudes agroecológicas que permiten que no se usen agroquímicos y se conserven los suelos, además de proporcionar una cantidad importante de alimentos para la familia campesina.

Las milpas han desempeñado un papel muy importante en el enriquecimiento de nuestra biodiversidad agrícola. La asociación maíz-frijol-calabaza se encuentra en las milpas de casi todas las zonas ecológicas....Así como hay muchas razas de maíz, existen 5 especies de frijol, cuatro de calabaza e infinidad de variedades de esas dos plantas que se siembran en diferentes arreglos dentro de la milpa, para satisfacer necesidades de alimentación cotidiana, rituales y festejos especiales. Pueden llegar a encontrarse hasta 50 especies diferentes ya sea cultivadas, auspiciadas o toleradas (Aguilar *et al*, 2008: 85).

Las plantas presentes en la milpa cumplen una función ecológica: la asociación maíz-frijol es complementaria, pues enriquece el suelo (por la fijación de nitrógeno realizada por el frijol) y la caña de maíz le da sostén a la leguminosa. Al ser consumidos, estos dos cultivos complementan aminoácidos necesarios para los humanos. La calabaza limita el desarrollo de las malas hierbas, la sombra de sus hojas contribuye a mantener la humedad y se consume de varias formas: semillas, flores y frutos, lo que incrementa su aporte nutricional. El chile se siembra frecuentemente en la milpa y permite un mejor aprovechamiento del espacio, repele algunos insectos y aporta vitaminas. La milpa es un ejemplo notable de manejo campesino de las hierbas silvestres, dado que no todas resultan “malas hierbas”, se promueve el crecimiento de quelites, verdolagas y quintoniles, todas ellas comestibles (Aguilar *et al*, 2008: 85-87). Esta “milpa agroecológica” (Cortez, 2020: 109-163) ha seguido evolucionando, y hay ejemplos como la promoción del consumo de chapulines (insectos), en vez de la aplicación de insecticidas, por parte del Grupo Vicente Guerrero en Tlaxcala, con el consecuente mejoramiento de la alimentación (Boege y Carranza, 2009: 226-227).

A pesar de estas grandes virtudes de la milpa, que se enriquecen hoy en día con innovaciones agroecológicas, hay amenazas diversas a su existencia. Por una parte, la agricultura campesina que siembra maíces nativos para autoconsumo, en ocasiones con excedentes para comercialización, ha sido menoscabada por las políticas agrícolas desde hace décadas, si bien en el presente hay algunos signos alentadores, como el programa Producción para el Bienestar del nuevo gobierno, que dedica apoyos especiales para pequeños y medianos productores. Desafortunadamente, con la pandemia y una fuerte sequía las condiciones para su operación se han puesto más difíciles, en un contexto en el que las importaciones de maíz en 2020 fueron las más altas de la historia: 18 millones de toneladas, 52% del consumo total de maíz amarillo, en maíz blanco el país es autosuficiente (Martínez, 2020).

Pese a ello anterior en el 2020, en plena pandemia de COVID 19, se hicieron esfuerzos desde la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) para que no se detuviera la producción de alimentos y que el financiamiento llegara oportunamente a los productores. Para el 15 de mayo de 2020 se informaba de un avance de 61 por ciento en el número de productoras y productores apoyados con recursos “por medio de órdenes de pago y depósitos bancarios a favor de un millón 283 mil 575 personas. De este total, un millón 88 mil 423 son productores de granos; 75 mil 739 de café y 119 mil 413 de caña de azúcar” (SADER, 2020). Existe un programa específico de rescate de maíces nativos, que busca desarrollar condiciones para una mayor producción y comercialización, y está ligado a los Proyectos de Desarrollo Territorial (Prodeter). En 2019 la SADER informaba

que el programa había arrancado con 38 Prodeter en 16 estados del país “con una inversión anual de más de 350 millones de pesos que beneficiará a aproximadamente 12 mil familias que se dedican a la producción de maíces nativos” (SADER, 2019), pero no hay información disponible sobre los resultados.

En 2020 se hicieron 18 ensayos y viveros de maíz nativo como parte del programa MasAgro, iniciado en el sexenio de Felipe Calderón (2006-2012), en un esquema de colaboración entre el CIMMyT (Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo) y la SADER. La característica de MasAgro ha sido la verticalidad y la visión de los campesinos como sujetos a “modernizar”, con menosprecio a su producción, que es la que ha posibilitado la conservación y siembra de las variedades nativas (Massieu, 2016). MasAgro cuenta con financiamiento de Bill Gates y Carlos Slim, y en la fuente no se mencionan los protocolos de acceso y la propiedad intelectual de las variedades en los viveros (SADER, 2019).

Las políticas gubernamentales de las décadas recientes han contribuido a dismantelar la milpa y hay zonas donde se produce sólo maíz en monocultivo, inclusive entre pequeños y medianos productores (Ávila *et al*, 2014; Massieu y Noriero, 2018). Ante esto, pareciera ser que los cambios en la política gubernamental han atemperado la amenaza a la existencia de la milpa y los RG del maíz. Otra acción gubernamental que abona en ese sentido es la prohibición de la importación del herbicida glifosato en 2020, clasificado como probable cancerígeno por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y ampliamente utilizado en el monocultivo, puesto que forma parte del paquete tecnológico convencional proveniente de la RV y del de los cultivos transgénicos resistentes a herbicidas. El gobierno actual plantea su eliminación gradual para 2024 (Enciso, 2020).

Una amenaza para los maíces nativos es la posible autorización de siembras comerciales de maíz transgénico (Massieu, 2017). A la fecha dicha autorización está detenida en el país por un interesante y diverso movimiento social, pese a las presiones de las corporaciones multinacionales productoras de maíz transgénico, que presionan para la siembra comercial. Con el actual gobierno, el último día de 2020 se emitió un decreto presidencial que prohíbe la siembra de este tipo de maíz en el territorio nacional (Valle, 2021). La siembra generalizada de maíz transgénico amenaza la diversidad genética del grano por varias razones: a) se agudiza la homogeneidad genética ya presente desde la siembra de híbridos de la RV, que hace vulnerable la producción a plagas, enfermedades y eventos climatológicos; b) una de las variedades de maíz transgénico disponible en el mercado es resistente a herbicidas (la otra resistencia más común es a insectos), esto implica la aplicación de una mayor cantidad de glifosato (asociado a la planta

transgénica), con el consecuente empobrecimiento del ecosistema, contaminación de suelo y agua, y riesgo para las y los trabajadores agrícolas, las y los campesinos, y las y los consumidores; c) puesto que el maíz es una planta de polinización abierta, al sembrarse maíz transgénico en todo el territorio nacional son factibles las cruizas con maíces no transgénicos, ello puede provocar alteraciones y extinciones no previstas; d) de darse estas cruizas por la dispersión del polen y transgenes, no hay mecanismos de propiedad intelectual que protejan a los productores de maíz nativo o convencional, por lo que puede haber demandas hacia ellos por parte de las corporaciones productoras de maíz transgénico; e) la siembra generalizada de maíz transgénico es una nueva apuesta por el modelo de monocultivo de alto rendimiento, que provoca el empobrecimiento del agroecosistema; f) investigaciones recientes (Ávila *et al*, 2014; Massieu y Noriero, 2018; Chauvet *et al*, 2014) demuestran que las llamadas malezas y las plagas de insectos, que supuestamente resuelven los maíces transgénicos disponibles, no son los problemas más relevantes de las y los productores, pues sus dificultades principales son los costos de producción (principalmente fertilizantes y semillas) y la comercialización.

La discusión entre diversos actores sociales sobre la preservación de maíces nativos y la tecnología para la producción maicera y de alimentos se relaciona con la soberanía y autosuficiencia alimentarias. Los gobiernos de décadas anteriores privilegiaron la agricultura de exportación y la importación de alimentos, en detrimento de la producción interna, y el gobierno actual tiene como uno de sus objetivos explícitos la soberanía y autosuficiencia alimentarias, con los programas mencionados anteriormente que apoyan la producción de alimentos básicos por parte de medianos y pequeños productores. Ante los graves problemas económicos introducidos por la pandemia y ahora por la guerra en Ucrania (que ha implicado el encarecimiento de los alimentos a nivel mundial), la consecución de este objetivo se vuelve crucial, pese a los resultados negativos mencionados en cuanto a la importación de maíz y a que es aún pronto para evaluar la eficiencia de las medidas gubernamentales, basta mencionar aquí el cambio observado, que indica que hay una promoción gubernamental de la agroecología como no se había hecho antes.

La diversidad genética del maíz mexicano es valiosa para afrontar los riesgos del CC y el logro de la autosuficiencia alimentaria, que va más allá de lo económico, pero eso no impide los intentos de privatizar las variedades con características interesantes. Al respecto, puedo mencionar el caso del Proyecto Maestro de Maíces Mexicanos (Massieu y Castañeda, 2017), vigente entre 2012 y 2014, que consistió en que un consorcio formado por la empresa Monsanto, la Confederación Nacional Campesina y la Universidad Agraria Antonio Narro colectaron en Puebla y Tlaxcala variedades de maíz nativo para almacenarlas

en un Banco de germoplasma en dicha universidad, financiado por la empresa. Se les dio por tres años la cantidad de \$1,000.00 pesos anuales (unos \$50.00 dólares estadounidenses) a las y los productores que donaron sus variedades, nombrándolos “custodios”. El caso es polémico, puesto que no hay ninguna propuesta de protocolos de acceso al banco de germoplasma ni de propiedad intelectual (Ávila *et al*, 2014).

Otro caso más reciente es el del maíz olotón, colectado por investigadores estadounidenses y un mexicano. En noviembre de 2018 se publica un artículo en la revista *Plos Biology*, en el cual se informa que la compañía Mars financió la investigación y el “descubrimiento” de esta planta, que se comercializará en Estados Unidos (Pskowski, 2019). La investigación expuesta indaga sobre los problemas de acceso a los RG y las dificultades de un posible reparto equitativo de las ganancias obtenidas por su explotación. La persistencia de las variedades nativas en el país forma parte del importante complejo de producción, comercialización, consumo y comercio internacional del maíz que encarna la contradicción entre la apropiación privada de los RG agrícolas y el uso de estos recursos como bien común entre las comunidades campesinas e indígenas, que los han preservado por generaciones, frecuentemente con la milpa como propuesta de agricultura sustentable.

4 CONCLUSIONES

Si bien históricamente han existido colectas de recursos biológicos y genéticos en el sur global por parte de los países centrales, con la ingeniería genética, que le ha dado a la biodiversidad el carácter de RG, el conflicto entre los colectores y los dueños de los recursos se ha agudizado.

Dicho conflicto existe por el contraste entre la apropiación privada de los genes por parte de grandes empresas transnacionales y su uso y domesticación por comunidades campesinas e indígenas.

Ante ello, es necesario reconocer valor de la agricultura campesina y su preservación de RG en la regulación internacional. También hay necesidad de figuras de PI adecuadas y promover tecnologías de policultivo amigables con el medio ambiente, así como producción de alimentos sanos, lo cual se expresa en la preservación de la milpa para el caso del maíz en México.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, J., C. Illsley y C. Marielle (2007), “Los sistemas agrícolas del maíz y sus procesos técnicos”, Gustavo Esteva y Catherine Marielle (coordinadores), *Sin maíz no hay país*, Ed. Consejo nacional para la Cultura y las Artes, Primera reimpresión, 83-122.

Ávila, F., Y. Massieu, Y. Castañeda, L. Noriero y A. Gomnzález (2014) “Los productores de maíz en Puebla ante la producción de maíz genéticamente modificado”, México, *Sociológica* Año 29, número 82, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, 45-82, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-01732014000200002

Boege, E. y T. Carranza (2009), *Agricultura sostenible campesino indígena, soberanía alimentaria y equidad de género. Seis experiencias de organizaciones indígenas y campesinas en México*, PIDAASSA, México, pp.209-248.

Chauvet, M., F. Ávila, Y. Castañeda, A. González, E. Lazos, Y. Massieu y L. Noriero (2014) “Impactos sociales, económicos y culturales de la posible introducción de maíz genéticamente modificado en México” (2014), *Resumen ejecutivo y general*, UNAM/UAM, FIBIO/CIBIOGEM.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio) (2011), Biodiversidad mexicana. Razas de maíz de México, <https://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/maices/grupos/MaduracionT/Oloton.html>

Cortez, M. (2020) “La milpa agroecológica, una alternativa campesina para construir soberanía alimentaria en Coyuca de Benítez, Guerrero”, Tesis para obtener el grado de *Maestría en Desarrollo Rural*, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Enciso, A., (2020) “Rechaza Semarnat importación de 67 mil toneladas de glifosato”, *Periódico La Jornada*, 26 de junio, <https://www.jornada.com.mx/2020/06/26/politica/015n1p01>

Garrritz, A. (2002), “Rosalind Franklin (1920-1958), símbolo de la mujer científica”, *Revista Educación Química*, UNAM, Vol. 13, No.3, <http://www.revistas.unam.mx/index.php/req/article/view/66287/58198>

Gil, A., P. A. López, J. de D. Guerrero, O. R. Taboada, E. Ortiz, H. López y A. Hernández (2015), Diversidad de los maíces nativos en el Estado de Puebla, *Día Nacional del Maíz: Diversidad y Potencial de los Maíces Nativos de Puebla*, FAO, FOMIX, SINAREFI Y Colegio de Posgraduados.

Martínez, P. (2020), “México, lejos de ser autosuficiente en maíz”, *El Economista. Empresas*, 26 de enero, <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Mexico-lejos-de-ser-autosuficiente-en-maiz-20200126-0111.html>

Herrera, B., F. Castillo, J. de J. Sánchez, R. Ortega y M. Goodman (2000), Caracteres morfológicos para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: el caso de la raza chalqueño, *Rev. Fitotec.Mex.* Vol. 23, 335-354.

Massieu, Y. y F. (2006), “Valoración de la biodiversidad y el conocimiento tradicional: ¿un recurso público o privado?”, Concheiro, Luciano y Francisco López Bárcenas (coordinadores), *Biodiversidad y Conocimiento tradicional. Entre el bien común y la propiedad privada*, México, Ed. Centro para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CDRSSA), Cámara de Diputados, LX Legislatura, 329-364.

Massieu, Y. y Y. Castañeda (2017), “Las semillas de maíz: artefacto, bien común y ser vivo”, *Sociedades Rurales. Producción y Medio Ambiente*, No. 32, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Massieu, Y. (2017) “Milpa y maíz transgénico ante la soberanía alimentaria”, Adelita San Vicente (Coordinadora), *Hagamos milpa. Fortalezcamos la agricultura campesina*, México, Ed. UAM, Oxfam, Semillas de vida, Red Temática sobre el Patrimonio Biocultural, Fundación Dondé, 109-124.

Massieu, Y. (2018), *Mirada de jaguar: venturas y desventuras de la biodiversidad en América Latina*, México, Ed. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Massieu, Y. y L. Noriero (2018), "Campesinos maiceros en Tlaxcala: viabilidad, caracterización y respuestas ante el maíz transgénico", *Sociedad y Ambiente*, Año 6, No. 16, mayo-junio, 179-206, <https://www.redalyc.org/jatsRepo/4557/455755944008/index.html>

McClung, Emily, Diana Martínez, Guillermo Acosta, Francisca Zalaquet y Eléonor A. Robitaille, "Nuevos fechamientos para las plantas domesticadas en el México prehispánico", *Anales de Antropología*, Vol. 35, Instituto de Investigaciones Antropológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, <http://www.revistas.unam.mx/index.php/antropologia/article/view/14890/14189>

Naciones Unidas, (1992), *Convenio Sobre la Diversidad Biológica*, <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>

Ortega P. R. A., J. J. Sánchez G., F. Castillo G., J. M. Hernández C. (1991), "Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México", *Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México*, R. Ortega P., G. Palomino H., F. Castillo G., V. A. González H., M. Livera M. (editores), Sociedad Mexicana de Fitogenética (SOMEFI), A.C., Chapingo, México, 161-185.

Pskowski, Martha (2019), "Indigenous maize: who owns the right to Mexico ¿wonder plant?", *Yale Environment* 360, <https://e360.yale.edu/features/indigenous-maize-who-owns-the-rights-to-mexicos-wonder-plant>

SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) (2019), "Rescate de los maíces nativos para alcanzar la autosuficiencia alimentaria", *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*, <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/rescate-de-los-maices-nativos-para-alcanzar-la-autosuficiencia-alimentaria>

Toledo, V. M. y N. Barrera-Bassols, (2008), *La memoria biocultural. La importancia ecológica de las sabidurías tradicionales*, Ed. Icaria Editorial, España, 232 pp <https://paginas.uepa.br/herbario/wpcontent/uploads/2017/12/LAMEMORIABIOCULTURALpdf.pdf>

Valle, M. (2021), "AMLO prohíbe el maíz transgénico y el glifosato en México: en 2024 se deberá eliminar el herbicida y las semillas genéticamente modificadas", *Xataka*, México, 4 de enero, <https://www.xataka.com.mx/politica/amlo-prohibe-maiz-transgenico-glifosato-mexico-2024-se-debera-eliminar-herbicida-semillas-geneticamente-modificadas>

Welhausen, E.J., L.M. Roberts y E. Hernández X., en colaboración con P.C. Mangelsdorf, (1951) Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución, *Folleto técnico No. 5*, Secretaría de Agricultura y Ganadería. Oficina de Estudios Especiales, México, D.F. https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/50301000/Races_of_Maize/Raza_Mexico_0_Book.pdf

CAPÍTULO 14

INSUMOS AGROECOLÓGICOS PARA MANEJO DEL AMARILLAMIENTO EN NARANJA VALENCIA TARDÍA (*Citrus sinensis* L. Osbeck) EN VERACRUZ, MÉXICO

Data de submissão: 22/12/2022

Data de aceite: 20/01/2023

Manuel Ángel Gómez Cruz

Doctor en Economía Agrícola
Universidad Humboldt de Berlín
Lugar de trabajo:
Centro de Investigaciones
Interdisciplinarias para el
Desarrollo Rural Integral
Universidad Autónoma Chapingo
Dirección: Carretera México-
Texcoco km 38.5
Chapingo, México. C.P. 56230
<https://orcid.org/0000-0003-1410-3054>

Laura Gómez Tovar

Maestra en Ciencias, en
Ciencia, Sociedad y Tecnología
Universidad de Roskilde y
Universidad de Aalborg, Dinamarca
Lugar de trabajo:
Departamento De Agroecología
Centro de Investigaciones
Interdisciplinarias para el
Desarrollo Rural Integral
Universidad Autónoma Chapingo
Dirección: Carretera México-
Texcoco km 38.5
Chapingo, México. C.P. 56230
<https://orcid.org/0000-0002-8588-4436>

María de los Ángeles Hernández-Andrade

Estudiante de Economía Agrícola
Universidad Autónoma Chapingo
Lugar de trabajo:
Centro de Investigaciones
Interdisciplinarias para el
Desarrollo Rural Integral
Universidad Autónoma Chapingo
Dirección: Carretera México-
Texcoco km 38.5
Chapingo, México. C.P. 56230
<https://orcid.org/0000-0003-2309-6669>

Asunción Gálvez-Mendoza

Maestra en Ciencias en
Agroforestería para el
Desarrollo Sostenible
Universidad Autónoma Chapingo
Lugar de trabajo:
Centro de Investigaciones
Interdisciplinarias para el
Desarrollo Rural Integral
Universidad Autónoma Chapingo
Dirección: Carretera México-
Texcoco km 38.5
Chapingo, México. C.P. 56230
<https://orcid.org/0000-0002-7442-6309>

Luis Enrique Ortiz-Martínez

Autor de correspondencia
Maestro en Ciencias en
Fitosanidad-Fitopatología
Colegio de Postgraduados
Lugar de trabajo:
Colegio de Postgraduados
Dirección: Carretera México-
Texcoco km 36.5
Montecillo, Texcoco, México. C.P. 56230
<https://orcid.org/0000-0002-3661-4894>

RESUMEN: El amarillamiento y muerte de cítricos es una enfermedad de reciente aparición en la Región Norte de Veracruz, México. El objetivo del presente trabajo fue analizar cualitativamente la efectividad de cinco insumos agroecológicos: 1) mezcla sulfocálcica, 2) microorganismos de montaña al suelo, 3) biol magro simple, 4) agrohomeopatía y 5) agua de vidrio para el manejo del amarillamiento en cítricos, en particular en Naranja Valencia (*Citrus Sinensis* L. Osbeck). El experimento se realizó durante un periodo de cinco meses (28 de diciembre de 2021 al 31 de mayo de 2022) en el Ejido San Pablo, Papantla, Veracruz. Los datos se sometieron a un análisis estadístico no paramétrico mediante la prueba del signo. Los insumos agroecológicos que presentaron mayor eficiencia fueron: 1) agrohomeopatía para el amarillamiento y 2) agua de vidrio, con intervalos de aplicación de 8 días. La aplicación de agua de vidrio disminuyó la incidencia de ramas amarillas, ramas secas y caída del fruto en un 90, 98 y 78% respectivamente; mientras que la agrohomeopatía redujo la incidencia de ramas amarillas y ramas secas en un 92 y 97%. Por un lado, el agua de vidrio es sencillo, rápido y económico en su proceso de elaboración puesto que se elabora a base de insumos locales como ceniza, cal y agua; a diferencia de la agrohomeopatía que debe ser elaborada por un especialista.

PALABRAS CLAVE: Nueva enfermedad. Cítricos. Bio insumos. Agua de vidrio. Agrohomeopatía.

AGROECOLOGICAL INPUTS FOR HANDLING YELLOWING IN VALENCIA LATE ORANGE (*Citrus sinensis* L. Osbeck) IN VERACRUZ, MEXICO

ABSTRACT: Citrus yellowing and death is a disease of recent appearance in the Northern Region of Veracruz, Mexico. The objective of this work was to qualitatively analyze the effectiveness of five agroecological inputs: 1) sulfocalcic mixture, 2) mountain microorganisms to the soil, 3) simple lean biol, 4) agrohomeopathy and 5) glass water for the management of yellowing in citrus, particularly in Valencia Orange (*Citrus Sinensis* L. Osbeck). The experiment was carried out during a period of five months (December 28, 2021, to May 31, 2022) in the Ejido San Pablo, Papantla, Veracruz. The data were subjected to a non-parametric statistical analysis using the sign test. The agroecological inputs that presented greater efficiency were: 1) agrohomeopathy for yellowing and 2) glass water, with application intervals of 8 days. The application of glass water decreased the incidence of yellow branches, dry branches, and fruit drop by 90, 98, and 78% respectively; while agrohomeopathy reduced the incidence of yellow branches and dry branches by 92 and 97%. On the one hand, glass water is simple, fast, and cheap in its production process since it is made from local inputs such as ash, lime, and water; unlike agrohomeopathy which must be prepared by a specialist.

KEYWORDS: New disease. Citrus. Bio inputs. Glass water. Agrohomeopathy.

1 INTRODUCCIÓN

El género *Citrus* es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales de más de 140 países. Este cultivo tiene una producción mundial superior a los 140 millones de toneladas y los principales

países productores son China, Brasil, India, Estados Unidos de América, México y España (FAO, 2020). En México, actualmente la superficie cultivada de cítricos es de 594,369 ha con un volumen de producción de 8,293,601 toneladas (SIAP, 2020).

La incidencia de plagas y enfermedades son la principal limitante para el incremento y calidad de la producción de cítricos en el país, aunado a la confusión y/o desconocimiento de los productores sobre su sintomatología y control (De los Santos, 2013). Algunas plagas y enfermedades tales como: Pulgón (*Toxoptera* spp.), Minador (*Phyllocnistis citrella*), Ácaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*), *Mycosphaerella citri*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora* spp., *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis virus* (CPsV) y *Citrus leprosis virus* (CiLP) han ocasionado daños considerables en las huertas, disminuyen la producción y provocan pérdidas millonarias en el sector citrícola.

Recientemente una enfermedad en los cítricos ha alarmado a los productores de la Región Norte de Veracruz, ya que hasta ahora solo se conocen los siguientes síntomas: brotes amarillos que avanzan hasta cubrir toda la planta; hojas pequeñas, puntiagudas y con coloración amarillenta; ramas secas; frutos pequeños, con cáscara dura y maduración temprana (Antunes, 2013). Actualmente, se desconoce el agente causal pero se especula que pudiera ser la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) inducida por la bacteria *Xylella fastidiosa* subsp. *Pauca*, o bien, alguna bacteria limitada al floema. No obstante, aún no existen estudios que lo comprueben.

Al ser el amarillamiento una enfermedad reciente en los cítricos y conocer los daños que ha provocado en la Región Norte de Veracruz, resulta necesario buscar estrategias y alternativas sustentables que permitan contrarrestar los síntomas de la enfermedad y así mismo reducir su severidad. Con base en lo anterior, se llevó a cabo un experimento con ocho tratamientos y un testigo, a partir de la aplicación de cinco insumos agroecológicos con diferentes intervalos de aplicación, con el objetivo de analizar cualitativamente su efectividad para el manejo del amarillamiento en cítricos, en particular en Naranja Valencia (*Citrus Sinensis* L. Osbeck).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó durante un periodo de cinco meses (28 de diciembre de 2021 al 31 de mayo de 2022) en el Ejido San Pablo, Papantla, Veracruz, en las coordenadas: 20° 27' latitud N y 97° 11' longitud W; altitud 220 msnm. La parcela donde se establecieron los tratamientos lleva un manejo agroecológico desde hace cinco años, tiene una superficie de 1 ha, suelo de aluvión con pH de 6.5 y rendimiento de 20 t/ha. Se establecieron 8 tratamientos

a partir de cinco insumos agroecológicos: mezcla sulfocálcica, microorganismos de montaña al suelo y biol magro simple con un intervalo de aplicación de cada 15 días y una dosis del 5%; agrohomeopatía para el amarillamiento y agua de vidrio (1.25%) con intervalos de aplicación de cada 8 y 15 días respectivamente; agrohomeopatía nosode para todas las enfermedades de los cítricos cada 8 días, más un testigo. Para cada tratamiento se destinó una hilera con 23 árboles; se seleccionaron los 4 árboles más enfermos de cada hilera procurando homogenizar el tamaño y porte de las unidades experimentales. Para los tratamientos con intervalos de 15 días se realizaron 12 aplicaciones en total, mientras que los tratamientos con intervalos de 8 días contaron con 23 aplicaciones. Los tratamientos se evaluaron con indicadores cualitativos (“muy mal”, “mal”, “regular”, “bien”, y “muy bien”) en nueve variables: brotación (B), floración (F), aspecto general del árbol (AGA), apariencia del fruto (APF), amarillamiento en ramas (AR), caída de hojas (CH), ramas secas (RS), contagio a árboles vecinos (CAV) y caída del fruto (CF).

Los datos se sometieron a un análisis estadístico no paramétrico en la paquetería de Excel mediante la prueba del signo, a través de la cual se determinó si hubo o no diferencia entre el testigo, los tratamientos y los indicadores.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se concentran los indicadores que mostraron diferencias positivas en cada tratamiento con relación al testigo. El aspecto general de los árboles testigo empeoró a lo largo de los seis meses, ya que hubo un aumento del 83% en ramas secas y amarillas. Por su parte, los mejores tratamientos fueron: agrohomeopatía para el amarillamiento y agua de vidrio (1.25%) cada 8 días, debido a que disminuyeron el porcentaje de amarillamiento en ramas (AR) en un 92 y 90% respectivamente.

Cuadro 1. Diferencia en tratamientos e indicadores vs testigo en el uso de insumos agroecológicos para el amarillamiento de los cítricos, San Pablo, Papantla, Veracruz 2021-2022.

Tratamiento	Indicadores con diferencia respecto al testigo	Porcentaje de disminución (%) / indicador con diferencia
Agrohomeopatía para amarillamiento (c/15 días)	AR y RS	71 y 90
Agrohomeopatía para amarillamiento (c/8 días)	AR y RS	92 y 97
Agrohomeopatía nosode para todas las enfermedades (c/8 días)	RS	87
Biol magro simple (c/15 días)	AR	40
Agua de vidrio (c/15 días)	AR, RS y CF	67, 71 y 58

Tratamiento	Indicadores con diferencia respecto al testigo	Porcentaje de disminución (%) / indicador con diferencia
Agua de vidrio (c/8 días)	AR, RS y CF	90, 98 y 78
Mezcla sulfocálcica (c/15 días)	Indicadores sin diferencia	0
Microorganismos de montaña al suelo (c/15 días)	Indicadores sin diferencia	0

De acuerdo con lo anterior, los tratamientos agrohomeopatía para el amarillamiento y agua de vidrio cada ocho días, presentaron cambios positivos a lo largo del experimento ya que mejoró sustancialmente el aspecto general del árbol. El amarillamiento en ramas ya no avanzó a partir de la novena aplicación para el caso de la agrohomeopatía y para el caso del agua de vidrio fue a partir de la onceava aplicación.

En general, para los 8 tratamientos y el testigo: no hubo diferencias en la caída de hojas, brotación y floración de los árboles analizados, ya que se apreció un buen aspecto desde el color hasta la forma de los pétalos y estambres de la flor.

Respecto a la caída del fruto, se observó una reducción a partir de la sexta aplicación del agua de vidrio, llegando hasta la aplicación 23 (última aplicación) con un 78% de reducción de la caída del fruto. Estudios similares reportan que la aplicación de Agua de vidrio (1.25 %) + Micorriza disminuyó la abscisión de naranja en el Norte de Veracruz (Gómez et al., 2021). Los efectos positivos que induce el agua de vidrio en plantas enfermas son frecuentes, ya que se ha reportado estimulando el crecimiento de raíz en más de 210% en plantas de tomate infectadas con *Tomato brown rugose fruit virus* (Ortiz-Martínez y Ochoa-Martínez, 2022). En los demás tratamientos no hubo ningún efecto sobre la caída del fruto.

4 CONCLUSIONES

Los insumos agroecológicos que presentaron mayor eficiencia y que en ese sentido coadyuvaron a contrarrestar los síntomas de los árboles enfermos por amarillamiento de los cítricos, fueron: agrohomeopatía para el amarillamiento y agua de vidrio (1.25%), cada 8 días.

El agua de vidrio resulta ser más efectiva en tres indicadores: ramas amarillas, ramas secas y caída del fruto, mientras que la agrohomeopatía en dos: ramas amarillas y ramas secas. Así mismo, el agua de vidrio es más sencillo, rápido y económico en su proceso de elaboración puesto que se elabora a base de insumos locales: ceniza, cal y agua, a diferencia de la agrohomeopatía que debe ser elaborada por un especialista.

REFERENCIAS

Antunes, T.L. (2013). Situación actual, manejo e impacto económico de la clorosis variegada de los cítricos (CVC) en Brasil [Taller]. 3er Taller Internacional sobre Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. Manzanillo, Colima, México.

De los Santos, M.I. (2013). Monografía del Huanglongbing (*Candidatus liberibacter* spp) de los cítricos [Archivo PDF]. Trabajo de experiencia recepcional. https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/22_DeSantos_13.pdf

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2020). Datos sobre alimentación y agricultura. <http://www.fao.org/faostat/es/>

Gómez, C.M.A., Gómez, T.L., Ortiz-Martínez, L.E. y Hernández-Carlos, A. (2021). La importancia de la aplicación de micorrizas para disminuir la abscisión de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) en Veracruz, México. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 4(4),6012-6020. <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n4-094>

Ortiz-Martínez, L.E. y Ochoa-Martínez, D.L. (2022). Elicitors and biostimulants in the production of tomato infected with *Tomato brown rugose fruit virus*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00693-6>

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2020). Cierre de la producción agrícola 2020. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

CAPÍTULO 15

ANTIOXIDANTES *IN VITRO*: EFECTOS SOBRE VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)¹

Data de submissão: 10/12/2022

Data de aceite: 05/01/2023

Eliana Ibáñez-Arancibia

PhD Program in Sciences mentioning
Applied Molecular and Cell Biology
Universidad de La Frontera
Temuco, Chile
Laboratory of Engineering
Biotechnology and Applied
Biochemistry (LIBBA)
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering and Science
Universidad de La Frontera
Temuco, Chile
Department of Agricultural and
Aquaculture Sciences
Faculty of Natural Resources
Universidad Católica de Temuco
Temuco, Chile
<https://orcid.org/0000-0001-7174-3694>

Iván Valdebenito Isler

Nucleus of Research in Food Production
Faculty of Natural Resources
Universidad Católica de Temuco
Temuco, Chile.
Department of Agricultural and
Aquaculture Sciences
Faculty of Natural Resources
Universidad Católica de Temuco
Temuco, Chile
<https://orcid.org/0000-0001-7035-1066>

Jorge G. Farías

Laboratory of Engineering
Biotechnology and Applied
Biochemistry (LIBBA)
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering and Science
Universidad de La Frontera
Temuco, Chile
<https://orcid.org/0000-0001-7660-9603>

RESUMEN: El almacenamiento en frío del semen implica potenciales alteraciones en su calidad debido a que el almacenaje genera como proceso principal, radicales libres que producen daño a los lípidos de la membrana de los espermatozoides con la consecuente alteración de la motilidad y capacidad fecundante. Para disminuir el daño generado por los radicales libres los espermatozoides cuentan con defensas antioxidantes (proteínas, enzimas y sustancias de bajo peso molecular). El presente estudio evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento y de diferentes antioxidantes en diluyente espermático sobre la viabilidad espermática en semen de *Oncorhynchus mykiss* almacenado a 4°C. El ANOVA bidireccional denotó que el tiempo de almacenamiento y la influencia antioxidante tienen efectos significativos separados o combinados sobre los parámetros de viabilidad (motilidad y viabilidad de los espermatozoides, concentraciones de proteínas y actividad enzimática de superóxido dismutasa en el

¹ Los autores expresan su gratitud a Hendrix Genetics Aquaculture S.A. por su colaboración, a los proyectos FONDEF D10H064, FONDECYT 1120705, FONDECYT 1180387 y a la beca doctoral ANID 21191555 por financiar este estudio. Gracias a S.T. y a M.I. por sus comentarios.

plasma seminal). Por el contrario, solo el tiempo de almacenamiento afectó la capacidad fecundante la actividad enzimática de la catalasa en el plasma seminal. El análisis resultante se puede concluir que la presencia de antioxidantes mejora la viabilidad de espermatozoides almacenados en frío y los antioxidantes permiten la fecundación a pesar de la disminución de la motilidad.

PALABRAS CLAVES: Anión superóxido. Antioxidantes. Catalasa. Superóxido dismutasa. Trucha arcoíris.

ANTIOXIDANTES *IN VITRO*: EFEITOS NA VIABILIDADE DO ESPERMA EM TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)

RESUMO: O armazenamento a frio de sêmen implica potenciais alterações em sua qualidade, pois gera como processo principal radicais livres que geram danos aos lipídios da membrana dos espermatozoides, com as consequentes alterações na motilidade e na capacidade de fertilização. Para diminuir os danos causados pelos radicais livres, as células têm defesas antioxidantes (proteínas, enzimas e substâncias de baixo peso molecular). O objetivo do presente estudo avaliou o efeito do tempo e diferentes antioxidantes preparados em diluentes espermáticos no armazenamento de viabilidade de *Oncorhynchus mykiss* milt a 4°C. A ANOVA de duas vias denotou que o armazenamento no tempo e a influência antioxidante têm efeitos significativos separados ou combinados nos parâmetros de viabilidade (motilidade espermática, viabilidade espermática, concentrações de proteínas e atividade enzimática da superóxido dismutase no plasma seminal), enquanto apenas o tempo de armazenamento afetou a capacidade de fertilização e atividade enzimática da catalase no plasma seminal. A análise resultante pode concluir que a presença de antioxidantes melhora a viabilidade de espermatozoides armazenados a frio e os antioxidantes permitem a fecundidade apesar da diminuição da motilidade.

PALAVRAS-CHAVE: Ânion superóxido. Antioxidantes. Catalase. Superóxido dismutase. Truta arco-íris.

1 INTRODUCCIÓN

El almacenamiento en frío de semen implica potenciales alteraciones en su calidad (Merino *et al.*, 2020), pues el proceso de almacenamiento y el metabolismo celular, sumado al paso del tiempo, genera radicales libres que dañan los lípidos de la membrana celular y fragmentan el ADN del espermatozoide (Figuerola *et al.*, 2013), alterando la motilidad y capacidad fecundante (Contreras *et al.*, 2020). Los radicales libres son moléculas que tienen uno o más electrones desapareados en su órbita externa (Sandoval-Vargas *et al.*, 2020). Son muy reactivos e inestables y entre las especies reactivas de oxígeno (EROS), destacan el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($OH\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las EROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal. La presencia de leucocitos en el semen o de espermatozoides anormales, producen altos niveles de EROS en peces. Los espermatozoides, son

especialmente susceptibles al daño peroxidativo, pues casi todo su citoplasma es removido durante las etapas finales de la espermiogénesis, careciendo de enzimas que provean protección contra el daño inducido por las EROS (Lahnsteiner *et al.*, 2010).

Los organismos aeróbicos han desarrollado un sistema antioxidante defensivo, que comprende defensas moleculares y enzimáticas (Niki, 2010). Entre las enzimas antioxidantes se encuentran superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. El otro grupo está representado por compuestos antioxidantes removedores de radicales libres, los que son de bajo peso molecular y pueden ser liposolubles (antioxidantes unidos a la membrana celular como tocoferol o ubiquinol/ubiquinona) o hidrosolubles (ascorbato extracelular y glutatión intracelular). El ácido ascórbico es importante como antioxidante del plasma seminal de la trucha arcoiris, pues su concentración es más alta en éste que en el plasma sanguíneo. Las proteínas presentes en el plasma seminal también tendrían un rol antioxidante y estarían involucradas en la protección de la integridad de la membrana espermática (lipoproteínas) y en el control de proteinasas del tracto reproductivo o del espermatozoide.

Se han realizado pruebas *in vitro* con sustancias que tienen propiedades antioxidantes, como son los fenoles, el Trolox C o el ácido ascórbico. Los fenoles tienen una fuerte acción antioxidante *in vitro* e inhiben la lipoperoxidación capturando el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Los más conocidos son los fenoles del vino tinto. Dentro de los cuales, el resveratrol, es un efectivo captador de radicales hidroxilos ($\text{OH}\cdot$) y del anión superóxido. Además de su capacidad para quelar cobre y hierro que inducen la lipoperoxidación.

Trolox C (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es un análogo hidrosoluble del α -tocoferol y se utiliza como patrón en estudios cinéticos de muchos antioxidantes comerciales. El suplemento *in vitro* de ácido ascórbico al semen de trucha no protege a los espermatozoides del daño inducido por radiación UV, lo que genera embriones anormales. Los peces teleósteos, no pueden sintetizar vitamina C porque perdieron la enzima hepática L-glucono- γ -lactona oxidasa, durante el curso de la evolución. Este hecho podría explicar por qué la incorporación dietaria de la vitamina C tiene una mayor efectividad, versus su uso *in vitro*. Canyurt & Akhan (2008), confirmaron que la vitamina E dietaria mejoró la calidad de los espermatozoides en términos de concentración, motilidad y espermatocrito. La suplementación dietaria con vitaminas C y E incrementa la concentración de estos antioxidantes en el semen, reduciendo su susceptibilidad a la peroxidación e incrementa la poliinsaturación de los fosfolípidos de los espermatozoides. Efectos similares se observaron en *Perca flavescens* y *Chanos chanos*.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de antioxidantes (polifenoles de vino, Trolox C y L-ácido ascórbico), incorporados en diluyente espermático (*StopMilt^{MR}*) y del almacenaje en frío hasta por 14 días, sobre indicadores de viabilidad y niveles de actividad enzimática de catalasa y superóxido dismutasa evaluados en semen de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trabajó con especímenes de trucha arcoíris criados en la Empresa Hendrix Genetics Aquaculture S.A. (33°23'32"S, 71°40'47"W) en el Sur de Chile, los cuales maduraron bajo fotoperíodo artificial en el mes de enero. Los gametos fueron colectados por masaje abdominal desde hembras de cuarto desove y machos de segunda madurez.

Se colectó el semen de cuatro machos con nivel 5 de motilidad según la escala de Sanchez-Rodriguez & Billard (1977), se mezcló para formar un pool que fue dividido en cinco tratamientos: semen sin diluir (T_1), semen diluido en diluyente espermático, *StopMilt^{MR}* (1:2) (T_2) y semen diluido en *StopMilt^{MR}* (1:2) más antioxidantes [Polifenoles de uva (50%) (1mg/mL) (T_3); Trolox C (4 μ M) (T_4); L- ácido ascórbico (1 μ M) (T_5)]. Cada día de muestreo se evaluó, además, un pool de semen fresco sin diluir como control (C). Las evaluaciones se repitieron cada 3 días después del muestreo inicial, durante el período de almacenaje que se realizó a 4°C en envases de plástico desechable con tapa, mantenidos en ausencia de luz, con agitación permanente y oxigenación diaria.

El almacenaje y las evaluaciones de los parámetros de viabilidad (duración y el nivel de motilidad, determinación del anión superóxido (O_2^-) intracelular, tasa de fecundación, cuantificación de proteínas en el plasma seminal, determinación de la actividad enzimática de catalasa (H_2O_2 óxido reductasa) y superóxido dismutasa (SOD), se realizaron en el Laboratorio de Reproducción (Universidad Católica de Temuco). La fecundación e incubación se efectuaron en la Empresa Hendrix Genetics Aquaculture S.A., trasladando el semen entre estas instalaciones en cajas de poliestireno expandido a 4°C, en ausencia de luz y con suplementación de oxígeno.

Respecto al tratamiento estadístico de los datos, para establecer el nivel de motilidad del semen se utilizó la moda y para el análisis de los parámetros restantes se aplicó un ANOVA bidireccional (previa verificación de distribución normal y homocedasticidad) para datos no paramétricos y el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni para identificar diferencias significativas en los tratamientos ($P < 0,05$). Los datos fueron presentados como promedio \pm error estándar.

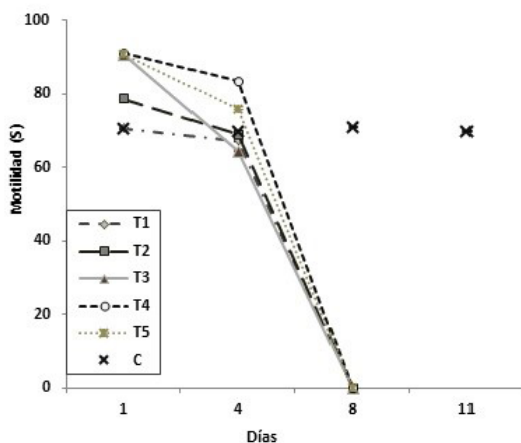
Para mayores detalles sobre la metodología, consultar el trabajo de Ibáñez-Arancibia *et al.* (2023).

3 RESULTADOS

3.1 MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y ESPERMATOCRITO

El día 1, T₃, T₄ y T₅ registraron los tiempos de motilidad más altos y no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). T₄ obtuvo el mayor tiempo de forma significativa el día 4 ($p < 0,05$). Ningún tratamiento presentó actividad flagelar los días 8 y 11 (Figura 1). En cuanto al nivel de motilidad, el día 1 todos los tratamientos presentaron nivel 5, mientras que el día 4 el T₁ presentó nivel 3 y para el resto de los tratamientos el nivel fue 4. Ningún tratamiento presentó actividad flagelar los días 8 y 11. El espermatozoides promedio obtenido al inicio del experimento fue de $26,3 \pm 1,3\%$. El resultado del ANOVA bidireccional indica que tanto el tiempo de almacenamiento como los tratamientos tienen un efecto significativo, ya sea combinado o por separado sobre la motilidad de los espermatozoides ($p < 0,05$).

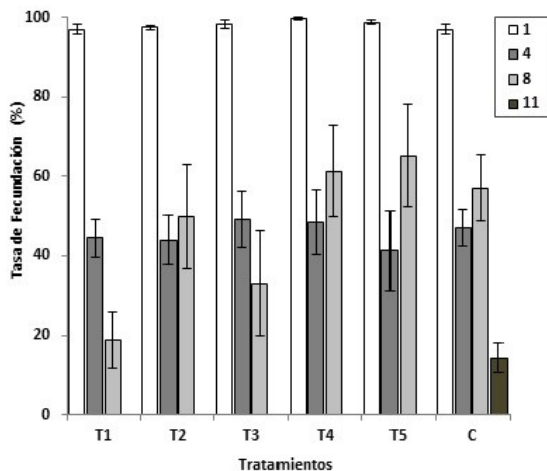
Figura 1: Variación temporal de la motilidad espermática (s) en semen de trucha arcoiris (*O. mykiss*) almacenado a 4°C en diferentes tratamientos y activado con PowerMilt^{MR}. T₁: semen sin diluir; T₂: semen diluido en diluyente espermático, StopMiltMR (1:2) y semen diluido en StopMiltMR (1:2) más antioxidantes [T₃: Polifenoles de uva (50%) (1mg/mL); T₄: Trolox C (4µM); T₅: L- ácido ascórbico (1µM)].



3.2 TASA DE FECUNDACIÓN

El día 1 y el día 4, los tratamientos no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). El día 8, el valor más alto fue para T₅, estadísticamente significativo con respecto a todos los demás tratamientos ($p < 0,05$). El día 11, los tratamientos no mostraron capacidad fecundante (Figura 2).

Figura 2: Variación temporal de la tasa de fecundación (%) los días 1, 4, 8 y 11 en semen de trucha arcoíris (*O. mykiss*) almacenado a 4°C en diferentes tratamientos y activado con *PowerMilt*^{MR}. T₁: semen sin diluir; T₂: semen diluido en diluyente espermático, StopMiltMR (1:2) y semen diluido en StopMiltMR (1:2) más antioxidantes [T₃: Polifenoles de uva (50%) (1mg/mL); T₄: Trolox C (4µM); T₅: L- ácido ascórbico (1µM)].

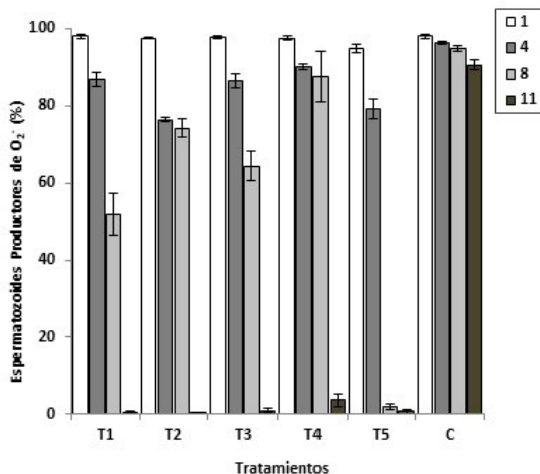


El resultado del ANOVA bidireccional indica que solo el tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo sobre la capacidad fecundante ($p < 0,05$).

3.3 DETERMINACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO (O_2^-) INTRACELULAR

El día 1, los tratamientos no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). T₄ tuvo los porcentajes significativamente más altos en los días restantes ($p < 0,05$) (Figura 3).

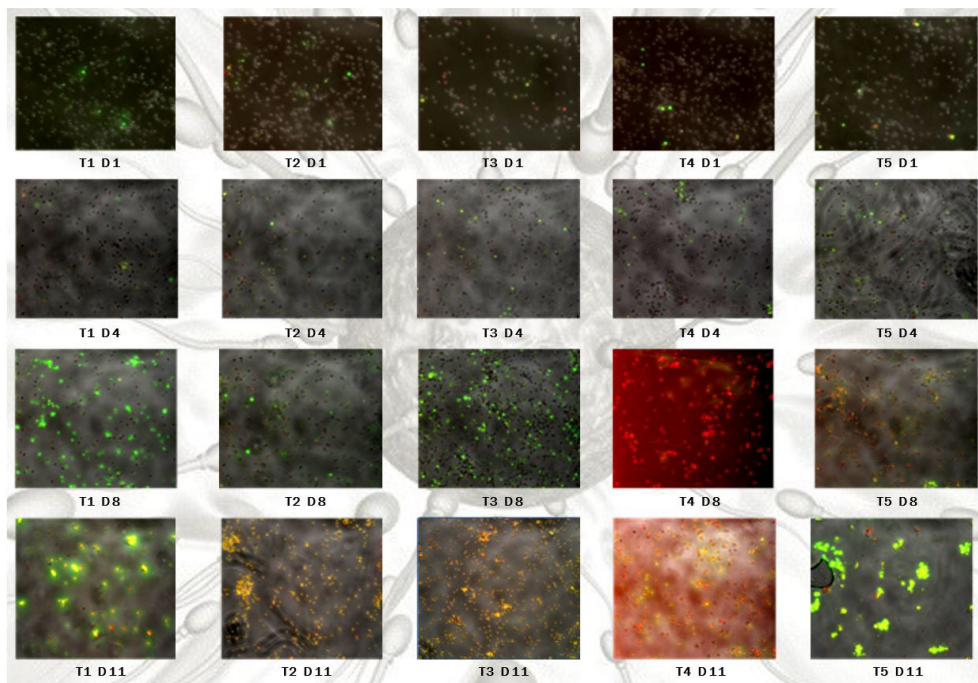
Figura 3: Variación temporal de espermatozoides productores de anión superóxido (%) evaluados los días 1, 4, 8 y 11 en semen de trucha arcoíris (*O. mykiss*) almacenado a 4°C en diferentes tratamientos. T1 semen sin diluir; T2: semen diluido en diluyente espermático, StopMiltMR (1:2) y semen diluido en StopMiltMR (1:2) más antioxidantes [T3: Polifenoles de uva (50%) (1mg/mL); T4: Trolox C (4µM); T5: L- ácido ascórbico (1µM)].



En la figura 4 se muestra el cambio experimentado por los tratamientos en el transcurso del tiempo. La técnica utilizada fue la propuesta por De Iuliis *et al.* (2006) modificada, la cual detecta la producción de anión superóxido (O_2^-) intracelular a través del colorante fluorescente dihidroetidio (DHE) (fluorescencia nuclear color rojo) y para identificar los espermatozoides que no producían (O_2^-) se incorporó una tinción fluorescente (SYTOX Green, color verde).

Para mayores detalles sobre la metodología, consultar el trabajo de Ibáñez-Arancibia *et al.* (2023).

Figura 4: Variación temporal de espermatozoides productores de anión superóxido (%) evaluados los días 1, 4, 8 y 11 en semen de trucha arcoiris (*O. mykiss*) almacenado a 4°C en diferentes tratamientos, teñidos con DHE y SYTOX Green (Aumento total: 400X). T₁: semen sin diluir; T₂: semen diluido en diluyente espermático, StopMiltMR (1:2) y semen diluido en StopMiltMR (1:2) más antioxidantes [T₃: Polifenoles de uva (50%) (1mg/mL); T₄: Trolox C (4μM); T₅: L- ácido ascórbico (1μM)]. Días de muestreo (D1: día 1; D4: día 4; D8: día 8; D11: día 11).



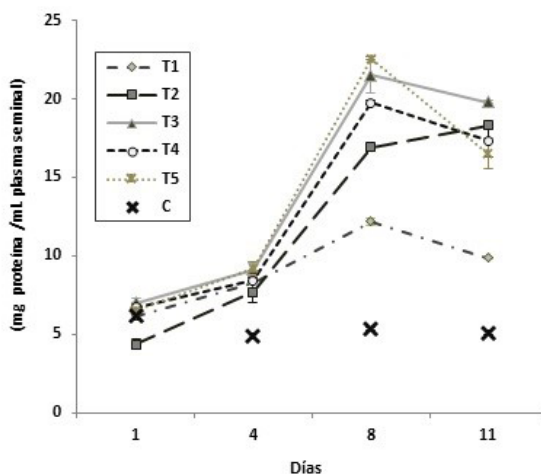
El resultado del ANOVA bidireccional indica que tanto el tiempo de almacenamiento como los tratamientos tienen un efecto significativo, ya sea combinado o por separado, sobre la viabilidad de los espermatozoides ($p < 0,05$).

3.4 LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN PLASMA SEMINAL

T₁, T₃, T₄ y T₅ no presentó diferencias significativas entre ellas los días 1 y 4 ($p < 0,05$). El día 8, T₃ y T₅ presentaron los valores más altos, sin mostrar diferencias

significativas entre ellos ($p < 0,05$). El día 11, T_3 y T_2 mostraron los valores más altos, sin mostrar diferencias significativas entre ambos ($p < 0,05$) (figura 5). El resultado del ANOVA bidireccional indica que tanto el tiempo de almacenamiento como los tratamientos tienen un efecto significativo, ya sea combinado o por separado, sobre la concentración de proteínas en el plasma seminal ($p < 0,05$).

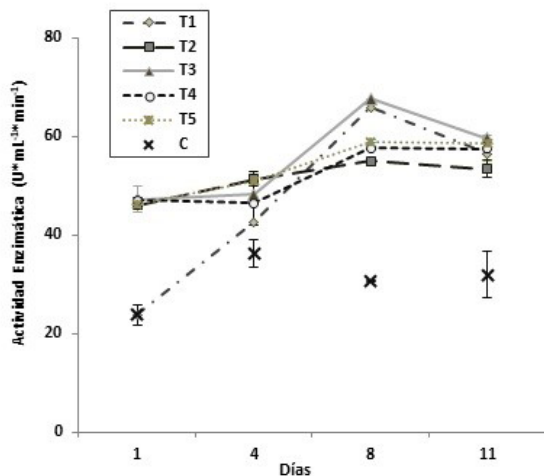
Figura 5: Variación temporal de la concentración de proteína (mg/mL) evaluada en plasma seminal de trucha arcoíris (*O. mykiss*) almacenado a 4°C en diferentes tratamientos. T_1 : semen sin diluir; T_2 : semen diluido en diluyente espermático, StopMiltMR (1:2) y semen diluido en StopMiltMR (1:2) más antioxidantes [T_3 : Polifenoles de uva (50%) (1mg/mL); T_4 : Trolox C (4 μ M); T_5 : L- ácido ascórbico (1 μ M)].



3.5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) EN PLASMA SEMINAL

La actividad enzimática media de la SOD evaluada en el plasma seminal del semen almacenado en los diferentes tratamientos se muestra en la figura 6. Los días 1 y 4, los valores de actividad más altos fueron presentados por T_2 , T_3 , T_4 y T_5 , sin diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$). En el día 8 y 11, los valores significativamente más altos fueron registrados por T_3 ($p < 0,05$). El resultado del ANOVA bidireccional indica que tanto el tiempo de almacenamiento como los tratamientos tienen un efecto significativo, ya sea combinado o por separado, sobre la actividad enzimática de la SOD en el plasma seminal ($p < 0,05$).

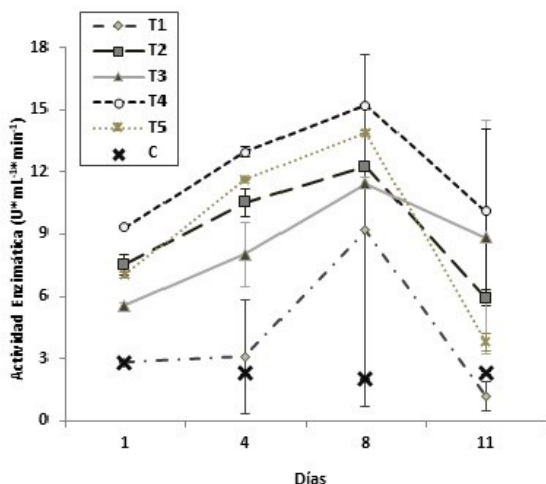
Figura 6: Variación temporal de la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) ($U^*mL^{-1}min^{-1}$) evaluada en plasma seminal de trucha arcoiris (*O. mykiss*) almacenado a 4°C en diferentes tratamientos. T₁: semen sin diluir; T₂: semen diluido en diluyente espermático, StopMiltMR (1:2) y semen diluido en StopMiltMR (1:2) más antioxidantes [T₃: Polifenoles de uva (50%) (1mg/mL); T₄: Trolox C (4μM); T₅: L- ácido ascórbico (1μM)].



3.6 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA EN EL PLASMA SEMINAL

El día 4, solo T₁ registró una actividad significativamente menor que el resto de los tratamientos ($p < 0,05$). En el caso de los días 1, 8 y 11, los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$) (figura 7).

Figura 7: Variación temporal de la actividad enzimática de la catalasa ($U^*mL^{-1}min^{-1}$) evaluada en plasma seminal de trucha arco iris (*O. mykiss*) almacenado a 4°C en diferentes tratamientos. T₁: semen sin diluir; T₂: semen diluido en diluyente espermático, StopMiltMR (1:2) y semen diluido en StopMiltMR (1:2) más antioxidantes [T₃: Polifenoles de uva (50%) (1mg/mL); T₄: Trolox C (4μM); T₅: L- ácido ascórbico (1μM)].



El resultado del ANOVA bidireccional indica que solo el tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo sobre la actividad enzimática de la catalasa en el plasma seminal ($p < 0,05$).

Para ver los detalles de la discusión, consultar el trabajo de Ibáñez-Arancibia *et al.* (2023).

4 CONCLUSIÓN

El análisis de varianzas a dos vías mostró que tanto el tiempo de almacenamiento como la influencia de los antioxidantes tienen efectos significativos sobre los parámetros de viabilidad (motilidad y viabilidad de los espermatozoides, concentración de proteínas y actividad enzimática de superóxido dismutasa en el plasma seminal) y combinado o por separado. Excepto por la capacidad fertilizante y la actividad enzimática de la catalasa en el plasma seminal donde solo el tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo sobre ellas. Trolox-C (T_4) fue el antioxidante que más influyó positivamente en los parámetros de viabilidad. En cuanto a la actividad enzimática de superóxido dismutasa, los resultados mostraron una interacción directa entre ésta y los polifenoles del vino (T_3). Finalmente, la concentración de proteínas en el plasma seminal resultó ser un buen indicador de la calidad del semen, pues valores altos revelarían emanación de compuestos celulares internos, provocados por daño severo, lisis o necrosis celular. En resumen, al analizar los resultados se puede concluir que la presencia de antioxidantes mejora la viabilidad del semen almacenado en frío, permitiendo la fecundación, a pesar de la pérdida de motilidad.

REFERENCIAS

Canyurt, M. A., & Akhan, S. (2008). Effect of dietary vitamin E on the sperm quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 39, 1014-1018. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01952.x>

Contreras, P., Dumorné, K., Ulloa-Rodríguez, P., Merino, O., Figueroa, E., Farías, J. G., Valdebenito, I., & Risopatrón, J. (2020). Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12, 1373-1389. <https://doi.org/10.1111/raq.12387>

De Iulius, G. N., Wingate, J. K., Koppers, A. J., McLaughlin, E. A., & Aitken, J. (2006). Definitive Evidence for the Nonmitochondrial Production of Superoxide Anion by Human Spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(5), 1968-1975. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2711>

Figueroa, E., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Merino, O., Isachenko, V., & Valdebenito, I. (2013). Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture Research*, 372-375, 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.019>

Ibáñez-Arancibia, E., Fariás, J. G., & Valdebenito, I. (2023). Use of antioxidants and time of cold storage: effects over viability parameters and enzymatic levels in semen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Brazilian Journal Biology*, 83, e245329. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.245329>

Lahnsteiner, F., Mansour, N., & Plaetzer, K. (2010). Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Animal Reproduction Science*, 119(3-4), 314-321. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.01.010>

Merino, O., Dumorné, K., Sandoval-Vargas, L., Figueroa, E., Valdebenito, I., Fariás, J. G., & Risopatrón, J. (2020). Short-term storage sperm of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at 4°C: Effect of sperm: Extender dilution ratios and antioxidant butyl-hydroxytoluene (BHT) on sperm function. *Cryobiology*, 95, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.06.007>

Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(4), 503-515. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>

Sanchez-Rodriguez, M., & Billard, R. (1977). Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de truite arc-en-ciel maintenu à des températures voisines de 0°C. *Bulletin Français de Pisciculture*(265), 143-152. <https://doi.org/10.1051/kmae:1977009>

Sandoval-Vargas, L., Silva, M., Risopatrón, J., Figueroa, E., Cabrita, E., & Valdebenito, I. (2020). Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. *Reviews in Aquaculture*, 13, 365-387. <https://doi.org/10.1111/raq.12479>

CAPÍTULO 16

USE OF A PCR-RFLP MOLECULAR TEST FOR THE DIFFERENTIATION OF *Babesia bovis* AND *Babesia bigemina* IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE BABESIOSIS

Data de submissão: 20/12/2022

Data de aceite: 05/01/2023

José Juan Lira Amaya

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
ORCID: 0000-0003-4909-8769

Diego Jesús Polanco Martínez

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
ORCID: 0000-0002-9239-5788

Rebeca Montserrat Santamaría Espinosa

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
ORCID: 0000-0002-1153-6455

Grecia Martínez García

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
ORCID: 0000-0002-5795-5567

Carmen Rojas Martínez

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
ORCID: 0000-0001-9177-5634

Jesús Antonio Álvarez Martínez

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México

Julio Vicente Figueroa Millán¹

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
ORCID: 0000-0003-4731-3592

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the diagnostic capacity of a PCR test to detect *Babesia* spp, based on genus-specific oligonucleotides that amplify a portion of the small subunit ribosomal RNA gene (18S rDNA), as well as on the species determination by digestion of the amplification product with restriction enzymes (PCR-RFLP). *Babesia* spp DNA extraction was obtained from infected erythrocytes using a commercially available kit. DNA amplification was performed with

¹ Corresponding autor Julio V. Figueroa Millán. CENID-Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Km 11.5 Carr. Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, Morelos, 62550.

a PCR master mix using as primers oligonucleotides targeting a variable region of the 18S rDNA gene. The amplified PCR products were digested with the restriction enzymes (RE) *Hinc* II, *ScrF* I, *Msp* I, *Acu* I, *Nla* III and *Box* I. The amplified and RE-digested PCR products were visualized by electrophoresis on 3% agarose gels. The PCR test allowed the amplification of a DNA fragment of \approx 400 bp. Amplicons digested with RE *ScrF* I and *Msp* I showed fragments of 250 and 150 bp in samples containing *B. bovis* DNA, while amplicons of samples infected with *B. bigemina* were not digested. Amplicons digested with RE *Acu* I and *Box* I showed fragments of 290 and 110 bp in samples infected with *B. bigemina*, while in samples infected with *B. bovis* the 400 bp amplicon was not digested. Therefore, the PCR-RFLP test could be utilized to differentiate the *Babesia* species that infect bovine erythrocytes according to the pattern result obtained after RE digestion. In addition, amplicons digested with RE *Hinc* II, fragments of 330 and 65 bp are produced in the samples infected with *B. bovis*, but not in the amplicons obtained in samples infected with *B. bigemina*. Thus, the PCR-RFLP test targeting the 18S rDNA gene may be a useful diagnostic tool to confirm the bovine babesiosis infection status and species discrimination in the acute phase of the disease.

KEYWORDS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, PCR-RFLP.

UTILIZAÇÃO DE UM TESTE MOLECULAR PCR-RFLP PARA A DIFERENCIAÇÃO DE *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* NO DIAGNÓSTICO DE BABESIOSE BOVINA

RESUMO: Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade diagnóstica de um teste de PCR para detecção de *Babesia* spp, baseado em oligonucleotídeos gênero-específicos que amplificam uma porção da pequena subunidade do gene do RNA ribossômico (18S rDNA), bem como na determinação da espécie por digestão do produto de amplificação com enzimas de restrição (PCR-RFLP). A extração de DNA de *Babesia* spp foi obtida de eritrócitos infectados usando um kit comercialmente disponível. A amplificação do DNA foi realizada com uma master mix de PCR usando como primers oligonucleotídeos direcionados a uma região variável do gene 18S rDNA. Os produtos de PCR amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição (ER) *Hinc* II, *ScrF* I, *Msp* I, *Acu* I, *Nla* III e *Box* I. Os produtos de PCR amplificados e digeridos com ER foram visualizados por eletroforese em géis de agarose a 3%. O teste de PCR permitiu a amplificação de um fragmento de DNA de \approx 400 pb. Amplicons digeridos com ER *ScrF* I e *Msp* I apresentaram fragmentos de 250 e 150 pb em amostras contendo DNA de *B. bovis*, enquanto amplicons de amostras infectadas com *B. bigemina* não foram digeridos. Os amplicons digeridos com ER *Acu* I e *Box* I apresentaram fragmentos de 290 e 110 pb nas amostras infectadas com *B. bigemina*, enquanto nas amostras infectadas com *B. bovis* o amplicon de 400 pb não foi digerido. Portanto, o teste de PCR-RFLP poderia ser utilizado para diferenciar as espécies de *Babesia* que infectam eritrócitos bovinos de acordo com o resultado do padrão obtido após a digestão de RE. Além disso, amplicons digeridos com ER *Hinc* II, fragmentos de 330 e 65 pb são produzidos nas amostras infectadas com *B. bovis*, mas não nos amplicons obtidos em amostras infectadas com *B. bigemina*. Assim, o teste de PCR-RFLP visando o gene 18S rDNA pode ser uma ferramenta diagnóstica útil para confirmar o estado de infecção da babesiose bovina e a discriminação de espécies na fase aguda da doença.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia bovis*. *Babesia bigemina*. PCR-RFLP.

1 INTRODUCTION

Among the diseases that cause the greatest economic losses in livestock in the world are those transmitted by ticks and that considerably affect productive species, such as cattle. Bovine babesiosis is a disease caused by the intraerythrocytic parasites *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* (Bock et al, 2004). In Mexico, the disease is transmitted by the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, and is characterized by causing high morbidity and mortality, with the presence of fever, hemolytic anemia, hemoglobinuria, jaundice and, frequently, death (Figuroa & Álvarez, 2003; Bock et al, 2004; Álvarez et al, 2020). In the affected herds there is a temporary reduction in reproduction and abortions after the first third of gestation (Morilla González, 1981; Bock et al, 2004; OIE, 2021).

Cattle farming in Mexico amounts to more than 32 million heads (SIAP, 2022) of which 70% are raised in tropical and subtropical regions, regions of high incidence of the tick vector (Navarrete, et al., 2002). Diagnosis of the disease can be made by using direct and indirect techniques. One of the most widely used indirect methods in Mexico is the indirect fluorescence antibody test (IFAT), which is characterized by the detection of circulating antibodies in blood and with an apparently high diagnostic sensitivity and specificity ($\geq 90\%$). However, the IFAT has the disadvantage of being subjective and not being able to discriminate between the infecting species, given the cross-reaction observed in sera from animals where both parasites coexist (OIE, 2021). Direct methods include those that directly detect the presence of the pathogen: The most common is the preparation of smears and the observation of intraerythrocytic parasites in slides stained with Giemsa stain.

In veterinary clinical practice, laboratory tests are required to confirm the clinical diagnosis and to differentiate the species of parasites that infect sick animals suffering from acute babesiosis due to *Babesia bovis* or *B. bigemina*. Currently available conventional diagnostic methods, such as microscopic examination of blood smears stained with Romanowski derivatives, have some limitations due to low analytical sensitivity (particularly for *B. bovis*), requirement of a trained microscopist to identify and differentiate species involved, and low performance in terms of the number of samples analyzed in a workday (Martínez-García et al 2021; Momčilović et al, 2019).

Diagnostic tests based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) have high analytical sensitivity and specificity and are likely to provide high performance. Molecular procedures have been developed that allow detecting, with greater analytical sensitivity, the presence of parasites and the species identification species. These include nucleic acid probes and the Polymerase Chain Reaction (PCR) test (Figuroa and Álvarez, 2003;

Figuroa et al, 1996). In most of these methods, however, one PCR test per species is required and sometimes two PCR tests per species if DNA re-amplification is performed with the nested PCR method (Martínez et al, 2021; Kumar et al, 2022).

The objective of this work was aimed at evaluating the diagnostic capacity of a PCR test for *Babesia* spp, based on genus-specific oligonucleotides that amplify a portion of the ribosomal DNA gene of any *Babesia* species, as well as on the determination of the species by digestion of the amplification product with restriction enzymes (PCR-RFLP).

2 MATERIALS AND METHODS

In order to fine-tune the PCR-RFLP test, red blood cells infected with *B. bovis* and *B. bigemina* were obtained from strains established in *in vitro* culture (Álvarez et al 2020). Additionally, whole blood was obtained from animals infected with 9 different *B. bovis* isolates (Genis et al, 2009; Pérez et al, 2010), and 9 different *B. bigemina* isolates including one isolate with mixed infection (Figuroa et al, 2013). In addition, 10 engorged female ticks that fed on calves experimentally infected with *B. bovis* and *B. bigemina* and positive to the tick hemolymph test (Castañeda et al, 2012) were included in the study.

The extraction of the genomic DNA of *Babesia* spp was carried out by means of the column purification procedure using a commercial kit. For the PCR test, we proceeded to amplify the variable portion of the gene that codes for the 18S small subunit ribosomal RNA (ssrRNA), using the oligonucleotides PIRO-A and PIRO-B (Olmeda et al 1997; Carret et al, 1999) which can be used to amplify different species of the Piroplasmids *Babesia* (Carret, 1999) and *Theileria* (Kumar et al, 2022). PCR reactions were performed in 0.2 ml PCR tubes, with a final volume of 25 µl, to which 12.5 µl of Master mix (Taq polymerase, dNTPs, Magnesium Chloride), 5.5 µl of nuclease-free water, 5 µl of purified DNA (containing 100 ng), and 2 µl of a mixture of the sense oligonucleotides PIRO-A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') and anti-sense PIRO-B (5'-TTAAATACGAATGCCCCAAC-3') (Carret et al, 1999). The amplification reaction was carried out in a thermal cycler, under the following cycling protocol: initial denaturation at 94°C for 5 minutes one cycle, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, alignment at 55°C for 1 minute, extension at 72°C for 1 minute, final extension at 72°C for 5 minutes and storage at 4°C until removal of the PCR tubes for sample analysis. The product amplified by PCR with the oligonucleotides PIRO-A and PIRO-B was digested with the restriction enzymes *Hinc* II, *ScrF* I, *Msp* I, *Acu* I, *Nla* III and *Box* I, according to the supplier's specifications. Based on a bioinformatic analysis performed with the ribosomal DNA sequence of each *Babesia* species, a recognition site for each of these enzymes was identified in the variable part of the parasite's rDNA gene. For example, theoretically, the restriction enzyme *Box* I (recognition sequence

5'-GACNN↓NNGTC-3') would cut only the amplicon corresponding to *Babesia bigemina* ribosomal DNA, while the enzyme *Msp I* (recognition site 5' -C↓CGG-3') would cut only the amplicon corresponding to *Babesia bovis* ribosomal DNA. According to the amount of amplified DNA needed for each restriction enzyme digestion, the final reaction volume was 31 µl, where 10 µl of PCR product, 18 µl of nuclease-free water, 2 µl of 10x tango buffer, 1 µl of enzyme *Hinc II*, *ScrF I*, *Msp I*, *Acu I*, *Nla III* or *Box I*. Digestion with these enzymes was carried out in a water bath at a temperature of 37°C and for 16 hours. PCR products and restriction enzyme digestion derivatives were visualized by horizontal electrophoresis on 2-3% agarose gels in 1X TAE buffer and stained with 1.5 µl of ethidium bromide (10 mg/ml). Molecular markers of 1 Kb or 100 bp were used to discern and estimate the size of amplicons and enzymatic digestion products. For this, 24 µl of reaction were placed in each well of the product obtained by PCR and subjected to electrophoresis at 85 volts with running buffer (TAE 1X) and the gel was visualized in a transilluminator with ultraviolet light. In addition, RE *Msp I* and *Box I* were selected and tested in PCR amplicons obtained from samples containing *B. bovis*, *B. bigemina* and a mixed infection of *B. bovis/B. bigemina*.

3 RESULTS

In order to implement a confirmatory diagnostic test for bovine babesiosis, a procedure consisting of *Babesia* spp DNA amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) and restriction enzyme fragment length polymorphism analysis (RFLP) was developed. The PCR assay amplifies a fragment of ≈400 base pairs (bp) in *B. bovis* and *B. bigemina* derived from in vitro culture. If the obtained amplicon is digested with the RE *ScrF I* and *Msp I*, 2 fragments of ≈250 and 150 bp in length (RFLP) are obtained only in samples containing *Babesia bovis*, while in samples infected with *B. bigemina* the amplicon is not digested. If the amplicon is digested with RE *Box I* and *Acu I*, 2 fragments of ≈290 and 110 bp are obtained in samples infected with *B. bigemina*, while in samples infected with *B. bovis* the 400 bp amplicon is not digested, thus differentiating the infecting species by means of the restriction pattern (PCR-RFLP). In addition, in the amplicons digested with RE *Hinc II*, fragments of 330 bp and 65 bp are produced (difficult to resolve and identify the latter in the gel) in the samples infected with *B. bovis*, but not in the amplicons obtained in samples infected with *B. bigemina*. However, the RE *Nla III* digests the amplicon of the 2 *Babesia* species, generating fragments of approximately 250 bp and a 75 bp doublet in *B. bovis*, while in the sample containing *B. bigemina* a 300 bp fragment and one of 100 bp are produced after digestion. Figures 1 and 2 show a representative result of the amplicons obtained in the PCR test and subject to enzymatic digestion (RFLP) in the *Babesia* samples derived from in vitro culture.

Figure 1. PCR-RFLP analysis of products amplified with PIRO-A/PIRO-B oligonucleotides and digested with restriction enzymes. Lane identification: 100 bp marker (M); PCR product digested with Restriction Enzyme *ScrF* I (1); *Hinc* II (2); *Msp* I (3); *Box* I (4); *Nla* III (5); *Accu* I (6); Not digested (N).

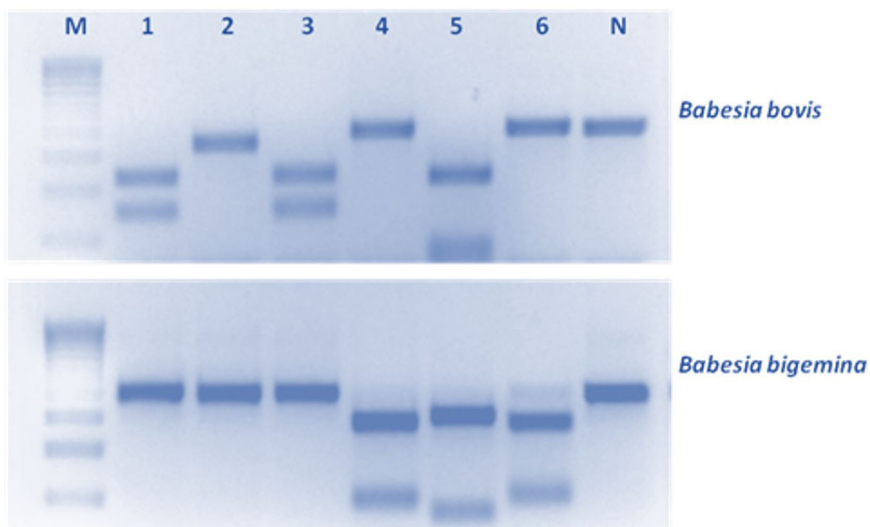
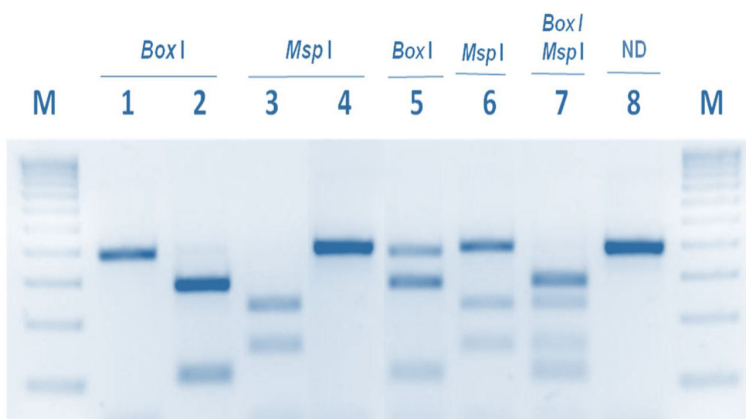


Figure 2. PCR-RFLP analysis of products amplified with PIRO-A/PIRO-B oligonucleotides and digested with restriction enzymes. Lane identification: M) Molecular marker, 100 bp; 1 and 3) *B. bovis*; 2 and 4) *B. bigemina*; 5-8) Mixed *B. bovis*/*B. bigemina*; ND) Not digested with RE.

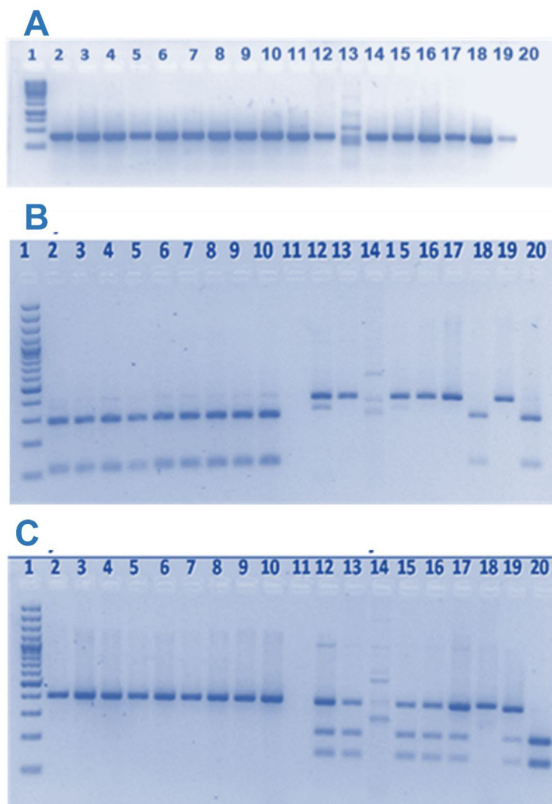


The amplicons obtained were analyzed by PCR-RFLP to verify the specificity of the test with the use of restriction enzymes for each of the *Babesia* species analyzed in this work (Figure 2). The amplicons corresponding to *B. bigemina* were fully digested, obtaining the expected 290 bp and 110 bp fragments in *B. bigemina* samples, whether single infection or mixed infection (Figure 2, lanes 2 and 5). On the other hand, samples digested with the enzyme *Msp* I, corresponding to *B. bovis*, were also fully digested, obtaining the two fragments of interest with expected sizes of 250 bp and 150 bp (Figure 2, lanes 3 and 6). In lane 1 we can observe undigested DNA that served as a control to identify those

samples that could possibly be undigested. In addition, to rule out possible non-specificities of the RE used in the study, the RE were inverted to confirm their specificity, ensuring that both enzymes are specific to the amplicon for each species. Thus, *B. bigemina* samples that were digested with *Box I* were also digested with RE *Msp I* and *B. bovis* was digested with RE *Box I*, visualizing only the 400 bp fragments in each case (Figure 2, lanes 1 and 4), unless the amplicon was from a mixed sample containing both *Babesia* sp (Fig 2, lanes 5 and 6). Additionally, two digestion controls were added to confirm that the specific enzymatic reaction was taking place, one where the mixed *Babesia* sp sample was double-digested with RE *Box I*/*Msp I*, obtaining the four DNA fragments of the expected size, ie, 290 bp, 250 bp, 150 bp and and 110 bp (Figure 2 lane 7), and the undigested control (Figure 2. Lane 8).

The PCR test with the PIRO A/B oligonucleotides managed to amplify a fragment of approximately 400 bp in all the DNA samples obtained from the 18 different *Babesia* spp. isolates. The PCR-RFLP test implemented then allows the identification of erythrocytes infected with either *Babesia bovis* or *B. bigemina* (Figure 3A).

Figure 3. PCR-RFLP analysis of products amplified with PIRO-A/PIRO-B oligonucleotides and digested with restriction enzymes. Lane identification: 1) 100 bp marker; Lanes 2-9: Isolates classified as *B. bovis*; Lanes 12-20: Isolates classified as *B. bigemina*. Panel A: PCR amplification results with oligonucleotides PIRO A/B); Panel B: PCR-RFLP result with amplicons digested with RE *Box I*; Panel C: PCR-RFLP result with amplicons digested with RE *Msp I*.



The PCR test amplifies a fragment of approximately 400 bp in *B. bovis* and *B. bigemina* from the different geographic isolates. Figure 2 shows the representative result of the amplicons obtained in the PCR assay when amplicons are subject to enzymatic digestion (RFLP) in samples derived from 18 different geographic isolates (9 classified microscopically as *B. bovis* and 9 classified as *B. bigemina*). If the obtained amplicon is digested with RE *Box* I, as expected, 2 fragments of \approx 290 and 110 bp are obtained in the samples infected only with *B. bigemina*, while in the samples infected with *B. bovis* the 400 bp amplicon is not digested, unless the sample was co-infected (Figure 3B, lanes 18 and 20). If the obtained amplicon is digested with the RE *Msp* I, fragments of 400 bp, \approx 250 and 150 bp in length (RFLP) are obtained in samples containing only *B. bovis* (denoting partial digestion in most of the samples classified as *B. bovis*), while in samples infected with *B. bigemina* the amplicon is not digested, thus differentiating the infecting species by means of the restriction pattern (PCR-RFLP). In addition, if the PCR-derived amplicons from a sample co-infected with *B. bovis* and *B. bigemina* are digested with RE *Box* I, bands of 290 and 110 bp are obtained, while in the sample digested with RE *Msp* I fragments of 250 and 150 bp are observed, differentiating the species present in the samples co-infected with *B. bovis* and *B. bigemina* (Figure 3C, lane 20). The PCR test performed on the 10 *Rh microplus* tick samples processed allowed the 10 specimens to be identified with amplicons of the expected size (400 bp). However, only in 6 specimens could an intense band be visualized (not shown). Enzymatic digestion with RE *Box* I and *Msp* I of the amplicons obtained allowed us to identify a pattern corresponding to *B. bigemina* in 5 of the ticks and a pattern corresponding to *B. bovis* in 3 ticks, with a mixed infection in 2 ticks (not shown).

4 DISCUSSION AND CONCLUSIONS

It was possible to implement the PCR test to detect *Babesia* spp in infected erythrocytes from in vitro culture and in isolates propagated in experimental animals, through the use of generic PIRO-A and PIRO-B oligonucleotides. It was shown that the PCR test for *Babesia* sp DNA amplification using oligonucleotides that align the gene that codes for 18S ribosomal RNA, can detect an infection due to the presence of *Babesia bigemina* and/or *B. bovis* in experimentally inoculated animals.

It was possible to implement the PCR test to detect *Babesia* spp in DNA extracted from erythrocytes infected with 18 different geographic isolates of *B. bigemina* and *B. bovis*. By using generic oligonucleotides that align to the gene that codes for 18S ribosomal RNA, the PCR test can detect the presence of *B. bigemina* and/or *B. bovis* in

field samples, thus demonstrating the conservation of the 18S ribosomal DNA gene in *Babesia* species in Mexico.

Previous work used DNA purified from in vitro cultured parasites as template (Carret, 1999; Carret et al, 1999), obtaining an amplicon of the expected size but without being able to differentiate the species: *B. bovis* or *B. bigemina*, given that no enzymatic digestion process was carried out. Several studies have been reported in different countries based on the use of PCR in conjunction with the RFLP technique to detect and differentiate pathogens of economic importance, which mainly affect the livestock industry, as in many cases those Pathogens may cause the death of the infected animal. In a study carried out in 2000, it was possible to implement the enzymatic digestion of a product of rDNA amplification with primers F: 5'-GAG TAA ATT AGA GTG TTC CAA GCA-3' and R: 5'-CGG AAT TAA CAA GAC AAA TC-3', which amplify a portion of the 18S subunit of approximately 564 bp and using the PCR-RFLP assay with the enzyme *Kpn* I, the detection of *Theileria annulata* was achieved in field conditions where mixed infections with *B. bigemina* and *T. evansi* are very common (Ravindran et al 2007a). With these primers it was possible to amplify *B. bigemina* and *T. annulata* rDNA, both ~564 bp fragments, in contrast to *T. evansi* rDNA and bovine DNA which were not amplified. At the same time, the use of other RE such as *Mbo* I, *Hue* III, *Alu* I, *Hinf* I and *Taq* I was ruled out as a potential marker for the differentiation of *Theileria* and *Babesia* species, resulting in the RE *Kpn* I as the only restriction marker for differentiation in mixed infections, since it produces a double digestion pattern only for *T. annulata* of 466 bp and 98 bp. Another study carried out the same year was able to establish a diagnosis to differentiate mixed infections caused by *B. bigemina* and *Theileria annulata* in calves by using restriction enzymes in PCR amplification products using the same set of oligonucleotides described in the previous experiment (Ravindran et al, 2007b). In this study RE *Cfr*131 was capable of differentiating between both species, obtaining different digestion patterns between species, finding a triple digestion pattern for *B. bigemina*, obtaining sizes of 393bp, 101bp and 66bp while for *T. annulata* a double digestion pattern of 463 bp and 101 bp.

APCR_RFLP assay has also been designed for the molecular identification of *Theileria* spp. with the use of the oligonucleotides F^{ThBab} 5'-GCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGG-3' and R^{ThBab} 5'-GATAAGGTTCAAAAACCTCCCTAG-3' based on the amplification of a region of the 18S rDNA gene of ~861bp used to make a differentiation between *T. ovis*, *T. lestoquardi* and *T. annulata* species, by using the RE *Hinc* II and *Vsp* I (Jalali et al, 2014).

With the implementation and use of the PCR-RFLP assay, the aim is to increase the specificity and reduce the difficulty in making confirmatory and differential diagnoses, as traditional methods used, such as microscopy and serological methods, might have

high variability since the diagnosis depends on factors such as the analyst's interpretation, morphological similarity between species, and cross-reaction, just to name a few (Delespaux et al, 2003; Solano-Gallego et al, 2008; Karimi et al, 2012).

In the present work, the presence of *Babesia* spp. in most of the isolates analyzed was accomplished and, in turn, it was possible to differentiate between species using the PCR-RFLP assay, with the oligonucleotides PIRO A/PIRO B, and RE Box I, and *Msp* I.

The PCR-RFLP assay used as a technique for direct detection can be accurate and reliable, when compared to the light microscopy examination of thin blood smears. However, it is necessary to evaluate a large number of positive samples from truly infected animals in order to determine their analytical sensitivity and diagnostic specificity, as compared to the conventional microscopic test (Figuroa et al, 1996). However, it can be argued that it is in terms of the specificity of the tests and the number of samples that can be processed in a workday by an analyst, where clear differences between the two diagnostic tests can be established. For example, a microscopist can easily analyze 30 thin blood smears observed in a workday if the operator spends approximately 10-15 minutes microscopically analyzing blood smears (Figuroa et al 1996; Bock et al, 2004). However, to achieve this, it is necessary to have a person with experience in the detection and speciation of blood parasites. On the other hand, the PCR test, although it is a high-cost technique due to the reagents it uses, it has the great advantage that in a 8-hour workday, and given the (semi)automation of the DNA amplification procedure, it can provide better performance in terms of having a greater number of samples processed in a workday. Additional experiments carried out with the PCR-RFLP-based test, allowed the identification of *Babesia* infections in animals experimentally and naturally infected with *B. bovis* and/or *B. bigemina*, as well as in *Rhipicephalus microplus* ticks that fed on these animals. Thus, the PCR-RFLP assay tested in Mexico, allows a differentiation of *B. bovis* and/or *B. bigemina* with the use of RE Box I and *Msp* I for digestion of an amplicon obtained by PCR. The assay can be implemented to monitor infection by *Babesia* spp primarily in the acute phase of the disease, in such a way that the prepatent and/or patent period of infection in preimmunized and/or naturally infected animals can be estimated.

A more sensitive and species-specific confirmatory diagnostic test, such as the PCR-RFLP test, is instrumental for the detection and differentiation of *B. bovis* and *B. bigemina*, since it allows the analysis of a greater number of samples in less time and facilitates the establishment of a more effective and timely medical intervention for the treatment of bovine babesiosis. The PCR-RFLP test can be applied in any region or country where there are laboratories with basic equipment for the PCR test, where a more accurate diagnosis of babesiosis is required. Even though the PCR-RFLP test is indicated

for the analysis of DNA extracted from the blood of animals in the acute phase of the disease, additional experiments need to be carried out for its implementation in tissues (brain, kidney, liver) obtained from recently dead animals with signs compatible with the disease. The test may also be used in the detection of mixed infection in cattle, as well as in the identification and differentiation of *Babesia* spp in the tick vector *Rh. microplus* and/or *Rh. annulatus*.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

Álvarez-Martínez JA., Figueroa-Millán JV. 2007. Cultivo in vitro de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y su aplicación para la producción de vacuna. *Ciencia Veterinaria*, 10: 137-153.

Alvarez JA, Rojas C, Figueroa JV. 2020. An overview of current knowledge on in vitro *Babesia* cultivation for production of live attenuated vaccines for bovine babesiosis in Mexico. *Front Vet Sci*. 26; 7:364.

Bock R., Jackson J., de vos A. and Jorgensen W. 2004. Babesiosis of Cattle. *Parasitology*. 129, S247-S269.

Carret CM. 1999. *Babesia canis*: caracterisation d'antigenes parasitaires solubles potentiellement impliqués dans l'immunoprotection induite chez le chien et analyse molecularire du polymorphisme genetique des sous especies. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia, Universidad de Montpellier I. Montpellier, Francia.

Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout É, Moubri K, Schetters TP, Gorenflot A. 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryotic Microbiol*. 46(3): 298-303.

Castañeda-Arriola RO, Rojas-Martínez C, Figueroa-Millán JV, Martínez-Ibáñez F, Álvarez-Martínez JA. 2012. Uso de PCR anidada para determinación de infección por *Babesia* spp en garrapatas *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*. 1er Congreso Latinoamericano de Acarología 2012. Sociedad Mexicana de Entomología A.C., Primera Ed 2012. p. 176-180.

Delespaux V, Ayrat F, Geysen D, Geerts S. 2003. PCR-RFLP using ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different *Trypanosome* species in cattle. *Veterinary Parasitology* 117, 185-193.

Figueroa-Millán JV, Álvarez-Martínez JA. 2003. Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 9: 75-103.

Figueroa JV, Alvarez JA, Canto GJ, Ramos JA, Mosqueda JJ, Buening GM. 1996. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 23: 117-127.

Figueroa-Millán JV, Pérez-Sosa J, Vargas-Uriostegui P, Rojas-Martínez C, Álvarez-Martínez JA. 2013. Clonación y secuenciación de rap-1α a partir de aislados mexicanos de *Babesia bigemina*. XXXVII Congreso Nacional de Buiatría, 1-3 de agosto, 2013. Acapulco, Gro. Mexico. pp. 618-624.

Genis AD, Perez J, Mosqueda JJ, Alvarez A, Camacho M, Muñoz MDL. Rojas C, Figueroa JV. 2009. Using *msa-2b* as a molecular marker for genotyping Mexican isolates of *Babesia bovis*. *Infect. Genet. Evol*. 2009, 9, 1102-1107.

Jalali SM, Khaki Z, Kazemi B, Rahbari S, Shayan P, Bandehpour M, Yasini SP. 2014. Molecular detection and identification of *Theileria* species by PCR-RFLP method in sheep from Ahvaz, Southern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 9(1), 99-106.

Karimi A, Behnam A, Vafafar A, Ghorbani A, Mard M. 2012. Simultaneous detection and differentiation of ovine piroplasms in *Hyalomma anatolicum* using PCR-RFLP. *World Applied Sciences Journal*. 20, (8): 1092-1097.

Kumar B, Maharana BR, Thakre B, Brahmabhatt NN, Joseph JP. 2022. 18S rRNA gene-based piroplasmid PCR: An assay for rapid and precise molecular screening of *Theileria* and *Babesia* species in animals. *Acta Parasitol*. 67(4): 1697-1707.

Martínez-García G, Santamaría-Espinosa RM, Lira-Amaya JJ, Figueroa JV. (2021). Challenges in tick-borne pathogen detection: The case for *Babesia* spp. identification in the tick vector. *Pathogens* 10, no. 2: 92.

Momčilović S, Cantacessi C, Arsić-Arsenijević V, Otranto D, Tasić-Otašević S. 2019. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clin Microbiol Infect*. 25(3):290-309.

Morilla-González A. 1981. Inmunología de la babesiosis. *Ciencia Veterinaria*, 3: 240-268.

Navarrete I, Serrano FJ, Reina D. 2002. Parásitos hemáticos. En: M. Cordero del Campillo & R. A. Rojas Vazquez, edits. *Parasitología Veterinaria*. España: Mc Graw Hill, pp. 283-294.

OIE World Organization for Animal Health (WOAH). Bovine Babesiosis; OIE WOAH Terrestrial Manual: Paris, France, 2021; Chapter 3.4.2; Available online: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.02_BABESIOSIS.pdf (accessed on 28 June 2022).

Olmeda AS, Armstrong PM, Rosenthal BM, Valladares B, del Castillo A, de Armas F, Miguez M, González A, Rodríguez Rodríguez JA, Spielman A, Telford SR 3rd. 1997. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop*. 30; 67(3):229-234.

Pérez J, Perez JJ, Vargas P, Álvarez JA, Rojas C, Figueroa JV. 2010. Sequence conservation of 12D3 gene in Mexican isolates of *B. bovis*. *Transb. Emerg. Dis*. 57: 57-60.

Ravindran R, Saravanan BC, Rao JR, Mishra AK, Bansal GC, Ray D. 2007a. A PCR-RFLP method for specific detection of *Theileria annulata*. *Journal of Applied Animal Research*. 32:1, 111-112.

Ravindran R, Saravanan BC, Rao JR, Mishra AK, Bansal GC, Ray D. 2007b. A PCR-RFLP method for the simultaneous detection of *Babesia bigemina* and *Theileria annulata* infections in cattle. *Current Science* 93 (12): 1840-1843.

SIAP. Población Ganadera|Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera|Gobierno|gob.mx. Available online: www.gob.mx (accessed on 30 June 2022).

Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T. 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology* 157, 211-221.

SOBRE O ORGANIZADOR

EDUARDO EUGENIO SPERS realizou pós-doutorado na Wageningen University (WUR), Holanda, e especialização no IGIA, França. Possui doutorado em Administração pela Universidade de São Paulo (USP). Foi Professor do Programa de Mestrado e Doutorado em Administração e do Mestrado Profissional em Comportamento do Consumidor da ESPM. Líder do tema Teoria, Epistemologia e Métodos de Pesquisa em Marketing na Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração (ANPAD). Participou de diversos projetos de consultoria e pesquisa coordenados pelo PENZA e Markestrat. É Professor Titular no Departamento de Economia, Administração e Sociologia, docente do Mestrado em Administração e Coordenador do Grupo de Extensão MarkEsalq no campus da USP/Esalq. Proferiu palestras em diversos eventos acadêmicos e profissionais, com diversos artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais, livros e capítulos de livros sobre agronegócios, com foco no marketing e no comportamento do produtor rural e do consumidor de alimentos.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abono orgánico 69, 70
Acuicultura 85, 86
Agrohomeopatía 180, 182, 183
Agua de vidrio 180, 182, 183
Alimentación de precisión 93, 96, 99
Amaranthus caudatus 69, 70, 75, 78, 81, 82
Amenazas 169, 170, 173
Anión superóxido 186, 187, 188, 190, 191
Antioxidantes 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194
Arbres 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37
Arquitectura multiagente 93, 95
Assortiment 13, 14, 16, 19, 23, 25, 32

B

Babesia bigemina 196, 197, 198, 200, 203, 206, 207
Babesia bovis 196, 197, 198, 200, 202, 206
Bioclimatic indexes 127, 128, 129, 130, 132, 134
Bio insumos 180
Brisas de mar y tierra 146, 147, 148, 149, 151, 159

C

Caligus rogercresseyi 84, 85, 86, 91, 92
Catalasa 186, 187, 188, 193, 194
Cítricos 180, 181, 182, 183, 184
Control de calidad 101, 102, 104, 108
Costa del Rio de la Plata 146, 148, 149, 158
Cromatografía en capa fina 101, 102, 104, 106, 109

D

Disease control 42, 43
Diversidad genética 114, 115, 169, 170, 172, 174, 175

E

Éclaircie 13, 14, 15, 16, 20, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33

Économie 13

Eficiência no uso da água 1, 3

Estiércol 162, 163, 167, 168

F

Fertilización química 162

G

Growing Degree Days 127, 128, 129, 132, 135

I

Infusión 102, 103, 104, 105

Integración del hardware de proveedores 93

K

Kiwicha 69, 70, 71, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82

L

Labranza de conservación 162, 166

Lenguaje de comunicación entre agentes 93

M

Machine learning 84, 85, 86, 90, 92

Maíz 57, 58, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 71, 161, 162, 163, 164, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178

Maturation 128, 129, 130, 132, 139, 140, 141, 142

Medicina tradicional 101, 102, 103

Microclima de canopia 146, 158

Milpa 57, 58, 63, 65, 68, 169, 170, 172, 173, 174, 176, 177

Minor grapevine varieties 128, 130, 131, 142

N

Nueva enfermedad 180

O

Olivais de elevada densidade 1, 3, 5, 6, 7, 9

Olivais de regadio 1

P

PCR-RFLP 196, 197, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207

Production forestière 13, 16

Productividad 58, 59, 63, 67, 84, 94, 172

R

Rega deficitária 1, 5, 6, 7, 9

Remedios herbolarios 102, 105, 110

RNA 112, 113, 115, 124, 196, 197, 199, 203, 206

RT-PCR 112, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 126

S

Saccharum spp 112, 113, 118, 119, 121

Salmonidos 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90

SCYLV 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124

Spraying 42, 43, 44, 49, 56

Superóxido dismutasa 185, 186, 187, 188, 192, 193, 194

T

Trucha arcoíris 85, 86, 87, 89, 90, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193

U

Unidad de producción 58, 62, 66, 67, 68

V

Viñedo 146, 147, 148, 149, 150, 151, 153, 154, 156, 157, 159

Viticulture 42, 43, 130, 142, 145, 160