

Agrociencia

Volumen 55, Número 5

1 de julio - 15 de agosto, 2021



Dra. MA. CELINA M. LLANDERAL CÁZARES
Profesor Investigador Titular
Colegio de Postgraduados



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

MÉXICO



DIRECTORIO

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Said Infante Gil

SUBDIRECTORA DE AGROCIENCIA

Ana Rita Román Jiménez

CONSEJO EDITORIAL INTERNACIONAL

Roger Austin (**Inglaterra**)

José Sarukhán Kermez (**México**)

Barry C. Arnold (**EUA**)

COMITÉ ASesor EDITORIAL INTERNO

Jorge Alvarado López

Jorge D. Etchevers Barra

Víctor A. González Hernández

Leopoldo E. Mendoza Onofre

José A. Villaseñor Alva

RESPONSABLES DE LA EDICIÓN

Said Infante Gil

Ana Rita Román Jiménez

FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN

L. Brenda Espejel Lagunas

APOYO

Belem M. Villegas Contreras

Yolanda Feroso Meraz

Oscar Vieyra Durán

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, **Volumen 55, número 5, 1 de julio - 15 de agosto, 2021**, Agrociencia es una publicación sesquimensual editada por el Colegio de Postgraduados. Carretera México- Texcoco, Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP 56230. Tel. 5959284427. www.colpos.mx. Editor responsable: **Dr. Said Infante Gil**. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo 04-2021-031913431800-203. ISSN: 1405-3195. eISSN: 2521-9766, otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Dr. Said Infante Gil. Fecha de última modificación, **13 de agosto del 2021**.

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

AGROCIENCIA está indizada en CURRENT CONTENTS®/AGRICULTURE, BIOLOGY & ENVIRONMENTAL SCIENCES® (CC/AB&ES), ISI ALERTING SERVICES®, el SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED® (SCIE) y el JOURNAL CITATION REPORTS® del INSTITUTE FOR SCIENTIFIC INFORMATION (ISI), THE USDA-IBIDS ABSTRACTS, THE ESSENTIAL ELECTRONIC AGRICULTURAL LIBRARY (TEEL), CURRENT INDEX TO STATISTICS, AGRICULTURE AND ENVIRONMENT FOR DEVELOPING REGIONS (TROPAG), AGRICULTURAL BIOLOGY, CAB ABSTRACTS, ZOOLOGICAL RECORD, PERIODICA, RED DE REVISTAS CIENTÍFICAS DE AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE (Red ALyC) y ScieELOMéxico; puede consultarse a través de AGRIS (FAO), AGRICOLA (EE. UU.), BIOSIS (HOLANDA) y DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS (SUECIA).

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

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

Oficinas Centrales:

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Guerrero #9, Esquina Avenida Hidalgo.

56220. San Luis Huexotla. Texcoco, Estado de México

Apartado Postal 56

56230, Suc. Chapingo, Estado de México

Teléfono: 595 92 84427

agrociencia@colpos.mx

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

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

Portada: Dra. Ma. Celina M. Llanderal Cázares



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 55

1 de julio - 15 de agosto, 2021

Número 5

Agua-Suelo-Clima ⇌ Water-Soil-Climate

- ESTIMACIÓN DE LA EVAPOTRANSPIRACIÓN DE UN VIÑEDO DE UVA DE MESA (*Vitis vinifera*) CON IMÁGENES SATELITALES SENTINEL-2 ⇌ ESTIMATION OF EVAPOTRANSPIRATION OF A VINEYARD OF TABLE GRAPES (*Vitis vinifera*) USING SENTINEL-2 SATELLITE IMAGERY
 José Manuel **Salvador-Castillo**, Martín Alejandro **Bolaños-González**, Julio César **Rodríguez**, Enrique **Palacios-Vélez**, Luis Alberto **Palacios-Sánchez**, Christopher **Watts**, Carlos **Lizárraga-Celaya**, Samuel **Ortega-Farías**, Salah **Er-Raki**..... 369

Biotecnología ⇌ Biotechnology

- BIOMASS AND ENERGY CHARACTERISTICS OF MARALFALFA GRASS (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone CULTIVATED IN WARM SUBHUMID CLIMATE TO PRODUCE BIOETHANOL ⇌ BIOMASA Y CARACTERÍSTICAS ENERGÉTICAS DEL PASTO MARALFALFA (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone CULTIVADO EN CLIMA CÁLIDO SUBHÚMEDO PARA PRODUCIR BIOETANOL
 Joel **Ventura Ríos**, José A. **Honorato Salazar**, Mario A. **Santiago Ortega**, Iliana **Barrera-Martínez**..... 389

- ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL Y TÉRMICO EN HARINAS DE PRODUCTOS RESIDUALES DE NOPAL (*Opuntia ficus-indica*) PARA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS POLIMÉRICOS BIOBASADOS ⇌ CHEMICAL PROXIMATE AND THERMAL ANALYSES ON FLOUR FROM RESIDUAL PRODUCTS OF PEAR-CACTUS (*Opuntia ficus-indica*) TOWARDS OBTAINING BIOBASED POLYMERIC COMPOUNDS
 Selene Carmen Haide **Rives-Castillo**, Zormy Nacary **Correa-Pacheco**, Silvia **Bautista-Baños**, Rosa Isela **Ventura-Aguilar**, Beatriz Sofía, **Schettino-Bermudez**, Pedro **Ortega-Gudiño**, Alfonso **Barajas-Cervantes**..... 403

Ciencia Pecuaria ⇌ Animal Science

- GRANOS SECOS DE DESTILERÍA CON SOLUBLES DE MAÍZ Y SUPLEMENTACIÓN DE XILANASA EN POLLAS Y GALLINAS BOVANS WHITE ⇌ DISTILLERS DRIED GRAINS WITH SOLUBLES FROM MAIZE AND XYLANASE SUPPLEMENTATION IN BOVANS WHITE PULLETS AND HENS
 Jennifer **Pérez-Martínez**, Juan Manuel **Cuca-García**, Carlos Miguel **Becerril**, Arturo **Pro-Martínez**, Omar **Hernández-Mendo**, Mariano **González-Alcorta**, Víctor **Valdés-Narváez**, Silvia **Carrillo-Domínguez** 417

Fitociencia ⇌ Crop Science

- PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN POR SEMILLA DE *Clinopodium mexicanum*, UNA PLANTA MEDICINAL NATIVA DE MÉXICO ⇌ PROPAGATION PROTOCOL BY SEED OF *Clinopodium mexicanum*, A NATIVE MEDICINAL PLANT FROM MEXICO
 Ana Paola **Silva-Castellanos**, Fabiola **Magallán-Hernández**, Santiago **Vergara-Pineda**, Oliva **Ramírez-Segura**, Mónica **Queijeiro-Bolaños** 433

Socioeconomía ⇌ Socioeconomics

- LA CAFETICULTURA TRADICIONAL FRENTE A LA ROYA ANARANJADA: EL CASO DE LA REGIÓN TIERRADENTRO, CAUCA, COLOMBIA ⇌ TRADITIONAL COFFEE FARMING FACING ORANGE RUST DISEASE: THE CASE OF TIERRADENTRO REGION, CAUCA, COLOMBIA..... 451
 Anabel **Martínez-López**, Gustavo Adolfo **Alegria-Fernández**, Gersain **Medina-Yara**, Benigno **Rodríguez-Padrón**

ESTIMACIÓN DE LA EVAPOTRANSPIRACIÓN DE UN VIÑEDO DE UVA DE MESA (*Vitis vinífera*) CON IMÁGENES SATELITALES SENTINEL-2

ESTIMATION OF EVAPOTRANSPIRATION OF A VINEYARD OF TABLE GRAPES (*Vitis vinífera*) USING SENTINEL-2 SATELLITE IMAGERY

José Manuel **Salvador-Castillo**¹, Martín Alejandro **Bolaños-González**^{1*}, Julio César **Rodríguez**², Enrique **Palacios-Vélez**¹, Luis Alberto **Palacios-Sánchez**³, Christopher **Watts**², Carlos **Lizárraga-Celaya**², Samuel **Ortega-Farías**⁴, Salah **Er-Raki**⁵

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco 56230 México. (slcastillo990@gmail.com), (martinb72@gmail.com), (epalacio@colpos.mx). ²Universidad de Sonora. Boulevard Luis Encinas y Rosales SN, Centro. Hermosillo, Sonora. 83000 México. (jcrodr@guayacan.uson.mx). ³Servicios de Estudios en Ingeniería y Sistemas, S.A. de C.V. El Sol 11. Colonia Alameda. Hermosillo, Sonora. 83204 México. (luispalacios@seissa.com.mx). ⁴Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Talca, Castilla 747, Chile (sortega@utulca.cl). ⁵LP-2M2E, Département de physique Appliquée, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco (s.erraki@gmail.com).

RESUMEN

La uva de mesa (*Vitis vinífera*) es uno de los cultivos de mayor relevancia económica y social en Sonora, México. Debido a la precipitación escasa y la demanda evaporativa elevada de la zona, es un cultivo con un requerimiento alto de agua. Por ello su producción depende de la aplicación de riego y es importante estimar con precisión y de manera extensiva la evapotranspiración de este cultivo (ET_c) para mejorar la eficiencia del riego a corto plazo. Esta investigación se realizó durante 2018 y 2019 con el objetivo de desarrollar y evaluar un modelo entre el índice de vegetación de diferencias normalizadas (NDVI) calculado con imágenes Sentinel-2, y el coeficiente de cultivo (K_c) determinado con el sistema de covarianza de vórtices (*Eddy Covariance*, EC) como opción para estimar la ET_c de un viñedo de uva de mesa en la Costa de Hermosillo, Sonora. Con los datos de NDVI y de K_c del año 2018 se construyó un modelo de regresión simple con inicio forzado al origen en las coordenadas nulas ($K_{cNDVI} = 0.9467 \text{ NDVI}$; $R^2 = 0.74$) como base para estimar la ET_c . Al validarlo con datos diarios del 2019 se obtuvo una R^2 de 0.76 y un CME de 0.11 al relacionar K_c vs. K_{cNDVI} , mientras que al relacionar ET_c vs. ET_c estimada se encontró una R^2 de 0.92 y un CME de 0.67 mm d⁻¹. Los resultados indicaron que la ET_c puede estimarse con precisión adecuada y de manera oportuna con el modelo propuesto. Sin embargo, se encontró que el modelo puede subestimar la ET_c durante la temporada de desarrollo

ABSTRACT

Table grapes (*Vitis vinífera*) are one of the crops of highest economic and social relevance in Sonora, Mexico. Due to the scant precipitation and high evaporative demand of the zone, it is a crop with a high water requirement. Therefore, its production depends on the application of irrigation, and it is important to have precise and extensive estimation of the crop evapotranspiration (ET_c) to improve efficiency of irrigation in the short term. This research was carried out during 2018 and 2019 with the objective of developing and evaluating a model between the normalized difference vegetation index (NDVI) calculated with Sentinel-2 images, and the crop coefficient (K_c) determined with a covariance turbulence flux system (*Eddy Covariance*, EC) as an option for estimating the ET_c of a vineyard of table grapes in Costa de Hermosillo, Sonora. Using NDVI and K_c data from 2018 records, a simple regression model was constructed with the start forced to the origin at the null coordinates ($K_{cNDVI} = 0.9467 \text{ NDVI}$; $R^2 = 0.74$) as a base for ET_c estimation. When the regression model was validated with daily 2019 data, an R^2 of 0.76 was obtained along with a CME of 0.11 by relating K_c vs. K_{cNDVI} . Whereas by relating ET_c vs. estimated ET_c , an R^2 of 0.92 was found, and a CME of 0.67 mm d⁻¹. The results indicated that the ET_c can be estimated with adequate precision and in an opportune manner with the proposed model. However, it was found that the model may underestimate ET_c during the period of maximum crop development due to NDVI saturation. However, in the winter when the values of NDVI depend on the soil structural characteristics and on the remains of winter pruning, ET_c tends to be overestimated.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8110-1051>.

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

Publicado en *Agrociencia* 55: 369-387. 2021.

máximo del cultivo debido a la saturación del NDVI. Mientras que en invierno cuando los valores de NDVI dependen de las características estructurales del suelo y de los restos de la poda invernal, la ET_c puede sobreestimarse.

Palabras claves: *Vitis vinifera*, índice de vegetación de diferencias normalizadas (NDVI), covarianza de vórtices (EC), coeficiente de cultivo (K_c).

INTRODUCCIÓN

En el municipio de Hermosillo, Sonora, la uva de mesa (*Vitis vinifera*) es el cultivo que proporciona el beneficio mayor por metro cúbico del agua de riego utilizada (\$13.00 MXN / 1.17 USD m^{-3}), requiere 12 000 m^3 de agua y 332 jornales por hectárea (Salazar *et al.*, 2012). Esta situación refleja la gran importancia económica del cultivo, pero utiliza un volumen de agua muy alto en una zona donde este recurso es escaso. Al respecto, Hernández (2019) mencionó que el volumen de agua concesionado a la Asociación de Usuarios del Distrito de Riego 051 Costa de Hermosillo, A.C. es de 433 $hm^3 a^{-1}$, cantidad superior en 250 hm^3 a la recarga natural anual. Por lo tanto, el abatimiento del acuífero continúa, y los fenómenos de intrusión salina y contaminación del suelo se estimulan. Dichos problemas se pueden evitar, o al menos disminuir sus efectos, por medio de la programación adecuada del riego (Zermeño-González *et al.*, 2017), para lo cual es esencial estimar la evapotranspiración del cultivo (ET_c).

La ET_c se obtiene al multiplicar la evapotranspiración de referencia (ET_0) por un coeficiente de cultivo (K_c). La FAO recomienda utilizar la ecuación de Penman-Monteith, reconocida como el método estándar para calcular ET_0 . El K_c depende del desarrollo de la cobertura foliar del cultivo durante las etapas de su crecimiento y es un factor importante para la planificación del riego en periodos mayores a un día (Allen *et al.*, 1998).

De forma experimental el cálculo de ET_c puede realizarse con lisímetros de pesada (López-Urrea *et al.*, 2012) o técnicas de covarianza de vórtices (Eddy Covariance, EC) (Rodríguez *et al.*, 2010), entre otros. Sin embargo, el primer método solo proporciona valores puntuales que por lo regular se extrapolan a nivel de parcela sin las bases necesarias para corroborar que el cultivo responde de forma adecuada. Mientras que el segundo sí permite obtener información de

Key words: *Vitis vinifera*, normalized difference vegetation index (NDVI), Eddy covariance (EC), crop coefficient (K_c).

INTRODUCTION

In the municipality of Hermosillo, Sonora, table grapes (*Vitis vinifera*) are the crop that provides the highest benefit per cubic meter of irrigation water used (\$13.00 MXN / 1.17 USD m^{-3}), requiring 12 000 m^3 of water and 332 daily wages per hectare (Salazar *et al.*, 2012). This situation displays the economic importance of this fruit-bearing tree, but it uses a very high volume of water in a zone where this resource is scarce. In this regard, Hernández (2019) indicated that water volumes concession to "Asociación de Usuarios del Distrito de Riego 051 Costa de Hermosillo, A.C." is 433 $hm^3 y^{-1}$, an amount higher than 250 hm^3 to the annual natural refill. Therefore, the depletion of the aquifer continues, and the phenomena of saline intrusion and soil contamination are stimulated. These problems are avoidable, or at least their effects can be diminished, by means of adequate irrigation (Zermeño-González *et al.*, 2017), therefore, it becomes key how to estimate the crop evapotranspiration (ET_c).

ET_c is obtained by multiplying the reference evapotranspiration (ET_0) by a crop coefficient (K_c). FAO recommends using the Penman-Monteith equation, recognized as the standard method for calculating ET_0 . K_c depends on the development of the foliar cover of the crop during the growth stages and is an important factor for the planification of irrigation in periods longer than one day (Allen *et al.*, 1998).

The calculation of ET_c can be performed experimentally with weighing lysimeters (López-Urrea *et al.*, 2012) or by covariance on turbulence flux systems (Eddy Covariance, EC) (Rodríguez *et al.*, 2010), among others. However, the first method only provides appointed values which usually are extrapolated at the plot scale without the bases necessary to confirm that the crop responds adequately. Whereas the latter makes it possible to obtain information in different sizes of study areas (footprint), which depends on the height at which instrumentation is located and on the velocity of the prevailing winds.

Satellite imagery makes it possible to monitor vegetation growth by means of empirical or

tamaños distintos de áreas de estudio (*foot print*), lo cual depende de la altura de la instrumentación y la velocidad de los vientos dominantes.

Las imágenes de satélite permiten dar seguimiento al crecimiento de la vegetación por medio de relaciones empíricas o teóricas que relacionan las variables biofísicas (con énfasis en cobertura vegetal, índice de área foliar y biomasa) con los índices de vegetación (IV) (Paz *et al.*, 2015; Pôças *et al.*, 2020). Consoli y Vanella (2014) señalaron que las herramientas de sensores remotos o teledetección para estimar ET_C se han desarrollado desde dos enfoques. El primero es el método de balance de energía de la superficie terrestre que utiliza los IV derivados de la reflectancia del dosel y la temperatura de la superficie medida con una banda de infrarrojo térmico, y el segundo relaciona de forma directa el K_C con los IV.

En la Costa de Hermosillo y la misma zona de estudio, Er-Raki *et al.* (2013) mostraron que con el segundo enfoque se obtienen resultados satisfactorios, pero se requiere la calibración a partir de modelos generados con experimentos de larga duración. El objetivo de esta investigación fue generar un modelo que con el NDVI obtenido de imágenes satelitales Sentinel-2 permitiera estimar el K_C y, en consecuencia, la ET_C de los viñedos de uva de mesa en la Costa de Hermosillo en dos ciclos de producción (2018 y 2019); así como validar el modelo generado con mediciones realizadas desde el enfoque de la covarianza de vórtices.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este estudio se realizó durante los años 2018 y 2019 en un viñedo de uva de mesa con una superficie de 106 ha, ubicado en la Costa de Hermosillo, Sonora, México (28° 54' 42.72" N; 111° 18' 32.42" O; altitud 100 m). El clima de la zona es árido, con una precipitación media anual de 188 mm, promedio de los últimos 50 años. La temporada de lluvias ocurre de julio a septiembre (70% del total anual) y rara vez se presentan lluvias en el periodo de marzo a junio (Rodríguez *et al.*, 2010; Er-Raki *et al.*, 2013). La temperatura media diaria oscila entre los 22 y los 24 °C, con máximas extremas de -7 y 49.5 °C en invierno y verano, respectivamente.

Cuatro variedades establecidas durante ocho años de plantación (Cuadro 1) se evaluaron en el área de estudio (Figura 1). En el predio la distancia entre líneas fue 3.8 m y entre plantas

theoretical relationships that relate the biophysical variables (mainly, vegetation cover, leaf area index and biomass) with the vegetation indices (IV) (Paz *et al.*, 2015; Pôças *et al.*, 2020). Consoli and Vanella (2014) indicated that remote sensing tools for estimating ET_C have been developed from two perspectives. In the first place, there is the method of energy balance on terrestrial surface that uses the IV derived from canopy reflectance and surface temperature measured on the thermal infrared band; whilst the second directly relates K_C with the IV.

In the Costa de Hermosillo and the same study location, Er-Raki *et al.* (2013) showed that with the second approach, satisfactory results are obtained, but it requires calibration by models generated from long duration experiments. The objective of this study was to generate a model which, based on the NDVI obtained from Sentinel-2 satellite imagery, would allow K_C estimation, and consequently ET_C for vineyards of table grapes in the Costa de Hermosillo along two production cycles (2018 and 2019); as well as to validate the model generated with measurements recorded by Eddy covariance.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study was carried out during 2018 and 2019 in a vineyard of table grapes with an area of 106 ha, located in the Costa de Hermosillo, Sonora, Mexico (28° 54' 42.72" N; 111° 18' 32.42" W; altitude 100 m). The climate of the zone is arid, with a mean annual rainfall of 188 mm, average of the last 50 years. The rainy season occurs from July to September (70% of the annual total) and on rare occasions there are rains in the period from March to June (Rodríguez *et al.*, 2010; Er-Raki *et al.*, 2013). The mean daily temperature fluctuates between 22 to 24 °C, with maximum extremes of -7 and 49.5 °C in winter and summer, respectively.

Four varieties established during eight years of planting (Table 1) were evaluated in the area of study (Figure 1). In the plot the distance between rows was 3.8 m and among plants the distance varied from 1.0 to 1.6 m, with vines guided along a trellis set. A drip irrigation system was used, with drippers separated at 0.5 m, with a maximum water runoff of 2.5 L h⁻¹ and 92% uniformity coefficient.

Processing satellite imagery

For this study 48 Sentinel-2 satellite images were obtained in 2018 and 43 images in 2019, retrieved under free-access license,

Cuadro 1. Año de plantación, cultivar de vid establecido y parcelas plantadas.
Table 1. Year of plantation, established grape cultivar, and planted plots.

Año	Cultivar	Parcelas	Plantas ha ⁻¹
1999	Flame	A1, A2, B1, B2	1644
2001	Perlette	A4, B4	1644
2005	Flame	A5, A6, B5 y B6	1644
2010	Summer Royal	C4	1644
2012	Perlette	A3 y B3	2193
2013	Flame	C2 [†] , C3 [†] , C5 y C6	2193
2015	Sugraone	D6, D7 y D8	2193
2016	Sugraone	C7 y C8	2193

[†]Los cuadros de plantación C2 y C3 tienen una superficie de 3 ha y los demás 4 ha.

♦The C2 and C3 plantation squares have an area of 3 ha, and the remaining, 4 ha.

varío de 1.0 a 1.6 m, con guías conducidas por el sistema de pérgolas. El sistema de riego fue por goteo, con emisores separados 0.5 m, con gasto máximo de 2.5 L h⁻¹ y 92% de coeficiente de uniformidad.

Procesamiento de imágenes satelitales

Para el estudio se obtuvieron 48 imágenes satelitales Sentinel-2 en 2018 y 43 imágenes en 2019 de acceso libre, propiedad

property of the European Space Agency. They were downloaded from the website of the United States Geological Survey (USGS), <https://earthexplorer.usgs.gov/> in jp2 format with 1C processing level, which does not include atmospheric correction. Afterwards, the atmospheric correction was operated in QGIS v. 3.8.2, which use the dark objects subtraction technique (Chavez, 1996). Then, in order to extract polygons of interest and calculating the NDVI of each image, two programming scripts were developed in Python[®] v. 3.8.

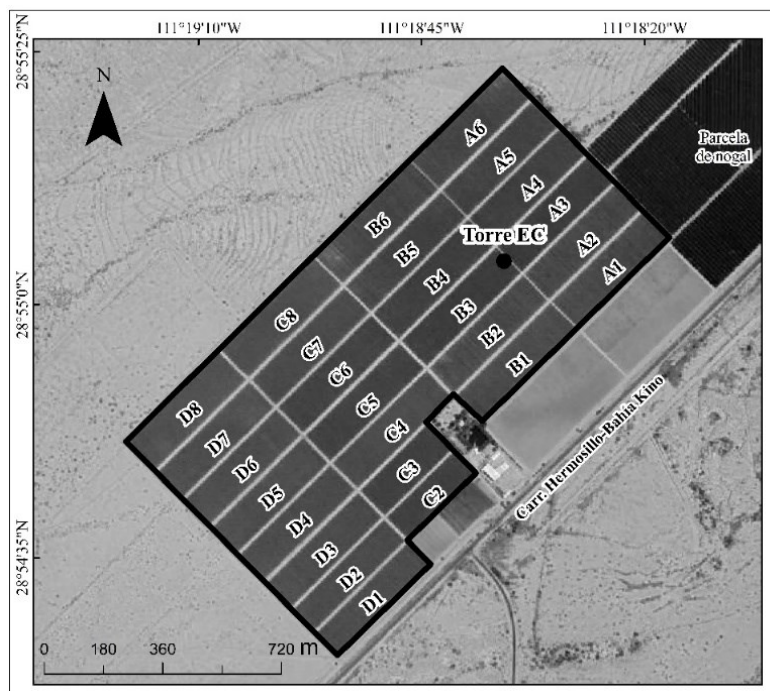


Figura 1. Delimitaci n del sitio experimental, identificación de las parcelas y ubicaci n de la torre de EC.
Figure 1. Delimitation of the experimental site, plots identification and location of the EC tower.

de la Agencia Espacial Europea. Éstas se descargaron de la plataforma <https://earthexplorer.usgs.gov/> del Servicio Geológico de los Estados Unidos (United States Geological Survey, USGS) en formato jp2 con nivel de procesamiento 1C, el cual no incluye la corrección atmosférica. Después se realizó la corrección atmosférica en QGIS v. 3.8.2 que utiliza la técnica de sustracción de objetos oscuros (Chavez, 1996). Luego, para extraer los polígonos de interés y calcular el NDVI de cada imagen se desarrollaron dos protocolos de códigos de programación en Python® v. 3.8.

El NDVI (Rouse *et al.*, 1974) se calculó con la ecuación 1.

$$NDVI = \frac{NIR - R}{NIR + R} \quad (1)$$

donde, NDVI es el índice de vegetación de diferencias normalizadas (adimensional); NIR (o reflectancia infrarroja cercana) es la reflectancia en la banda del infrarrojo cercano (%); y R es la reflectancia en la banda del rojo (%). De acuerdo con las bandas de información que contienen las imágenes Sentinel-2, B8 corresponde a la banda NIR y B4 a la banda R, ambas con una resolución espacial de 10 m. En la zona de estudio el viento dominante fue de dirección suroeste, así que la cantidad mayor de datos recolectados en la torre de EC provino de la parcela B3. Por esta razón, para correlacionar un valor diario de NDVI con un valor diario de K_c medido con el método de EC, así como para generar y validar el modelo para estimar el K_c fue necesario obtener los valores diarios de NDVI de la parcela B3 durante 2018 y 2019 por medio de una interpolación lineal.

Datos micrometeorológicos

Para obtener el K_c diario, se recopiló información de variables meteorológicas diferentes con las cuales se estimó la ET_0 y la ET_c . Las variables meteorológicas se obtuvieron con una torre instrumentada de 6.0 m de altura, situada a 400 m dentro del campo de cultivo en la dirección del viento dominante (suroeste), para tener las condiciones de recuperación de datos de movimiento bidireccional de viento (*fetch*) requeridas por el enfoque EC. Tales condiciones se han establecido en una relación 100:1; es decir, 100 m de distancia horizontal (superficie homogénea) para los flujos por cada 1 m de altura a la cual se colocaron los instrumentos para medir las variables turbulentas (Allen *et al.*, 2011).

Las variables medidas fueron: radiación neta (R_n , $W\ m^{-2}$) con un radiómetro neto (CNR4, Kipp and Zonen, Inc., Delft, Holanda) colocado a 5.2 m de altura; flujo de calor sensible (H , $W\ m^{-2}$) con un anemómetro sónico (Gill Instruments Limited, Lymington, Hampshire, EE. UU.); flujo de calor latente (LE

The NDVI (Rouse *et al.*, 1974) was calculated with equation 1.

$$NDVI = \frac{NIR - R}{NIR + R} \quad (1)$$

where NDVI is the vegetation index of normalized differences (dimensionless); NIR (near infrared reflectance) is the reflectance in the near infrared band (%); and R is the reflectance in the red band (%). According to the bands of information contained in the Sentinel-2 images, B8 corresponds to the NIR band and B4 to the R band, both with a spatial resolution of 10 m. In the study zone the prevailing wind was from the southwest, thus most of the data recorded in the EC tower came from the B3 plot. Therefore, to correlate a daily NDVI value with a daily K_c value measured by the EC method, as well as to generate and validate the model for estimating the K_c , it was necessary to obtain daily values of NDVI from the B3 plot during 2018 and 2019 by means of a linear interpolation.

Micrometeorological data

To obtain the daily K_c , information was gathered on different meteorological variables which were used to estimate the ET_0 and ET_c . Weather data was obtained with an instrumented tower of 6.0 m height, placed 400 m within the cultivation plot in the direction of the prevailing wind (southwest), to have the conditions to collect data from directional, and turbulent movement (*fetch*) required by the EC approach. These conditions have been established in a ratio 100:1; that is, 100 m of horizontal distance (homogeneous surface) for the flows for each 1 m of height at which the instruments were placed for measuring the turbulent variables (Allen *et al.*, 2011).

The variables measured were as follows. Net radiation (R_n , $W\ m^{-2}$) with a net radiometer (CNR4, Kipp and Zonen, Inc., Delft, Holland) placed at 5.2 m height. Sensitive heat flow (H , $W\ m^{-2}$) with a sonic anemometer (Gill Instruments Limited, Lymington, Hampshire, U.K.). Latent heat flow ($LE\ W\ m^{-2}$) with IRGA 7500RS (LI-COR, Lincoln, Nebraska, U.S.) and sonic anemometer (Gill Instruments Limited). Velocity ($m\ s^{-1}$) and wind direction (degrees) with an anemometer 5103 (Young, Campbell Scientific Inc., Logan, Utah, U.S.), for all those, the three instruments were placed at 6 m height. Rainfall (mm) with a pluviometer (Texas Electronics Inc., Dallas, Texas, U.S.) placed at 4 m height. Temperature ($^{\circ}C$) and humidity of the air (%) with an HMP 60 (Vaisala Inc., Woburn, MA, U.S.) placed at 0.2 m height. And irrigation rate with a pluviometer (Texas Electronics Inc. Dallas, Texas, U.S.) installed at 0.40 m below the irrigation line and under a dripper to count the irrigation rate and its duration.

W m⁻²) con un IRGA 7500RS (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EE.UU.) y anemómetro sónico (Gill Instruments Limited); velocidad (m s⁻¹) y dirección del viento (grados) con un anemómetro 5103 (Young, Campbell Scientific, Inc., Logan, Utah, EE.UU.), los tres instrumentos colocados a 6 m de altura; precipitación (mm) con un pluviómetro (Texas Electronics Inc. Dallas, Texas, EE. UU.) colocado a 4 m de altura; temperatura (°C) y humedad del aire (%) con un HMP 60 (Vaisala, Inc., Woburn, MA, EE.UU.) colocado a 2.5 m de altura; y la lámina de riego (mm) con un pluviómetro (Texas Electronics Inc. Dallas, Texas, EE. UU.) colocado a 0.4 m debajo de la línea de riego y debajo de un gotero para medir la lámina de riego y su duración.

Las variables turbulentas (velocidad vertical del viento y vapor de agua) se midieron a una frecuencia de 20 Hz. Los datos generados se almacenaron con el sistema GHG de LI-COR (Lincoln, Nebraska USA), para después crear archivos en formato ghg con el promedio de dichas variables cada 30 min. De acuerdo con Van Kesteren *et al.* (2013) es un tiempo apropiado para manejar de forma estadística las variables turbulentas. Por otro lado, las variables meteorológicas se midieron en un intervalo de 10 s y se guardaron como promedio cada 10 min. La información de las variables turbulentas se procesó con el programa EddyPro (Burba, 2013). Después, para calcular la evapotranspiración y el flujo de calor sensible, se efectuó un postproceso de la información recopilada con el fin de corregir errores o datos faltantes (The Max Planck Institute for Biogeochemistry, 2020). Los resultados finales se organizaron por día y por semana en hojas Excel®.

Evapotranspiración de referencia (ET₀), evapotranspiración del cultivo (ET_c) y coeficiente de cultivo (K_c)

La ET₀ se calculó por el método Penman-Monteith FAO56 (Allen *et al.*, 1998) con la ecuación 2:

$$ET_0 = \frac{0.408\Delta (R_n - G) + \gamma \frac{900}{T + 273} u_2 (e_s - e_a)}{\Delta + \gamma(1 + 0.34u_2)} \quad (2)$$

donde, ET₀ es la evapotranspiración de referencia (mm d⁻¹), R_n es la radiación neta (MJ m⁻² d⁻¹), G es el flujo de calor del suelo (MJ m⁻² d⁻¹), T es la temperatura promedio diaria del aire (°C), Δ es la pendiente de la curva de presión a saturación a la temperatura T (kPa °C⁻¹), γ es la constante psicrométrica (kPa °C⁻¹), e_s es la presión de saturación del vapor a temperatura T (kPa), e_a es la presión de vapor promedio diario (kPa), y u₂ es la velocidad promedio diaria del viento a 2 m de elevación sobre el terreno (m s⁻¹). Debido a que la velocidad del viento se midió a 6 m de altura, se aplicó la ecuación 47 del manual de Allen *et al.* (1998) para obtener la velocidad del viento a 2 m de altura.

The turbulent variables (vertical wind velocity and water vapor) were measured at a frequency of 20 Hz. The data generated were stored with the system GHG of LI-COR (Lincoln, Nebraska, U.S.), to later create ghg files with the average of these variables every 30 min. According to Van Kesteren *et al.* (2013), this is an appropriate time for statistically managing the turbulent variables. On the other hand, the meteorological variables were measured at an interval of 10 s and were saved at an average of every 10 min. The information of the turbulent variables was processed with the software EddyPro (Burba, 2013). Afterwards, to calculate evapotranspiration and the sensitive heat flux, a postprocess was performed of the information gathered in order to correct errors or missing data (The Max Planck Institute for Biogeochemistry, 2020). The complete results were organized by day and by week in ExcelTM sheets.

Reference evapotranspiration (ET₀), crop evapotranspiration (ET_c) and crop coefficient (K_c)

The ET₀ was calculated by the method of Penman-Monteith FAO56 (Allen *et al.*, 1998) with equation 2:

$$ET_0 = \frac{0.408\Delta (R_n - G) + \gamma \frac{900}{T + 273} u_2 (e_s - e_a)}{\Delta + \gamma(1 + 0.34u_2)} \quad (2)$$

where ET₀ is the reference evapotranspiration (mm d⁻¹), R_n is net radiation (MJ m⁻² d⁻¹), T is the daily average temperature of the air (°C), Δ is the slope of the curve of saturation pressure of the vapor at temperature T (kPa °C⁻¹), γ psychrometric constant (kPa °C⁻¹), e_s is the saturation pressure of the vapor at temperature T (kPa), e_a is the average daily vapor pressure (kPa), and u₂ is the daily average wind velocity at 2 m elevation over the ground (m s⁻¹). Because the wind velocity was measured at 6 m height, equation 47 of the manual of Allen *et al.* (1998) was applied to obtain the wind velocity at 2 m height.

To estimate the ET_c, the EC method was used. For this purpose, the latent heat flux (LE) was obtained along with the sensitive heat flux (H) and equations 3 and 4 (Ham and Heilman, 2003).

$$LE = L \times (\overline{w' \rho_{wv}'}) \quad (3)$$

$$H = \rho_a \times C_p \times (\overline{w' T_s'}) - 0.51 \times T_a \times \frac{\rho_a \times C_p}{L} \times LE \quad (4)$$

Para estimar la ET_C se utilizó el método de EC. Para ello se obtuvo el flujo de calor latente (LE) y flujo de calor sensible (H) con las ecuaciones 3 y 4 (Ham y Heilman, 2003).

$$LE = L \times (\overline{w' \rho_{wv}'}) \quad (3)$$

$$H = \rho_a \times C_p \times (\overline{w' T_s'}) - 0.51 \times Ta \times \frac{\rho_a \times C_p}{L} \times LE \quad (4)$$

donde, LE es el flujo de calor latente ($W m^{-2}$), H es el flujo de calor sensible ($W m^{-2}$), L es el calor latente de vaporización del agua ($J kg^{-1}$), w es la variación instantánea de la velocidad vertical del viento ($m s^{-1}$), ρ_{wv} es la densidad del vapor de agua en el aire ($kg m^{-3}$), ρ_a , C_p y Ta son la densidad ($kg m^{-3}$), capacidad calorífica ($1013 kJ kg^{-1} ^\circ C^{-1}$) y temperatura ($^\circ C$) del aire húmedo, respectivamente; y T_s es la temperatura sónica ($^\circ C$). El símbolo de prima significa desviaciones de la variable con respecto a la media y la barra horizontal sobre dos variables indica la covarianza entre las variables para un determinado segmento de tiempo (30 min en este caso).

El coeficiente de cultivo (K_C), obtenido cada día se determinó con la ecuación 5 (Doorenbos y Pruitt, 1977):

$$K_C = \frac{ET_C}{ET_0} \quad (5)$$

donde, ET_C es la evapotranspiración del cultivo (ET_C medida por el método de EC, $mm d^{-1}$), y ET_0 es la evapotranspiración de referencia ($mm d^{-1}$).

Además, se aplicó la ecuación 6 para estimar la ET_C del periodo marzo-junio, del año 2019, y anual:

$$ET_{CEST} = \sum_{d=1}^n ET_0 * K_{CNDVI} \quad (6)$$

donde, ET_{CEST} es la evapotranspiración estimada del cultivo (mm), ET_0 es la evapotranspiración de referencia diaria ($mm d^{-1}$), y K_{CNDVI} es el K_C derivado del modelo obtenido (Figura 3).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó para construir un modelo de regresión simple con inicio forzado al origen en las coordenadas nulas y se usaron dos parámetros de eficiencia estadística. El

where LE is the latent heat flux ($W m^{-2}$), H is the sensitive heat flux ($W m^{-2}$), L is the latent heat vaporization of the water ($J kg^{-1}$), w is the instant variation of the vertical wind velocity ($m s^{-1}$), ρ_{wv} is the density of the water vapor in the air ($kg m^{-3}$), ρ_a , C_p and Ta are the density ($kg m^{-3}$), calorific capacity ($1013 kJ kg^{-1} ^\circ C^{-1}$) and temperature ($^\circ C$) of humid air, respectively; and T_s is the sonic temperature ($^\circ C$). The prime symbol signifies deviations of the variable in relation to the mean, and the horizontal bar over two variables indicates the covariance among those variables for a determined segment of time (30 min, in this case).

The crop coefficient (K_C), obtained each day was determined with equation 5 (Doorenbos and Pruitt, 1977):

$$K_C = \frac{ET_C}{ET_0} \quad (5)$$

where ET_C is the crop evapotranspiration (ET_C measured by the method of EC, $mm d^{-1}$), and ET_0 is the reference evapotranspiration ($mm d^{-1}$).

Furthermore, equation 6 was applied to estimate the ET_C from March-June; the one through 2019, and annual:

$$ET_{CEST} = \sum_{d=1}^n ET_0 * K_{CNDVI} \quad (6)$$

where ET_{CEST} is the estimated crop evapotranspiration (mm). ET_0 is the reference daily evapotranspiration ($mm d^{-1}$), and K_{CNDVI} is the K_C derived from the obtained model (Figure 3).

Statistical analysis

The statistical analysis was done to construct a simple regression model with the start forced to the origin at the null coordinates and two statistical efficiency parameters were used. The determination coefficient (R^2), which indicates the capacity of a model to replicate its results (equation 7), and the mean square error (CME) which measures the variation of the calculated values regarding those observed (equation 8).

$$R^2 = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_{iobs} - \overline{y_{iobs}})(y_{imod} - \overline{y_{imod}})}{\left(\sum_{i=1}^n (y_{iobs} - \overline{y_{iobs}})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \left(\sum_{i=1}^n (y_{imod} - \overline{y_{imod}})^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \right] \quad (7)$$

$$CME = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_{imod} - y_{iobs})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

coeficiente de determinación (R^2), el cual indica la capacidad de un modelo para replicar sus resultados (ecuación 7), y el cuadrado medio del error (CME) que mide la variación de los valores calculados respecto a los observados (ecuación 8).

$$R^2 = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_{iobs} - \overline{y_{iobs}})(y_{imod} - \overline{y_{imod}})}{(\sum_{i=1}^n (y_{iobs} - \overline{y_{iobs}})^2)^{\frac{1}{2}} (\sum_{i=1}^n (y_{imod} - \overline{y_{imod}})^2)^{\frac{1}{2}}} \right]^2 \quad (7)$$

$$CME = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_{imod} - y_{iobs})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

donde, y_{iobs} = datos de K_c o ET_c estimados con la torre de EC, $\overline{y_{iobs}}$ = promedio de los datos de K_c o ET_c estimados con la torre de EC, y_{imod} = datos de K_c o ET_c estimados con el modelo generado y, $\overline{y_{imod}}$ = promedio de los datos de K_c o ET_c estimados con el modelo generado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generación del modelo

La variación diaria del K_c y del NDVI registrada durante el 2018 (Figura 2) mostró que el NDVI creció desde la aparición de los brotes a partir del día juliano (Dj) 37, hasta la fecha de alcance de la cobertura total (Dj 121). En los Dj 201 y 240 se realizaron

where y_{iobs} = data of K_c or ET_c estimated with the tower of EC, $\overline{y_{iobs}}$ = average of the data of K_c or ET_c , y_{imod} = data of K_c or ET_c estimated with the generated model, and $\overline{y_{imod}}$ = average of the data of K_c or ET_c estimated with the generated model.

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of the model

The daily variation of the K_c and of the NDVI recorded during 2018 (Figure 2) showed that the NDVI increased from the appearance of the shoots starting on Julian day (Dj) 37, until they reached total cover (Dj 121). On Dj 201 and 240, pruning was made, which caused a reduction of the NDVI. Regarding this, Er-Raki *et al.* (2013) and Campos *et al.* (2010) observed the same phenomenon. After Dj 263 senescence and leaves falling began. However, due to the appearance of new shoots, NDVI remained relatively stable until Dj 320. Finally, on Dj 359 the winter pruning was made. In this research the highest values of NDVI were found on Dj 175 (0.83) and Dj 130 (0.82), those data were obtained when the leaf area index (LAI) was 3.12 and 3.45 in 2018 and 2019, respectively. The lowest NDVI in 2018 occurred on Dj 40 (0.23), and in 2019 on Dj 25 (0.16), when the LAI was zero.

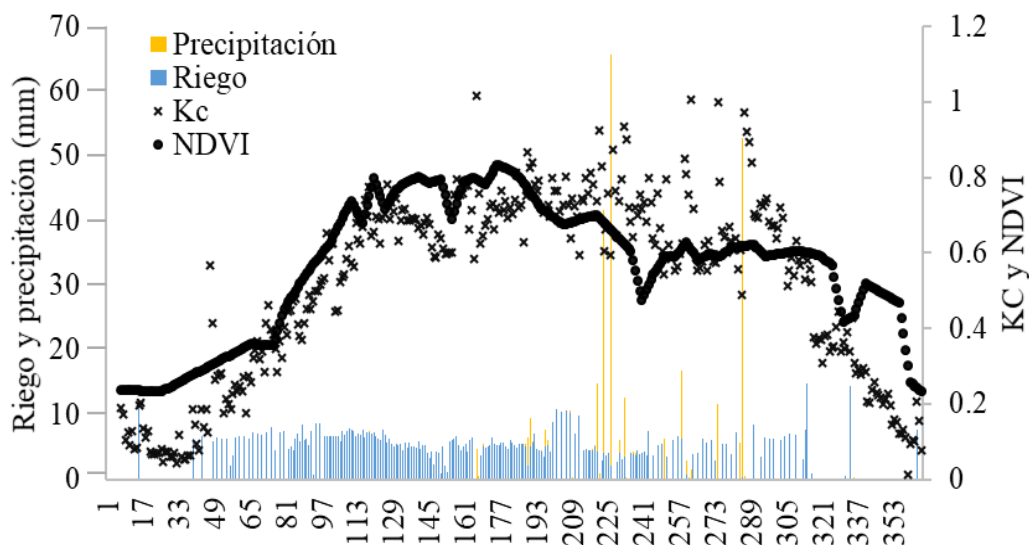


Figura 2. Riegos aplicados, precipitación y variación diaria del K_c y del NDVI durante el año 2018 en la parcela B3 plantada con uva de mesa cv. Perlette desde el año 2012.

Figure 2. Applied irrigations, rainfall and daily variation of K_c and NDVI during 2018 in the B3 plot planted with table grapes cv. Perlette since 2012.

podas; lo cual provocó una disminución del NDVI. Al respecto, Er-Raki *et al.* (2013) y Campos *et al.* (2010) observaron el mismo fenómeno. Después del Dj 263 se inició la senescencia y caída de hojas; sin embargo, debido a la aparición de brotes nuevos, el NDVI permaneció relativamente estable hasta el Dj 320. Por último, en el Dj 359 se realizó la poda de invierno. En esta investigación los valores más altos de NDVI se encontraron en los Dj 175 (0.83) y 130 (0.82), dicha información se obtuvo cuando el índice de área foliar (IAF) fue de 3.12 y 3.45 en 2018 y 2019, respectivamente. Mientras que el NDVI más bajo en 2018 se presentó en el Dj 40 (0.23) y en 2019 en el Dj 25 (0.16), cuando el IAF fue de cero.

Además, se aprecia que hacia el fin de año el NDVI disminuyó, pero esa disminución fue menor que la del K_c (Figura 2). Esto se explica porque la temperatura promedio mensual de noviembre y diciembre fue 18.5 y 14.8 °C, respectivamente. Bajo esas condiciones de temperatura no fue posible que la planta perdiera las hojas de forma natural y fue necesario aplicar un defoliante para que el cultivo entrara en latencia. Sin embargo, pese a que las plantas tienen hojas, la mayoría se encontraba en una etapa de senescencia avanzada y, por lo tanto, ya no eran tan eficientes para realizar el proceso de fotosíntesis. Prueba de ello es que el K_c siguió disminuyendo después del Dj 330, fecha en la cual se aplicó una lámina de riego de 14.5 mm que provocó un reverdecimiento leve del follaje, reflejado en el incremento del NDVI; en el estudio de Er-Raki *et al.* (2013) también se observó ese fenómeno. Asimismo, de acuerdo con Jiang *et al.*, (2006) en esta temporada el NDVI se puede sobreestimar debido al incremento de la sombra en el dosel de las plantas por un ángulo de inclinación mayor en la incidencia de la radiación solar directa.

Los valores diarios de K_c tuvieron una tendencia similar al NDVI, pero se observó que la lluvia aumentó sus valores debido a la mayor evaporación del suelo (Allen *et al.*, 1998; López-Urrea *et al.*, 2012). Al respecto, Rodríguez *et al.* (2010) señalaron que después de algunos días los valores vuelven a ser similares a los días previos al evento de precipitación. Por esta condición, para generar y validar el modelo no se usaron valores de K_c ni de NDVI interpolado, un día antes y dos días después de la lluvia. Según Cuesta *et al.* (2005), este procedimiento se basa en la relación de tipo lineal que existe entre el NDVI y el coeficien-

Furthermore, it was observed that towards the end of the year the NDVI decreased, but this reduction was less than that of the K_c (Figure 2). The plausible explanation is, that the average monthly temperature in November and December was 18.5 and 14.8 °C, respectively. Under these temperature conditions it was not possible for the plant to lose its leaves naturally, and it was necessary to apply a defoliant for the vines entered into latency. However, although the plants have leaves, most of them were in a state of advanced senescence, and therefore, they were no longer as efficient for the photosynthesis process. The proof of this was that the K_c continued in reduction after Dj 330, date at which an irrigation of 14.5 mm was supplied, which caused a slight greening of the foliage, expressed in the increment of the NDVI. Er-Raki *et al.* (2013) also observed this phenomenon. In addition, according to Jiang *et al.* (2006), in this period the NDVI may be overestimated due to the increase in shade on plant canopy produced by a greater inclination in the incidence degree of direct solar radiation.

The daily values of K_c had a tendency similar to that of NDVI, but it was observed that the rain increased its values due to the higher evaporation of the soil (Allen *et al.*, 1998, López-Urrea *et al.*, 2012). In this regard, Rodríguez *et al.* (2010) indicated that after several days the values are again similar to the days prior to the rainfall event. Because of this condition, to generate and validate the model, K_c values were not used nor interpolated NDVI, one day before or two days after the rainfall. According to Cuesta *et al.* (2005), this procedure is based on the linear relationship that exists between the NDVI and the basal crop coefficient (K_{cb}). The model was generated with the data of K_c and NDVI of the year 2018 and was validated with data of the year 2019.

Cuesta *et al.* (2005) and Consoli and Barbagallo (2012) found a linear relationship between K_c and NDVI. Therefore, with the NDVI and K_c values not influenced by the rainfall, a simple linear regression was obtained with the start forced to the origin at the null coordinates (Figure 3). Thus, the model to obtain K_c as a function of NDVI was generated. K_c obtained with the model was defined as K_{cNDVI} ($K_{cNDVI} = 0.8853(NDVI)$) while that obtained with equation 6, based on measurements from the EC system was labelled as K_c .

te basal del cultivo (K_{Cb}). El modelo se generó con los datos de K_C y NDVI del año 2018 y se validó con datos del año 2019.

Cuesta *et al.* (2005) y Consoli y Barbagallo (2012) encontraron que la relación entre el K_C y el NDVI es de tipo lineal. Por ello, con los valores de NDVI y de K_C no influenciados por la lluvia se obtuvo una regresión lineal simple con inicio forzado al origen en las coordenadas nulas (Figura 3). Así, se generó el modelo para obtener el K_C en función del NDVI. El K_C obtenido con el modelo se definió como K_{CNDVI} ($K_{CNDVI} = 0.8853(NDVI)$) y el obtenido con la ecuación 6, con base en los registros del sistema EC, fue K_C .

El $R^2 = 0.738$ encontrado en este estudio fue menor al $R^2 = 0.96$ calculado por Campos *et al.* (2010) y mayor al $R^2 = 0.63$ obtenido por Er-Raki *et al.* (2013). Tales diferencias es probable que se deban a las condiciones en las cuales se realizaron dichos estudios. En el caso de Campos *et al.* (2010) solo se relacionaron 9 datos de K_{Cb} con 9 datos de NDVI calculados a partir de imágenes Landsat 5 obtenidas en el periodo de desarrollo máximo del cultivo, comprendido entre los Dj 126 a 270. El ajuste menor obtenido por Er-Raki *et al.* (2013) se puede atribuir a las mediciones de reflectancia para calcular el NDVI, ya que las realizaron a una altura aproximada de 3 m sobre la superficie de suelo. Debido a que la vid es un

The $R^2 = 0.738$ found in this study was lower than the $R^2 = 0.96$ calculated by Campos *et al.* (2010) and higher than the $R^2 = 0.63$ obtained by Er-Raki *et al.* (2013). These differences are probably due to the conditions under which the studies were made. In the case of Campos *et al.* (2010), only 9 K_{Cb} data with 9 NDVI data calculated from Landsat 5 images obtained in the period of maximum development of the crop (Dj 126 to 270). The lowest fit obtained by Er-Raki *et al.* (2013) can be attributed to the measurements of reflectance for calculating NDVI, given that they were made at an approximate height of 3 m over ground surface. Because the vine is a tall crop (around 2.25 m), the measurement area of the manual radiometer was limited over the crop canopy. Therefore, those differences in the R^2 values may be results of a difference in scale.

Validation of the model

For the validation, the model generated (Figure 3) was applied with the data of NDVI of the year 2019. The relationship obtained between the values of K_{CNDVI} and of K_C showed an $R^2=0.749$, a CME = 0.11 and a slope (0.8853) close to 1.0 (Figure 4). The K_{CNDVI} , obtained with the NDVI data interpolated from the year 2019, was multiplied by the ET_0 of the corresponding day to estimate the ET_C of the

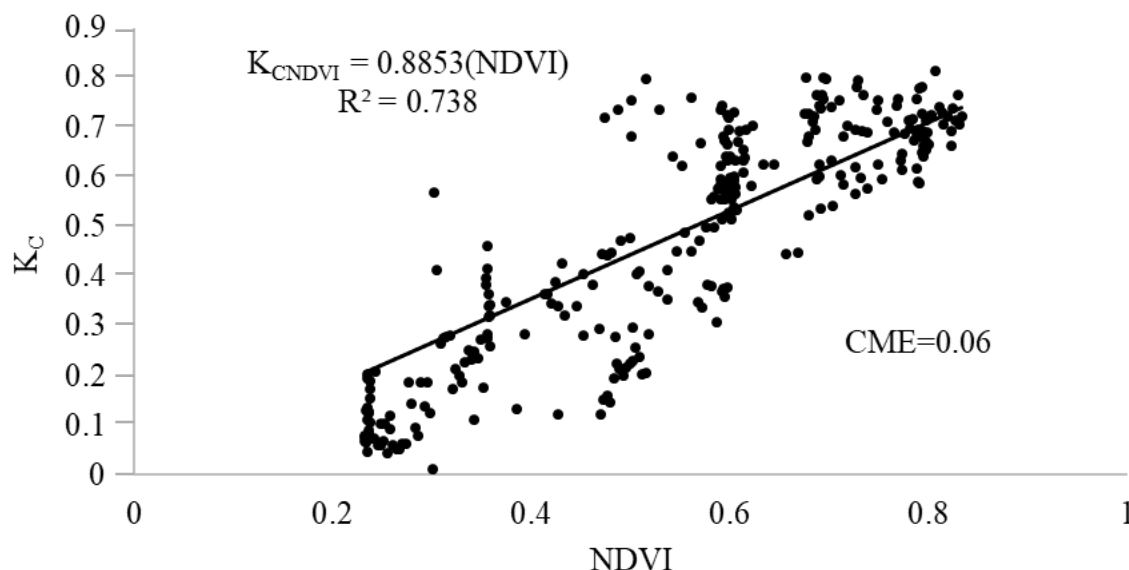


Figura 3. Relación entre el K_C y el NDVI de la parcela B3 plantada con uva de mesa cv. Perlette desde el año 2012.
Figure 3. Relationship between K_C and NDVI of the B3 plot planted with table grapes cv. Perlette since 2012.

cultivo de porte alto (alrededor de 2.25 m) el área de medición del radiómetro manual sobre el dosel del cultivo estuvo limitada. Por lo tanto, las diferencias en los valores de R^2 pueden ser resultado de una diferencia de escala.

Validación del modelo

Para la validación se aplicó el modelo generado (Figura 3) con los datos de NDVI del año 2019. La relación obtenida entre los valores de K_{CNDVI} y de K_C , mostró un $R^2 = 0.749$, un CME = 0.11 y una pendiente (0.8853) cercana a la unidad (Figura 4). El K_{CNDVI} obtenido con los datos de NDVI interpolado del año 2019 se multiplicó por la ET_0 del día correspondiente para estimar la ET_C del modelo. En lo subsecuente, se denominará ET_C a la variable medida con el sistema EC, y ET_{CEST} al resultado de multiplicar el K_{CNDVI} generado con el modelo por la ET_0 . La relación entre ET_C y ET_{CEST} se ajustó con una R^2 de 0.921 y un CME de 0.67 mm d^{-1} (Figura 5).

Al comparar las R^2 (Figura 4 y Figura 5) se puede observar un ajuste mayor en la segunda relación, a pesar de que los mismos valores de NDVI se usaron en ambas. Choudhury *et al.* (1994) encontraron una relación mejor entre el IAF y la ET_C que entre el IAF y el K_C , debido a las variaciones en la evaporación del

model. Hereafter, ET_C will be used to refer to the variable measured with the EC system, and ET_{CEST} to the result of multiplying the K_{CNDVI} generated with the model by the ET_0 . The relationship between ET_C and ET_{CEST} fitted with an R^2 of 0.921 and a CME of 0.67 mm d^{-1} (Figure 5).

When comparing both R^2 values (Figure 4 and Figure 5), a greater fit can be observed in the second relationship, even though the same values of NDVI were used. Choudhury *et al.* (1994) found a better relationship between LAI and ET_C than between LAI and K_C , due to the variations in soil evapotranspiration. Given that NDVI values are directly related with LAI of the crop, the relationship between K_C and K_{CNDVI} fitted in a lower degree than the relationship between ET_C and ET_{CEST} ; the highest values of R^2 were obtained in this latter relationship.

Comparison between data measured, and estimated with the model

In the monthly irrigation values, ET_0 , ET_C , ET_{CEST} and rain, and the monthly averages of K_C and K_{CNDVI} of the B3 plot, the data that received influence from the rainfall were included to obtain the averages (Table 2). The ET_0 values are around 1800 mm a^{-1} , as it is characteristic of the semi-arid climates (Er-Raki

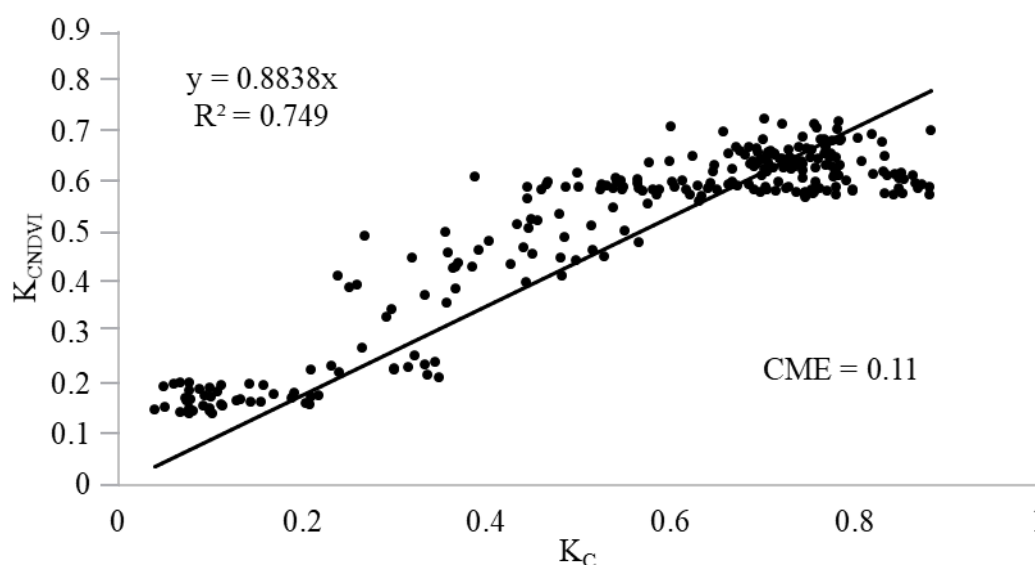


Figura 4. Relación entre el K_C medido con el método de EC y el K_{CNDVI} de la parcela B3 plantada con uva de mesa cv. Perlette desde el año 2012.

Figure 4. Relationship between the K_C measured with the method of EC and the K_{CNDVI} of the B3 plot planted with table grapes cv. Perlette since 2012.

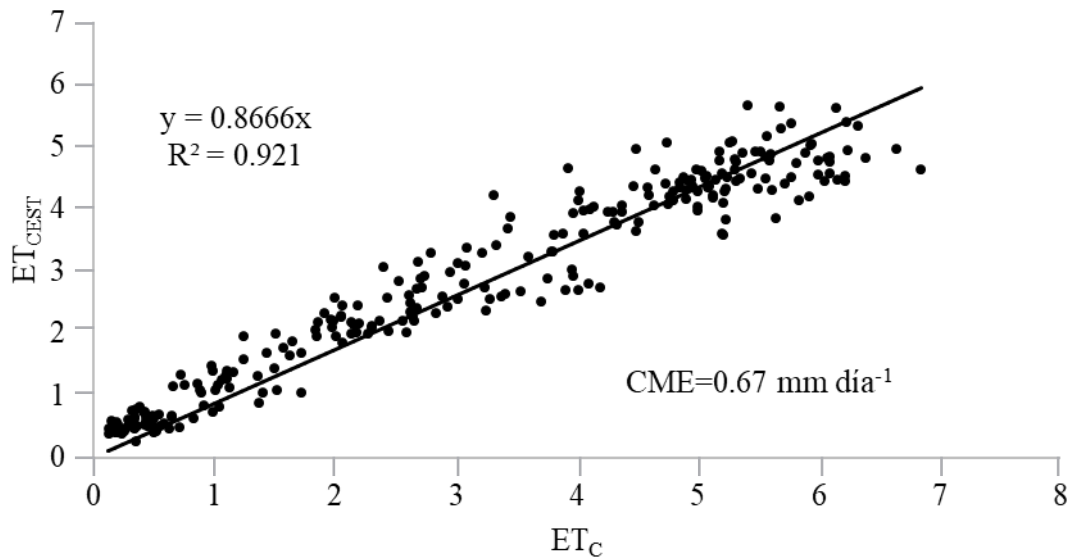


Figura 5. Relación entre la ET_C y la ET_{CEST} de la parcela B3 plantada con uva de mesa cv. Perlette desde el año 2012.
Figure 5. Relationship between ET_C and ET_{CEST} of the B3 plot planted with table grapes cv. Perlette since 2012.

suelo. Dado que los valores de NDVI se relacionaron de forma directa con el IAF del cultivo, la relación entre el K_C y el K_{CNDVI} tuvo grado de ajuste menor que la relación entre la ET_C y la ET_{CEST} ; los valores mayores de R^2 se obtuvieron en esta última relación.

Comparación entre datos medidos y estimados con el modelo

En los valores mensuales de riego, ET_0 , ET_C , ET_{CEST} y lluvia, y los promedios mensuales de K_C y K_{CNDVI} de la parcela B3, se incluyeron los datos que recibieron influencia de la lluvia para obtener los promedios (Cuadro 2). Los valores de ET_0 están alrededor de los 1800 mm a^{-1} , característico de los climas semiáridos (Er-Raki *et al.*, 2013). Respecto a los valores extremos de ET_0 , los valores mínimos se obtuvieron en invierno (1.47 mm d^{-1} en 2018 y 0.97 mm d^{-1} en 2019) y los máximos en verano (9.05 mm d^{-1} en 2018 y 9.62 mm d^{-1} en 2019). Er-Raki *et al.* (2013) observaron valores mínimos de ET_0 en invierno y otoño (2 mm d^{-1}) y máximos en verano (8.5 mm d^{-1} en 2005 y 9.5 mm d^{-1} en 2006).

Respecto a la ET_C , en 2018 el promedio fue de 3.02 mm d^{-1} y en 2019 fue de 3.2 mm d^{-1} , mientras que el promedio de ET_0 fue 5.3 y 4.9 mm d^{-1} . Así, la ET_C representó 57.1 y 64% de la ET_0 . Zermeño-

et al., 2013). Regarding the extreme values of ET_0 , the minimum values were obtained in winter (1.47 mm d^{-1} in 2018 and 0.97 mm d^{-1} in 2019), and the maximum in summer (9.05 mm d^{-1} in 2018 and 9.62 mm d^{-1} in 2019). Er-Raki *et al.* (2013) observed the minimum ET_0 values in winter and autumn (2 mm d^{-1}), and the maximum in summer (8.5 mm d^{-1} in 2005 and 9.5 mm d^{-1} in 2006).

Regarding ET_C , in 2018 the average was 3.02 mm d^{-1} and in 2019 it was 3.2 mm d^{-1} , while the average ET_0 was 5.3 and 4.9 mm d^{-1} . Thus, ET_C represented 57.1 and 64% out of ET_0 . Zermeño-González *et al.* (2017) explained this difference by the partial cover of the crop. As for the values of ET_C , Rodríguez *et al.* (2010) observed maximum values of 5 mm d^{-1} , and in this study during the summer the maximum values were 6.44 mm d^{-1} in 2018 and 7.74 mm d^{-1} in 2019. In general, the values of K_C and ET_C obtained by these authors differ from those shown in Table 2, although both studies were carried out in the same zone and with the same method. An important difference was the frequency of measurement, which in this study was 20 Hz; while Rodríguez *et al.* (2010) measured a frequency of 10 Hz. Allen *et al.* (2011) mentioned that measurements with the EC system are usually made at any frequency between 5 and 20 Hz, and 10 Hz is the most common. Thus,

Cuadro 2. Valores mensuales de riego, ET_0 , ET_C , ET_{CEST} y promedios mensuales de K_C y K_{CNDVI} de la parcela B3 plantada con uva de mesa cv. Perlette desde el año 2012.**Table 2. Monthly values of irrigation, ET_0 , ET_C , ET_{CEST} and monthly averages of K_C and K_{CNDVI} of the B3 plot planted with table grapes cv. Perlette since 2012.**

Mes	Riego (mm)		ET_0 (mm)		ET_C (mm)		ET_{CEST} (mm)		K_C		K_{CNDVI}	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
1	12	29	92	87	9	15	19	15	0.10	0.21	0.17	0.17
2	50	29	99	94	17	17	26	18	0.18	0.18	0.26	0.19
3	130	72	165	144	59	56	61	52	0.36	0.39	0.37	0.35
4	192	125	214	185	124	115	126	109	0.58	0.62	0.59	0.59
5	158	157	239	200	162	151	164	135	0.68	0.75	0.69	0.68
6	139	121	235	227	165	165	163	147	0.71	0.73	0.70	0.65
7	157	131	221	218	163	177	142	132	0.74	0.81	0.64	0.60
8	102	80	186	200	141	160	104	122	0.75	0.80	0.56	0.61
9	67	63	169	149	109	121	88	85	0.65	0.82	0.52	0.57
10	66	74	121	135	85	98	65	79	0.71	0.73	0.54	0.58
11	55	58	93	96	42	53	46	59	0.45	0.55	0.49	0.61
12	8	6	79	82	14	37	40	36	0.19	0.45	0.38	0.47
Total	1135	944	1912	1819	1090	1164	1044	989				

González *et al.* (2017) explicaron esa diferencia por la cobertura parcial del cultivo. En cuanto a los valores de ET_C , Rodríguez *et al.* (2010) observaron valores máximos de 5 mm d⁻¹, y en este estudio durante el verano los valores máximos fueron de 6.44 mm d⁻¹ en 2018 y de 7.74 mm d⁻¹ en 2019. En general, los valores de K_C y ET_C obtenidos por esos autores difieren de los mostrados en el Cuadro 2, aunque ambos estudios se realizaron en la misma zona y con el mismo método. Una diferencia importante fue la frecuencia de medición, en este estudio fue 20 Hz; mientras que Rodríguez *et al.* (2010) midieron a una frecuencia de 10 Hz. Allen *et al.* (2011) mencionaron que las mediciones con el sistema EC se realizan a una frecuencia de entre 5 y 20 Hz, y 10 Hz es la más común. Por ello, la frecuencia de medición no es una explicación satisfactoria ante las diferencias encontradas.

Durante la etapa de crecimiento y desarrollo de las plantas del viñedo, los K_C (Cuadro 2) fueron inferiores a los 0.30, 0.85 y 0.45, encontrados por Allen *et al.* (1998); esa fue una evidencia del efecto del riego localizado que provoca una reducción en la evaporación del suelo (Consoli y Vanella, 2014). Asimismo, se identificó que entre temporadas consecutivas los valores de K_C fueron diferentes. López-Urrea *et al.* (2012) también observaron este efecto; obtuvieron datos de K_C de 0.75, 0.60 y 0.72 de enero hasta la cosecha (agosto-septiembre), dichos valores fueron

the frequency of measurement is not a satisfactory explanation for the differences found.

During the growth and development stage of the vineyard, K_C (Table 2) were lower than those 0.30, 0.85 and 0.45 recorded by Allen *et al.* (1998); that is evidence of the effect from localized irrigation that reduced evaporation of the soil (Consoli and Vanella, 2014). Similarly, it was identified that between consecutive seasons K_C values were different; López-Urrea *et al.* (2012) also observed this effect, with K_C data of 0.75, 0.60 and 0.72 from January to harvest time (August-September), those values were determined with a weighing lysimeter in cv. Tempranillo in 2007, 2008 and 2009, respectively. That difference with this study is explained by the amount of cover, since table grapes need to intercept the highest amount of radiation. In contrast, in grapes for wine production the amount of cover must be limited in order to increase fruit quality.

Zermeño-González *et al.* (2017) estimated values of K_C higher than 1 from May to August, in wine grape cv. Shiraz. In their study, they multiplied the ET_0 by the factor of crop cover before using equation 5, which is why their K_C values were higher than those of this study; for only six K_C data greater than 1 were registered in the two years studied. These values were obtained during the rainy season, in which there was a reduction of ET_0 or an increment in ET_C due to

determinados con un lisímetro de pesada en cv. Tempranillo en 2007, 2008 y 2009, respectivamente. Esa diferencia con este estudio se explica por la cantidad de cobertura, ya que la uva de mesa requiere interceptar la mayor cantidad de radiación. En cambio, en la uva destinada a la producción de vino se debe limitar la cobertura para incrementar la calidad de la fruta.

Zermeño-González *et al.* (2017) estimaron valores de K_C mayores a 1 de mayo a agosto, en uva para vino cv. Shiraz. En su estudio, multiplicaron la ET_0 por el factor de cobertura del cultivo antes de aplicar la ecuación 5, razón por la cual sus valores de K_C fueron mayores a este estudio en el cual solo se registraron seis datos de K_C mayores a 1 en los dos años estudiados. Estos valores se obtuvieron durante la temporada de lluvias, en la cual se presentó una disminución de la ET_0 o un incremento de la ET_C debido a la mayor evaporación del suelo, tal como observaron Consoli y Barbagallo (2012).

En cuanto a los datos modelados, la variación de la ET_{CEST} es congruente con las fluctuaciones de la ET_C medida. Sin embargo, respecto a las condiciones climáticas y la fenología del cultivo se pueden definir cuatro tendencias claras de los datos estimados con el modelo durante el año (Cuadro 3).

1) Sobrestimación (enero-febrero). En esta temporada el NDVI dependió directamente de las características del suelo y los restos de la poda invernal,

a higher soil evaporation, as it was also observed by Consoli and Barbagallo (2012).

Regarding the modelled data, variation on ET_{CEST} is congruent with fluctuations of measured ET_C . However, as for climatic conditions and crop phenology, four clear tendencies can be defined from the data estimated with the model during the year (Table 3).

- 1) Overestimation (January-February). In this period NDVI depended directly on characteristics of the soil and remnants of the winter pruning, thus K_{CNDVI} was higher than K_C measured. This effect was observed only in 2018, because in 2019 there were rains that increased ET_C , due to a higher soil evaporation (Allen *et al.*, 1998; Consoli and Barbagallo, 2012), and therefore K_C also increased.
- 2) Adequate fit (March-June). Because it is the driest season of the year, the greatest quantity of images free of cloudiness were analyzed. In most of this period an image was processed every 5 d; this is the requirement for estimating ET_C with 80% accuracy (Alfieri *et al.*, 2017). This period is very important, because frequently a greater amount of water is supplied than what is required by the crop, due to the rapid growth of the foliage.
- 3) Underestimation (July-October). This is due to the smaller quantity of available images because

Cuadro 3. ET_C , ET_{CEST} , diferencia entre ET_C y ET_{CEST} , número de imágenes analizadas y precipitación durante cuatro periodos de desempeño del modelo en la parcela B3 plantada con uva de mesa cv. Perlette desde el año 2012.

Table 3. ET_C , ET_{CEST} , difference between ET_C and ET_{CEST} , number of images analyzed and rainfall during four periods of model performance in the B3 plot planted with table grapes cv. Perlette since 2012.

Periodo		Ene -feb	Mar-jun	Jul-oct	Nov-dic	Total
ET_C (mm)	2018	26	510	498	57	1090
ET_{CEST} (mm)	2018	45	514	399	86	1044
ET_C (mm)	2019	32	487	556	90	1164
ET_{CEST} (mm)	2019	33	443	418	95	989
$ET_C - ET_{CEST}$ (mm)	2018	-19	-4	99	-29	
	2019	-1	44	138	-5	
$ET_C - ET_{CEST}$ (%)	2018	73	0.8	20	51	
	2019	3	9	25	5	
Imágenes analizadas	2018	3	20	17	9	49
	2019	6	18	12	7	43
Precipitación (mm)	2018	0	6	230	0	236
	2019	10	6	83	161	260

por lo que el K_{CNDVI} fue mayor que el K_C medido. Tal efecto se apreció solo en 2018 porque en 2019 se presentaron lluvias que aumentaron la ET_C , debido a la mayor evaporación del suelo (Allen *et al.*, 1998; Consoli y Barbagallo, 2012), y por lo tanto el K_C también se incrementó.

- 2) Ajuste adecuado (marzo-junio). Por ser la temporada más seca del año se analizó la mayor cantidad de imágenes libres de nubosidad. En la mayor parte de este periodo se procesó una imagen cada 5 d, requisito para estimar la ET_C con una precisión del 80% (Alfieri *et al.*, 2017). Este periodo es muy importante porque debido al crecimiento rápido del follaje se suele aportar un volumen de agua mayor que el requerido por el cultivo.
- 3) Subestimación (julio-octubre). Ésta ocurre debido a la menor cantidad de imágenes disponibles por la temporada de lluvias y a la saturación del NDVI (Er-Raki *et al.*, 2013). A pesar de que el cultivo continuaba con el desarrollo del follaje y la evapotranspiración incrementó, el NDVI no lo detectó.

De manera que los valores de K_{CNDVI} y, en consecuencia, de ET_{CEST} fueron menores que el K_C y la ET_C medidos por el método de EC. Además, hubo una mayor diferencia entre la ET_C y la ET_{CEST} en 2019 (Cuadro 3), porque en ese año durante agosto y septiembre hubo dos periodos consecutivos de 20 y 25 d sin imágenes disponibles, los cuales tuvieron un efecto directo en los valores bajos de ET_{CEST} .

- 4) Sobreestimación (noviembre-diciembre). Debido a la senescencia, las hojas redujeron su tasa de evapotranspiración; pero el NDVI no pudo detectar tales cambios (Knipper *et al.*, 2019), por lo que se obtuvieron valores de K_{CNDVI} altos. En 2019 durante este periodo se presentaron lluvias, por lo tanto, el efecto fue menos evidente que en 2018.

Evapotranspiración a nivel de predio

Los mapas de ET_{CEST} para el periodo marzo-junio del 2019 (Figura 6) y de la ET_{CEST} anual (Figura 7) se realizaron tomando como base los mapas de K_{CNDVI} (48 de 2018 y 43 de 2019) obtenidos al aplicar el modelo generado (Figura 3). Estos mapas se multiplicaron por la ET_0 diaria y se usó el mapa de K_{CNDVI} desde un día después de la fecha de captura de la ima-

of the rainy season and the saturation of the NDVI (Er-Raki *et al.*, 2013). Even though vines continued their foliage development and evapotranspiration increased, NDVI did not detect this.

Thus, K_{CNDVI} values and consequently ET_{CEST} were lower than the K_C and ET_C measured by the EC method. Furthermore, there was a greater difference between ET_C and ET_{CEST} in 2019 (Table 3), because in that year during August and September there were two consecutive periods of 20 and 25 d without available images; those periods had a direct effect on the low ET_{CEST} values.

- 4) Overestimation (November-December).

Due to senescence, leaves reduced their evapotranspiration rate; but NDVI was unable to detect these changes (Knipper *et al.*, 2019); thus, high K_{CNDVI} values were obtained. In 2019 there were rains during this period, therefore this effect was less evident than that in 2018.

Evapotranspiration at plot scale

Maps of ET_{CEST} for March-June 2019 (Figure 6) and that of annual ET_{CEST} (Figure 7) were made based on the K_{CNDVI} maps (48 of 2018 and 43 of 2019) obtained with the generated model (Figure 3). These maps were multiplied by the daily ET_0 and the K_{CNDVI} map was used starting on the day after the date of the image, until the date at which the next available image was taken. Daily maps of ET_{CEST} were used to obtain ET_{CEST} values for the period of interest using equation 6.

During March-June 2019 (Figure 6), in the B3 plot (see Figure 1), average NDVI was 0.63 with variation from 0.55 to 0.67. Similarly, K_{CNDVI} varied from 0.49 to 0.59 with an average of 0.56. ET_{CEST} presented a mean value of 399 mm with an interval from 351 to 422 mm. When comparing the average ET_{CEST} with the ET_C data from this plot (Table 3), for the same period March-June in which the best fit of the model was showed, an underestimation of 88 mm (18%) was observed. This situation is attributed to the fact that the satellite imagery represented the heterogeneity with which the crop developed in each square of plantation, and therefore, also the different rates of evapotranspiration within the plot.

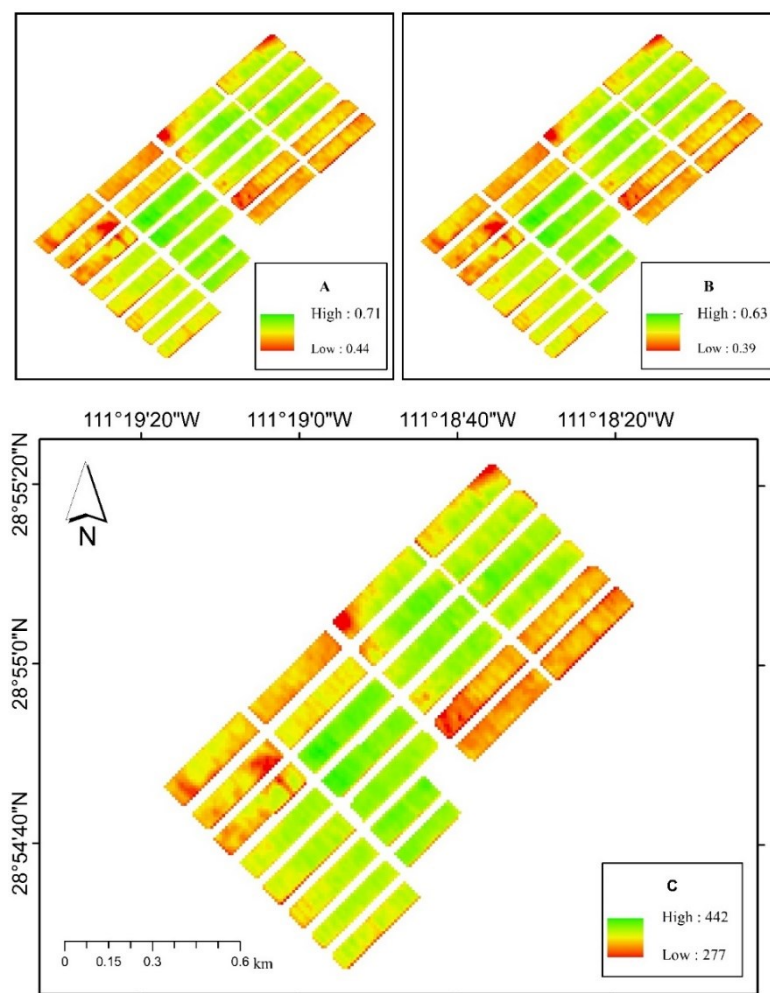


Figura 6. Promedio de NDVI (A), promedio de K_{CNDVI} (B) y ET_{CEST} (C) del periodo marzo – junio del año 2019, en un viñedo de uva de mesa en Sonora, México.

Figure 6. Average NDVI (A), K_{CNDVI} (B) and ET_{CEST} (C) in the period March-June 2019, within a vineyard of table grapes in Sonora, Mexico.

gen hasta la fecha de captura de la siguiente imagen disponible. Los mapas diarios de ET_{CEST} se utilizaron para obtener la ET_{CEST} del periodo de interés utilizando la ecuación 6.

Durante el periodo marzo-junio del año 2019 (Figura 6), en la parcela B3 (ver Figura 1), el promedio de NDVI fue 0.63 con variación de 0.55 a 0.67. Asimismo, el K_{CNDVI} varió de 0.49 a 0.59 con un promedio de 0.56. La ET_{CEST} presentó un valor medio de 399 mm con intervalo de 351 a 422 mm. Al comparar el valor promedio de ET_{CEST} con el dato de ET_C de dicha parcela (Cuadro 3), durante el mismo periodo marzo-junio en el cual se presentó el ajuste mejor del modelo, se observó una subestimación de

For the annual data of ET_{CEST} from the B3 plot (Figure 7), the average water evapotranspiration in 2019 was 990 mm with variation from 887 to 1046 mm, and the average value was lower by 174 mm (15%) than the ET_C measured in the B3 plot (Table 3). It is also observed that plots: A1, A2, A6, B1, B2, B5, B6, C7, D6, D7 and D8 presented the zones with the most contrasting values of ET_{CEST} in 2018. Of them, a reduction was observed in 2019, but the pattern was maintained. According to Knipper *et al.* (2018), this type of maps makes it possible to identify areas with stress from deficient irrigation or nutrition, poor functioning of the irrigation system, or other environmental stress.

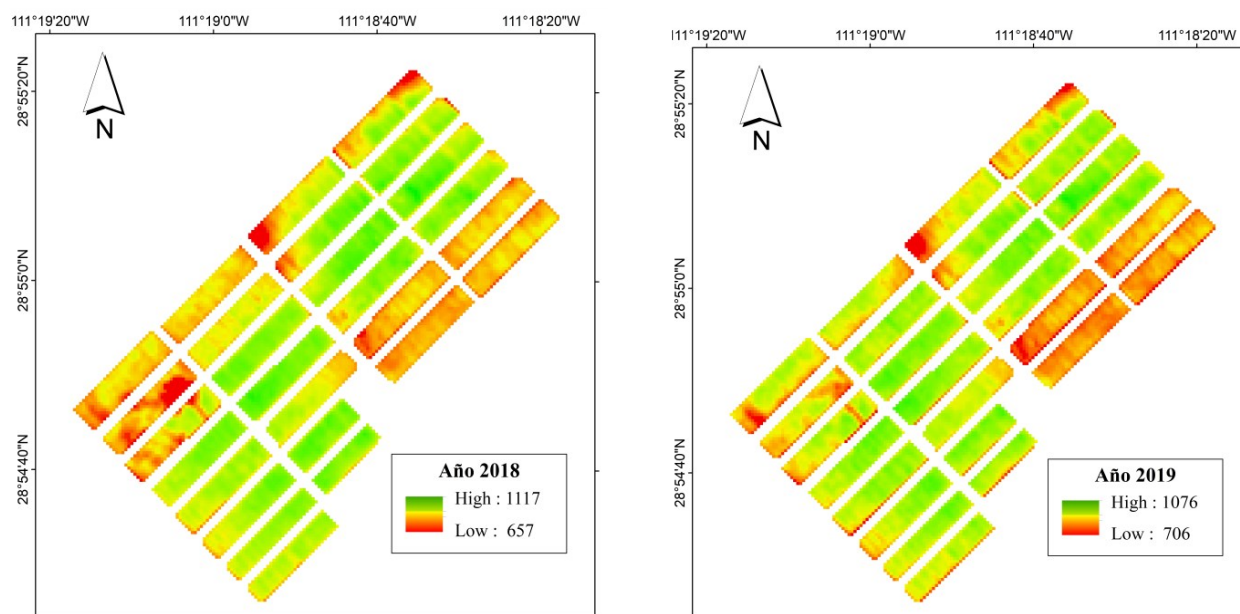


Figura 7. Mapas de evapotranspiración estimada a nivel de predio durante 2018 y 2019 en un viñedo de uva de mesa en Sonora, México.

Figure 7. Maps of evapotranspiration estimated at plot scale during 2018 and 2019 in a vineyard of table grapes in Sonora, Mexico.

88 mm (18%). Esta situación se atribuye a que las imágenes de satélite representaron la heterogeneidad con la cual se desarrolló el cultivo en cada cuadro de plantación y, a partir de ello, también las tasas de evapotranspiración diferentes dentro del predio.

Para los datos anuales de ET_{CEST} de la parcela B3 (Figura 7), la lámina evapotranspirada promedio en 2019 fue 990 mm con variación de 887 a 1046 mm, y el valor promedio fue menor en 174 mm (15%) que la ET_c medida en la parcela B3 (Cuadro 3). También se observa que las parcelas A1, A2, A6, B1, B2, B5, B6, C7, D6, D7 y D8 presentaron las zonas con valores de ET_{CEST} más contrastantes en 2018, de las cuales se observó una disminución en 2019, pero el patrón se mantuvo. De acuerdo con Knipper *et al.* (2018) este tipo de mapas permiten identificar áreas con estrés por riego o nutrición deficiente, mal funcionamiento en el sistema de riego u otro estrés ambiental.

Esta información es de gran utilidad para técnicos y productores, ya que con estos mapas se identifican aquellas áreas donde se presenta algún tipo de estrés y se les da prioridad para su corrección rápida en el manejo de esas parcelas. Por esta razón es necesario

This information is of great use for technicians and producers, as these maps identify those areas where some type of stress is present, and priority can be given for rapid correction in the management of these plots. Therefore, it is necessary to generate these products in zones such as the Costa de Hermosillo, where the quantity of available images is high, for their extensive use. Regardless Knipper *et al.* (2019) mentioned that the estimations of ET_c based on the NDVI do not appropriately distinguish the spatial diversity due to their slow response to the indicators of stress, and furthermore, that the real conditions of the canopy are only available during the image is taken.

CONCLUSIONS

The methodology proposed for estimating the value of the coefficient of fit for crop development (K_c) as a function of the NDVI interpolated daily, underestimated the evapotranspiration from the annual crop by just 11% in relation to the value obtained with the Eddy covariance method, thus it is considered adequate for this purpose.

generar estos productos en zonas como la Costa de Hermosillo donde la cantidad de imágenes disponibles es alta, para su uso extensivo. A pesar de que Knipper *et al.* (2019) mencionaron que las estimaciones de ET_C basadas en el NDVI no distinguen de forma apropiada la diversidad espacial debido a su respuesta lenta ante los indicadores de estrés y, además, que las condiciones reales del dosel solo están disponibles durante la toma de la imagen.

CONCLUSIONES

La metodología propuesta para estimar el valor del coeficiente de ajuste por desarrollo de cultivo (K_c) en función del valor del NDVI interpolado diario, subestimó sólo un 11% de la evapotranspiración del cultivo anual respecto al valor obtenido con el método de covarianza de vórtices; por lo tanto, se considera adecuada para este propósito.

La estimación de la evapotranspiración del cultivo (ET_C) a nivel de predio fue 15% inferior, pero tiene la ventaja de ser aplicable a extensiones grandes de áreas cultivadas. Además, el cálculo de ET_C en forma espacialmente explícita a nivel pixel es importante para el manejo del riego a nivel parcela, ya que permite conocer el volumen de agua evapotranspirada por cada sección de riego y cuadro de plantación.

El método propuesto estimó con precisión adecuada la ET_C del viñedo, con una resolución temporal de 5 a 10 días en función de la disponibilidad de imágenes de satélite. Por medio de la interpolación de esos datos se pudo estimar la evapotranspiración diaria del cultivo. La mejor funcionalidad del modelo se presentó en la primavera, la etapa de desarrollo máximo del cultivo y de la contribución menor de la humedad del suelo a la evaporación, por la cobertura foliar mayor en los viñedos de uva de mesa.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) y la Agencia Chilena de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AGCID), por los fondos para la investigación con el proyecto “Incremento de la eficiencia y cuidado del agua mediante experiencia conjunta entre comunidades de Sonora-México y Linares-Chile”. Al productor cooperante del predio Viñas de la Costa, Costa de Hermosillo, México, por su colaboración fundamental para llevar a cabo el estudio.

The estimation of the crop evapotranspiration (ET_C) at the plot scale was 15% lower, but it has the advantage of being applicable to large extensions of cultivated areas. Furthermore, the calculation of ET_C in spatially explicit form at a pixel precision is important for the management of irrigation at the plot scale, since it makes possible to know the volume of evapotranspiration water for each irrigation section and square of plantation.

The proposed method estimated with adequate precision the ET_C of the vineyard, with a temporal resolution of 5 to 10 days as a function of the availability of satellite images. By means of the interpolation of these data it was possible to estimate the daily crop evapotranspiration. The best functionality of the model occurred in the spring, the stage of maximum crop development and of the lowest contribution of soil moisture to evapotranspiration, due to the greater foliar cover in the vineyards of table grapes.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Fondo de la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) and Agencia Chilena de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AGCID), for funding this research through the project “Incremento de la eficiencia y cuidado del agua mediante experiencia conjunta entre comunidades de Sonora-México y Linares-Chile”. To the cooperative producer of the plot “Viñas de la Costa”, at Costa de Hermosillo, Mexico, for his decisive collaboration for this study.

—End of the English version—

---*---

LITERATURA CITADA

- Alfieri, J. G., M. G. Anderson, W. P. Kustas, and C. Cammalleri. 2017. Effect of the revisit interval and temporal upscaling methods on the accuracy of remotely sensed evapotranspiration estimates. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 21: 83–98.
- Allen, R. G., L. S. Pereira, D. Raes, and M. Smith. 1998. Crop evapotranspiration - Guidelines for computing crop water requirements - FAO Irrigation and drainage paper 56. Rome, Italy. ISBN 92-5-104219-5. 300 p.

- Allen, R. G., L. S. Pereira, T. A. Howell, and M. E. Jensen. 2011. Evapotranspiration information reporting: I. Factors governing measurement accuracy. *Agric. Water Manage.* 98: 899-920.
- Burba, G. 2013. Eddy covariance method for scientific, industrial, agricultural, and regulatory applications. A field book on measuring ecosystem gas Exchange and areal emissions rates. LI-COR Biosciences. Lincoln, NE, USA. 331 p.
- Campos, I., C. M. U. Neale, A. Calera, C. Balbotin, and J. González-Piqueras. 2010. Assessing satellite-based basal crop coefficients for irrigated grapes (*Vitis vinifera* L.). *Agric. Water Manage.* 98: 45-54.
- Chavez, P. S. 1996. Image-based atmospheric corrections. Revisited and improved. *Photogramm. Eng. Remote Sens.* 62: 1025-1036.
- Choudhury, B. J., N. U. Ahmed, S. B. Idso, R. J. Reginato, and C. S. T. Daughtry. 1994. Relations between evaporation coefficients and vegetation indices studied by model simulations. *Remote Sens. Environ.* 50: 1-17.
- Consoli, S., and S. Barbagallo. 2012. Estimating water requirements of an irrigated mediterranean vineyard using a satellite-based approach. *J. Irrig. Drain Eng.* 138: 896-904.
- Consoli, S., and D. Vanella. 2014. Mapping crop evapotranspiration by integrating vegetation indices into a soil water balance model. *Agric. Water Manage.* 143: 71-81.
- Cuesta A., A. Montoro, A. M. Jochum, P. López, y A. Calera. 2005. Metodología operativa para la obtención del coeficiente de cultivo desde imágenes satelitales. *ITEA.* 101: 212-224.
- Doorenbos, J., and W.O. Pruitt. 1977. Guidelines for Predicting Crop Water Requirements FAO Irrigation and Drainage Paper 24. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 144 p.
- Er-Raki, S., J. C. Rodríguez, J. Garatuza-Payan, C. J. Watts, and A. Chehbouni. 2013. Determination of crop evapotranspiration of table grapes in a semi-arid region of Northwest Mexico using multi-spectral vegetation index. *Agric. Water Manage.* 122: 12-19.
- Ham, J. M., and J. L. Heilman. 2003. Experimental test of density and energy-balance corrections on carbon dioxide flux as measured using open-path Eddy covariance. *Agron. J.* 95: 1393-1403.
- Hernández P., J. 2019. Desarrollo tecnológico e integración comercial de los productores agrícolas de la Costa de Hermosillo en la globalización. *Reg. Soc.* 31: 1-25.
- Jiang, Z., A. R. Huete, J. Chen, Y. Chen, L. Jing, G. Yan, and X. Zhang. 2006. Analysis of NDVI and scaled difference vegetation index retrievals of vegetation fraction. *Remote Sens. Environ.* 101: 366-378.
- Knipper, K. R., W. P. Kustas, M. C. Anderson, J. G. Alfieri, J. H. Prueger, C. R. Hain, F. Gao, Y. Yang, L.G. McKee, H. Nieto, E. H. Hipps, M. M. Alsina, and L. Sanchez. 2018. Evapotranspiration estimates derived using thermal-based satellite remote sensing and data fusion for irrigation management in California vineyards. *Irrig. Sci.* 37: 431-449.
- Knipper, K. R., W. P. Kustas, M. C. Anderson, M. M. Alsina, C. R. Hain, J. G. Alfieri, J. H. Prueger, F. Gao, L. G. McKee, and L. A. Sanchez. 2019. Using high-spatiotemporal thermal satellite ET retrievals for operational water use and stress monitoring in a California vineyard. *Remote Sens.* 11: 2124.
- López-Urrea, R. A. Montoro, F. Mañas, P. López-Fuster, and E. Fereres. 2012. Evapotranspiration and crop coefficients from lysimeter measurements of mature 'Tempranillo' wine grapes. *Agric. Water Manage.* 112: 13-20.
- Paz, F., E. Romero, E. Palacios, M. Bolaños, R. Valdez, y A. Aldrete. 2015. Alcances y limitaciones de los índices espectrales de la vegetación: análisis de índices de banda ancha. *Terra Latinoam.* 33: 27-49.
- Pôças, I., A. Calera, I. Campos, and M. Cunha. 2020. Remote sensing for estimating and mapping single and basal crop coefficients: A review on spectral vegetation indices approaches. *Agric. Water Manage.* 233: 1060-1081.
- Rodríguez, J., J. Grageda, C. Watts, J. Garatuza-Payan, A. Castellanos-Villegas, J. Rodríguez-Casas, and V. Olavarrieta. 2010. Water use by perennial crops in the lower Sonora watershed. *J. J. Arid. Environ.* 74: 603-610.
- Rouse, J. W., R. H., J. A. Schell, D. W. Deering, and J. C. Harlan. 1974. Monitoring the vernal advancement and retrogradation of natural vegetation. NASA/GSFC, Type III, Final report, Greenbelt, MD. 371 p.
- Salazar, A. A., J. L. Moreno V., y A. N. Lutz L. 2012. Agricultura y manejo sustentable del acuífero de la Costa de Hermosillo. *Reg. Soc.* 3: 155-179.
- The Max Planck Institute for Biogeochemistry. 2020. Eddy covariance procedure. <http://www.bgc-jena.mpg.de/REddyProc/brew/REddyProc.rhtml> (Consultado: enero 2020).
- Van Kesteren, B., O.K. Hartogensis, D. Van Dinther, A.F. Moene, and H.A.R. De Bruin, 2013. Measuring H₂O and CO₂ fluxes at field scales using scintillometry. Part II. Validation and application of 1-min flux estimates. *Agric. Forest Meteorol.* 178-179: 88-105.
- Zermeño-González, A., A. Melendres-Alvarez, L. Fuerte-Mosqueda, J. Munguía-López, y L. Ibarra-Jiménez. 2017. Tasa de evapotranspiración del cultivo de la vid y su relación con la de referencia del método FAO Penman-Monteith. *Agrociencia* 51: 1 - 12.

BIOMASS AND ENERGY CHARACTERISTICS OF MARALFALFA GRASS (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone CULTIVATED IN WARM SUBHUMID CLIMATE TO PRODUCE BIOETHANOL

BIOMASA Y CARACTERÍSTICAS ENERGÉTICAS DEL PASTO MARALFALFA (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone CULTIVADO EN CLIMA CÁLIDO SUBHÚMEDO PARA PRODUCIR BIOETANOL

Joel Ventura-Ríos¹, José A. Honorato-Salazar², Mario A. Santiago-Ortega³, Iliana Barrera-Martínez^{4*}

¹Departamento de Producción Animal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Colonia Buenavista. Saltillo, Coahuila. 25315 México.

²Campo Experimental, San Martinito. km. 56.5, Carretera Federal México-Puebla, Colonia San Martinito, Tlahuapan, Puebla. 74100 México. ³Centro de Desarrollo Tecnológico Tantakin-FIRA, km 4.5, Carretera Tzucacab-Escondido, Tzucacab, Yucatán. 97965 México.

⁴CONACYT-CIATEJ. Camino Arenero 1227, El Bajío. Zapopan, Jalisco. 45019 México (ibarrera@ciatej.mx)

ABSTRACT

Biofuels are a sustainable energy option that can contribute to solve some current environmental problems. For example, it seems imperative to find alternative energy sources; and among them adequate and sustainable raw materials to produce biofuels, such as bioethanol. This study, under the assumption that Maralfalfa grass would be a suitable substrate to produce biofuel, aimed at evaluating the biomass yield, chemical composition, and theoretical bioethanol production of Maralfalfa grass (*C. purpureus* Schumach.) Morrone harvested at three cutting frequencies (CF). Treatments were distributed in a randomized complete blocks design with split-plots arrangement and three replicates. Analysis of variance was done with GLM procedure and means were compared with Tukey test ($p \leq 0.05$). At 120 d, the lignocellulosic material content was the highest ($p \leq 0.05$) with 66% of holocellulose, 30% hemicellulose, 22% lignin, 1.8% acid soluble lignin, 20% acid insoluble lignin, 26% acid insoluble residue, and 6.2% ashes. The highest concentration of extractives compounds was found at 150 d harvest frequency (15.5%; $p \leq 0.05$), while the highest biomass production (32.6 Mg ha⁻¹ y⁻¹), calorific value (21.0 MJ kg⁻¹), and bioethanol production (239.9 L Mg⁻¹ MS⁻¹) was obtained at the 180 d ($p \leq 0.05$). No significant changes were found for crude protein ($p > 0.05$). Results showed that Maralfalfa grass (*C. purpureus* Schumach.) Morrone is an attractive alternative for bioethanol

RESUMEN

Los biocombustibles son una opción energética sostenible que puede contribuir a solucionar algunos problemas ambientales actuales. Por ejemplo, parece imperativo encontrar fuentes de energía alternativas; y entre ellos materias primas adecuadas y sostenibles para producir biocombustibles, como el bioetanol. Este estudio, bajo el supuesto de que el pasto Maralfalfa puede ser un sustrato adecuado para la producción de biocombustible, tuvo como objetivo evaluar el rendimiento de biomasa, la composición química y la producción teórica de bioetanol del pasto Maralfalfa (*C. purpureus* Schumach.) Morrone cosechado en tres frecuencias de corte (CF). Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar con un arreglo de parcelas divididas y tres repeticiones. El análisis de varianza se realizó con el procedimiento GLM y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). A los 120 d, el contenido de material lignocelulósico fue el más alto ($p \leq 0.05$) con 66% de holocelulosa, 30% de hemicelulosa, 22% de lignina, 1.8% de lignina soluble en ácido, 20% de lignina insoluble en ácido, 26% de residuo insoluble en ácido y 6.2% de cenizas. La concentración mayor de compuestos extractivos se encontró en la frecuencia de cosecha de 150 d (15.5%; $p \leq 0.05$), mientras que mayor producción de biomasa (32.6 Mg ha⁻¹ y⁻¹), valor calorífico (21.0 MJ kg⁻¹), y producción de bioetanol (239.9 L Mg⁻¹ MS⁻¹) se obtuvieron a los 180 d ($p \leq 0.05$). No se encontraron cambios significativos en proteína cruda ($p > 0.05$). Los resultados mostraron que el pasto Maralfalfa (*C. purpureus* Schumach.) Morrone es una alternativa atractiva para la producción de bioetanol debido a su rendimiento de biomasa alto y composición química en tiempos de cosecha cortos.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5391-6299>

Received: September, 2020. Approved: July, 2021.

Published in Agrociencia 55: 389-401. 2021.

production due to high biomass yield and chemical composition at short harvesting times.

Key words: *Cenchrus purpureus*, lignocellulosic characterization, calorific value, bioethanol, cutting frequency.

INTRODUCTION

The need for cleaner energies has incentivized governments around the world to increase the production of biofuels. In 2018, the world biofuel production increased by 9.7%, the greatest increment since 2008. Liquid biofuels from lignocellulosic biomass, such as agricultural and forestry waste and grasses have the potential to be used as substitutes or complement of gasoline (Rengsirikul *et al.*, 2013). The world fuel ethanol production in 2018 was 52.6 billion Mg 2202.256 billion MJ (RFA, 2019), of which USA and Brazil are the largest producers, followed by the European Union and China (OECD/FAO, 2019; RFA, 2019). In order to be competitive and replace fossil fuels, they must be affordable. Feedstock can account for up to 75% of the total cost of bioethanol production, depending on the type of biomass material used to produce it (Brown *et al.*, 2020). Bioethanol is produced from maize (60%), sugar cane (25%), molasses (7%) wheat (4%), and from other grains, cassava or sugar beets (OECD/FAO, 2019), materials considered as first generation sources (Mohammed *et al.*, 2015).

The use of these materials has raised ethical concerns since its usage as feedstock for biofuel production has caused shortages and has increased the cost of materials which are important crops for human food (Mohammed *et al.*, 2015). An alternative is the use of second generation lignocellulosic materials, such as C_4 Gramineae, which contain 40% cellulose, 35% hemicelluloses, and 30% lignin. To make sugars available for bioethanol production through fermentation, a pretreatment is required to remove lignin, followed by a saccharification step to hydrolyze cellulose and hemicelluloses into fermentable sugars (Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012).

In Mexico, varieties of *Cenchrus purpureus* (Schum.) Morrone (previously *Pennisetum purpureum*) were introduced in tropical and subtropical regions. This genus is originally from

Palabras clave: *Cenchrus purpureus*, caracterización lignocelulósica, valor calorífico, bioetanol, frecuencia de corte.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de energías más limpias ha incentivado a los gobiernos de todo el mundo a aumentar la producción de biocombustibles. En 2018, la producción mundial de biocombustibles aumentó en un 9.7%, el mayor incremento desde 2008. Los biocombustibles líquidos de biomasa lignocelulósica, como los desechos agrícolas y forestales y las gramíneas, tienen el potencial de utilizarse como sustitutos o complementos de la gasolina (Rengsirikul *et al.*, 2013). La producción mundial de etanol combustible en 2018 fue 52.6 mil millones de Mg, equivalentes a 2202.256 mil millones de MJ (RFA, 2019), de los cuales EE.UU. y Brasil son los mayores productores, seguidos por la Unión Europea y China (OCDE/FAO, 2019; RFA, 2019).

Para ser competitivos y reemplazar los combustibles fósiles por biocombustibles, éstos deben ser accesibles. La materia prima puede representar hasta el 75% del costo total de producción de bioetanol, con dependencia del tipo de material de biomasa utilizado para producirlo (Brown *et al.*, 2020). El bioetanol se produce a partir del maíz (60%), caña de azúcar (25%), melaza (7%), trigo (4%) y de otros cereales, mandioca o remolacha azucarera (OCDE/FAO, 2019), materiales considerados como fuentes de primera generación (Mohammed *et al.*, 2015).

El uso de estos materiales ha planteado preocupaciones éticas, ya que su uso como materia prima para la producción de biocombustibles ha provocado escasez y ha aumentado el costo de los materiales, que son cultivos importantes para la alimentación de humanos (Mohammed *et al.*, 2015). Una alternativa es el uso de materiales lignocelulósicos de segunda generación, como las gramíneas C_4 , que contienen 40% de celulosa, 35% de hemicelulosas y 30% de lignina. Para que los azúcares estén disponibles para la producción de bioetanol a través de la fermentación, se requiere un pretratamiento para eliminar la lignina, seguido de una sacarificación para hidrolizar la celulosa y las hemicelulosas en azúcares fermentables (Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012).

En México, se introdujeron variedades de *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone (antes nombrada *Pennisetum purpureum*) en regiones tropicales

tropical zones in Africa and it is used as animal feed. However, it can be a good source of sugars to produce second generation bioethanol due higher dry matter yields (51 Mg DM ha⁻¹) (Rengsirikul *et al.*, 2013) and chemical composition (46% cellulose and 28% hemicellulose) (Lima *et al.*, 2014). In Mexico, there are few studies with grass biomass at different harvesting frequencies as feedstock to produce biofuels. Therefore, under the assumption that Maralfalfa grass would be a suitable substrate to produce biofuel, the aim of this research study was to evaluate the biomass yield, chemical composition, and theoretical bioethanol production of Maralfalfa grass (*C. purpureus* Schumach.) Morrone harvested at three cutting frequencies (CF).

MATERIALS AND METHODS

Study area

The biomass yield was evaluated at the “Papaloapan” Experimental Site of the INIFAP, at 18° 06' N and 95° 31' W, altitude 65 m, in Cd. Isla, Veracruz, with A_{wo} climate and average temperature of 25.7 °C. The soil is orthic acrisol, sandy loam, with a pH between 4.0 and 4.7, with low organic matter, nitrogen, calcium, or potassium, and medium to high phosphorus and magnesium content. The physicochemical determinations of the dry matter (DM) were done at the Laboratorio de materiales lignocelulósicos under Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), at San Martinito, Puebla, and the Instituto Mexicano del Petróleo, with the exception of N content, which was done at Laboratorio de fertilidad y química ambiental under Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo. Variables evaluated were biomass yield, calorific value, water content, extractives compounds, holocellulose, cellulose, hemicellulose, crude protein, Klason lignin, acid soluble lignin, acid insoluble lignin, acid insoluble residue, and ashes.

Plots of Maralfalfa grass

Sowing was made on July 22, 2011, in rows separated by 0.50 m, in 5 x 16 m experimental plots, with three replicates. Two fertilizations were applied at 43 and 112 d after sowing, using the formula: 120-80-00 kg ha⁻¹ N and P₂O₅.

Biomass yield

Biomass accumulation was determined per area unit for each CF 120, 150, and 180 days after the homogenization cut (dahc),

y subtropicales. Este género es originario de zonas tropicales de África y se utiliza como alimento para animales. Sin embargo, puede ser una buena fuente de azúcares para producir bioetanol de segunda generación debido a rendimientos mayores de materia seca (51 Mg DM ha⁻¹) (Rengsirikul *et al.*, 2013) y composición química (46% celulosa y 28% hemicelulosa) (Lima *et al.*, 2014). En México, son pocos los estudios sobre la aplicación de biomasa de gramíneas en diferentes frecuencias de recolección como materia prima para producir biocombustibles. Por lo tanto, bajo el supuesto de que el pasto Maralfalfa sería un sustrato adecuado para producir biocombustible, el objetivo de esta investigación fue evaluar el rendimiento de biomasa, la composición química y la producción teórica de bioetanol del pasto Maralfalfa (*C. purpureus* Schumach.) Morrone cosechado en tres frecuencias de corte (CF).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El rendimiento de biomasa se evaluó en el Sitio Experimental “Papaloapan” del INIFAP, a 18° 06' N y 95° 31' O, altitud 65 m, en Cd. Isla, Veracruz, con clima A_{wo} y temperatura promedio de 25.7 °C. El suelo es acrisol órtico, franco arenoso, con un pH entre 4.0 y 4.7, con contenido bajo de materia orgánica, nitrógeno, calcio o potasio, y contenido medio a alto de fósforo y magnesio.

Las determinaciones físicoquímicas de la materia seca (DM) se realizaron en el Laboratorio de materiales lignocelulósicos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en San Martinito, Puebla, y el Instituto Mexicano del Petróleo, con excepción del contenido de N, que se realizó en el Laboratorio de fertilidad y química ambiental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Las variables evaluadas fueron rendimiento de biomasa, valor calorífico, contenido de agua, compuestos extractivos, holocelulosa, celulosa, hemicelulosa, proteína cruda, lignina Klason, lignina soluble en ácido, lignina insoluble en ácido, residuo insoluble en ácido y cenizas.

Parcelas de pasto Maralfalfa

La siembra se realizó en julio 22, 2011, en surcos separados por 0.50 m en parcelas experimentales de 5 x 16 m, con tres repeticiones. Dos fertilizaciones se aplicaron a los 43 y 112 d después de la siembra; se utilizó la fórmula: 120-80-00 kg ha⁻¹ N y P₂O₅.

with destructive samplings for a year. In each plot, a 1 m² metal frame was randomly tossed on five occasions and the plants were cut off completely. The remaining plants were left to recover to a height of 20 cm. The collected biomass was weighed (Ohaus, Mod. GT-4000). Subsequently, the fresh weight of a sub-sample was registered, and the sub-sample dried in an oven (Felisa, Mod. FE-243A) at 55 °C until reaching constant weight, and DM was determined.

Sample preparation for analyses

The dried samples were ground in a mill (Wiley) and sifted with No. 40 (0.42 - 1.00 mm) and No. 60 (0.25 - 0.42 mm) sieves. Then, the chemical variables and calorific value were determined.

Lignocellulosic characterization

The TAPPI T-204 standard was used for the release of extractives compounds. The holocellulose content was measured using the acid chlorination method, whereas cellulose content was determined by the ASTM D1103 standard procedure. Hemicellulose content was obtained after extracting cellulose content from holocellulose. The amount of acid soluble lignin (ASL), acid insoluble lignin (AIL), and acid insoluble residue (AIR) were obtained according to Sluiter *et al.* (2012). The sum of ASL and AIL constitutes the Klason lignin of the biomass. Six determinations were done for each cutting frequency and two replicates per sample.

Crude protein (CP)

The CP concentration was measured by the semi-micro-Kjeldahl method (N x 6.25). Six determinations were done for each cutting frequency, two replicates per sample.

Calorific value

The calorific value was determined in an adiabatic pump calorimeter (Isoperibol, Parr 1266), according to the ASTM E711 standard, at 30±0.5 °C with 1 g maximum compressed pellets (ASTM, 2012). The water content (%) was determined using an Ohaus MB45 thermal scale. Five determinations were done per sample and 15 replicates were analyzed per CF.

Theoretical bioethanol yield

The theoretical bioethanol yield (TBY) (equation 3) was determined with the formulas of Badger (2002) and Dien

Rendimiento de biomasa

La acumulación de biomasa se determinó por unidad de área para cada CF 120, 150 y 180 días después del corte de homogeneización (dahc), con muestreos destructivos durante un año. En cada parcela, se arrojó al azar un marco de metal de 1 m² en cinco ocasiones y las plantas se cortaron por completo. Las plantas restantes se dejaron hasta recuperar una altura de 20 cm. La biomasa colectada se pesó (Ohaus, Mod. GT-4000). Después, el peso fresco de una submuestra se registró y la submuestra se secó en un horno (Felisa, Mod. FE-243A) a 55 °C, hasta alcanzar un peso constante y se determinó la DM.

Preparación de muestras para los análisis

Las muestras secas se molieron en un molino (Wiley) y se pasaron por tamices No. 40 (0.42 - 1.00 mm) y No. 60 (0.25 - 0.42 mm). Luego, se determinaron las variables químicas y el valor calorífico.

Caracterización lignocelulósica

El procedimiento estándar TAPPI T-204 se utilizó para la liberación de compuestos extractivos. El contenido de holocelulosa se midió por el método de cloración ácida, mientras que el contenido de celulosa se determinó con el procedimiento estándar ASTM D1103. El contenido de hemicelulosas se obtuvo después de restar el contenido de celulosa extraída de la holocelulosa. Se obtuvieron las cantidades de lignina soluble en ácido (ASL), lignina insoluble en ácido (AIL) y residuo insoluble en ácido (AIR), de acuerdo con Sluiter *et al.* (2012). La suma de ASL y AIL constituye la lignina Klason de la biomasa. Seis determinaciones se realizaron para cada frecuencia de corte y dos repeticiones por muestra.

Proteína cruda (CP)

La concentración de CP se midió con el método semi-micro-Kjeldahl (N x 6.25). Seis determinaciones se realizaron por cada frecuencia de corte, con dos repeticiones por muestra.

Valor calorífico

El valor calorífico se determinó con un calorímetro de bomba adiabática (Isoperibol, Parr 1266), de acuerdo con la norma ASTM E711, a 30±0.5 °C con 1 g de pellets comprimidos como máximo (ASTM, 2012). El contenido de agua (%) se determinó usando una báscula térmica Ohaus MB45. Cinco determinaciones se realizaron por muestra y se analizaron 15 repeticiones por CF.

(2010). The formulas included hydrolysis, chemical and stoichiometry reactions of transformation of cellulose (equation 1) and hemicelluloses (equation 2) into ethanol:

Cellulose

$$TYB_C = C \times C_{glc} \times E_{CC} \times R_{et} \times E_{fg} \times D_{et} \quad (1)$$

Hemicellulose

$$TYB_H = H \times H_{xlb} \times E_{CH} \times R_{et} \times E_{fx} \times D_{et} \quad (2)$$

Total

$$TYB = TYB_C + TYB_H \quad (3)$$

where:

TYB : $LMg^{-1} MS$; C : $kg_{cellulose} Mg^{-1} Mg^{-1} biomass$; H : $kg_{hemicellulose} Mg^{-1} biomass$; C_{glc} : glucose concentration ($1.111 kg_{glucose} kg_{cellulose}^{-1}$); C_{hlc} : concentration of xilose ($1.136 kg_{xilose} kg_{hemicellulose}^{-1}$); E_{cc} : cellulose conversion efficiency (0.76); E_{ch} : hemicelluloses conversion efficiency (0.90); TYB : ethanol stoichiometric yield ($0.511 kg_{ethanol} kg_{xilose}^{-1}$); E_{fg} : glucose fermentative efficiency (0.75); E_{fx} : xilose fermentative efficiency (0.50); D_{et} : ethanol density ($0.78 Mg m^{-3}$).

Where: TYB_C is the theoretical ethanol yield of cellulose ($LMg^{-1} DM^{-1}$) and TYB_H is the theoretical ethanol yield of hemicellulose ($LMg^{-1} DM^{-1}$)

The theoretical production of bioethanol (L) was calculated for 1 ha of Maralfalfa grass at each CF, multiplied TBV by annual biomass yield.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was randomized complete blocks with a split-plot arrangement, the large plot was the genotype and the small plot was the CF (120, 150, and 180 d) with three replicates. Analysis of variance (ANOVA) was done with the GLM procedure and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The effect of CF was estimated by the data analysis with SAS v. 9.3 for Windows® (SAS Institute, Inc., 2011).

Rendimiento teórico de bioetanol

El rendimiento teórico de bioetanol (TBV) (ecuación 3) se determinó con las fórmulas de Badger (2002) y Dien (2010). Las fórmulas incluyeron reacciones de hidrólisis, químicas y estequiométricas de transformación de celulosa (ecuación 1) y hemicelulosa (ecuación 2) en etanol:

Celulosa

$$TYB_C = C \times C_{glc} \times E_{CC} \times R_{et} \times E_{fg} \times D_{et} \quad (1)$$

Hemicelulosa

$$TYB_H = H \times H_{xlb} \times E_{CH} \times R_{et} \times E_{fx} \times D_{et} \quad (2)$$

Total

$$TYB = TYB_C + TYB_H \quad (3)$$

donde:

TYB : $LMg^{-1} MS$; C : $kg_{cellulose} Mg^{-1} Mg^{-1} biomass$; H : $kg_{hemicellulose} Mg^{-1} biomass$; C_{glc} : glucose concentration ($1.111 kg_{glucose} kg_{cellulose}^{-1}$); C_{hlc} : concentration de xilose ($1.136 kg_{xilose} kg_{hemicellulose}^{-1}$); E_{cc} : cellulose conversion efficiency (0.76); E_{ch} : hemicelluloses conversion efficiency (0.90); TYB : ethanol stoichiometric yield ($0.511 kg_{ethanol} kg_{xilose}^{-1}$); E_{fg} : glucose fermentative efficiency (0.75); E_{fx} : xilose fermentative efficiency (0.50); D_{et} : ethanol density ($0.78 Mg m^{-3}$).

Donde: TYB_C es el rendimiento teórico de etanol de la celulosa ($LMg^{-1} DM^{-1}$) y TYB_H es el rendimiento teórico de etanol de la hemicelulosa ($LMg^{-1} DM^{-1}$).

La producción teórica de bioetanol (L) se calculó por 1 ha de pasto Maralfalfa en cada CF, con TBV multiplicado por el rendimiento de biomasa anual.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con arreglo de parcelas divididas; la parcela grande fue el genotipo y la parcela pequeña fue la CF (120, 150 y 180 d) con tres re-

RESULTS AND DISCUSION

Biomass yield

Annual biomass production linearly increased as the number of days to the cutting increased. Biomass production (Megagrams) at 180 d was 32.6 Mg DM ha⁻¹, and it was statistically different ($p \leq 0.05$) to the other CF. It was 25 and 43% respectively higher than those obtained at 120 and 150 d. Between the values at 120 d CF (26.1 Mg DM ha⁻¹) and 150 d (22.8 Mg DM ha⁻¹) there was not ($p > 0.05$) statistical difference (Table 1). Rengsirikul *et al.* (2013) reported 15.4 Mg DM ha⁻¹ of biomass for *P. purpureum* at 240 d, a yield lower than the one obtained in this research. All these grasses are considered a good feedstock for bioenergy, for their higher sugar content and biomass yield (Weijde *et al.*, 2013).

peticiones. El análisis de varianza (ANDEVA) se realizó con el procedimiento GLM y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El efecto de CF se estimó a partir del análisis de los datos con SAS v. 9.3 para Windows™ (SAS Institute, Inc., 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de biomasa

La producción anual de biomasa aumentó en forma lineal a medida que aumentaba el número de días hasta el corte. La producción de biomasa (Megagramos) a los 180 d fue de 32.6 Mg DM ha⁻¹, y diferente ($p \leq 0.05$) al resto de CF; superior en 25 y 43% respectivamente, a la biomasa que se obtuvo a los 120 y 150 d. Entre los valores a los 120 d de CF (26.1 Mg DM ha⁻¹) y 150 d (22.8 Mg DM ha⁻¹)

Table 1. Biomass yield, energy value, lignocellulosic characterization, and bioethanol production of *C. purpureus* (Schumach.) Morrone cv. Maralfalfa grass at three cutting frequencies.

Cuadro 1. Rendimiento de biomasa, valor energético, caracterización lignocelulósica y producción de bioetanol de *C. purpureus* (Schumach.) Morrone cv. Hierba Maralfalfa en tres frecuencias de corte.

Variables	Cutting frequency (d)				SE
	120	150	180	Overall Mean	
Biomass yield (Mg ha ⁻¹ y ⁻¹)	26.19 b	22.88 b [†]	32.66 a	27.24	2.87
Energy value:					
Calorific value (MJ kg ⁻¹)	16.77 b	17.15 b	21.01 a	18.31	1.35
Energy production (GJ ha ⁻¹ y ⁻¹)	439.20 b	392.39 b	686.18 a	505.92	91.13
Water content (%)	7.45 a	7.58 a	7.26 a	7.43	0.09
Lignocellulosic components [‡] (%)					
Extractives compounds	11.96 bc	15.58 a	12.55 b	13.36	1.12
Holocellulose	66.31 ab	60.67 c	64.62 b	63.86	1.67
Cellulose	38.56 ab	34.93 b	35.43 ab	36.30	1.13
Hemicellulose	30.00 a	25.83 c	29.91 ab	28.58	1.37
Crude protein	5.0 a	3.27 a	3.36 a	3.87	0.56
Klason lignin	22.01 a	17.61 c	18.13 b	19.25	1.38
Acid soluble lignin	1.79 a	1.42 b	1.41 b	1.54	0.125
Acid insoluble lignin	20.21 a	16.18 c	16.77 b	17.72	1.25
Acid insoluble residue	26.44 a	22.40 c	22.99 b	23.94	1.25
Ashes	6.26 a	5.27 b	4.76 c	5.43	0.44
Bioethanol production:					
L Mg ⁻¹ DM ⁻¹	246.5 a	229.0 a	239.9 a	238.46	5.10
L ha ⁻¹ y ⁻¹	5030.4 b	4292.4 b	6858.2 a	5393.70	762.63

SE: standard error. Different letters show differences per cutting frequency (Tukey; $p \leq 0.05$). [†]Two cuttings at 150 d.

[‡]Values-based on the weight of moisture-free and extractives-free. [‡] SE: error estándar. Letras diferentes indican diferencias por frecuencia de corte (Tukey; $p \leq 0.05$). [†]Dos cortes a los 150 d. [‡]Valores basados en el peso de productos sin agua y sin extractos.

In the last decade, the United States of America and Europe showed interest in Switchgrass and Miscanthus, but their biomass yields are lower than the *Cenchrus* genus. Rocha *et al.* (2017) found yields between 11.53 and 41.37 Mg DM ha⁻¹ of *P. purpureum*. Nevertheless, the biomass yield of Maralfalfa variety and other genotypes of *Cenchrus* genus is related to production and weather conditions.

Calorific value and humidity content

The calorific value per mass unit evaluates the available energy in the biomass. High concentrations of water content in the biomass decreases the efficiency of the combustion system since most of the liberated heat is used to evaporate water. The water content was similar ($p > 0.05$) at different harvest frequencies (Table 1). The energy content was greater at the harvest frequency of 180 d (21.0 MJ kg⁻¹ DM) and different from ($p \leq 0.05$) the other CF. There was no significant difference ($p > 0.05$) between the CF at 120 d (16.7 MJ kg⁻¹ DM) and 150 d (17.1 MJ kg⁻¹ DM) (Table 1). Tumuluru (2015) reported 17.4 to 18.7 MJ kg⁻¹ DM and 17.3 to 17.8 MJ kg⁻¹ DM for Switchgrass and corn stover, respectively. Those results were similar to the value at 150 d.

The caloric values obtained in this research were higher than the reported by Mohammed *et al.* (2015) in Napier grass (*P. purpureum*), which were 18.1, 16.2, and 16.5 MJ kg⁻¹ DM in leaves, stems, and whole plant, respectively. Rocha *et al.* (2017) found values from 17.9 to 18.3 MJ kg⁻¹ DM for *P. purpureum* and the results of Marafon *et al.* (2020) research were 16.3 to 17.2 MJ kg⁻¹ DM for 16 genotypes of *C. purpureus*, similar values were obtained in this study. Other calorific values reported for hardwoods and softwoods biomass were 5.6 to 23.4 MJ kg⁻¹ DM, respectively (Nhuchhen and Salam, 2012); these values are similar to the harvest frequency at 180 d. The highest annual energy production (686.1 Gigajoules; GJ) per hectare for Maralfalfa grass was achieved with 180 d CF (two cuttings per year) (Table 1). This result was higher than the reported by Santiago *et al.* (2016) who obtained yields of 466.6 GJ ha⁻¹ y⁻¹ in Toledo grass (*Urochloa brizantha*).

Extractive compounds

Extractive compounds are natural products that surround the cell wall. They are responsible for

no hubo ($p > 0.05$) diferencia estadística (Cuadro 1). Rengsirikul *et al.* (2013) estimaron 15.4 Mg DM ha⁻¹ de biomasa para *P. purpureum* a los 240 d, un rendimiento menor al obtenido en este estudio. Todos estos pastos se consideran una buena materia prima para la producción de bioenergía, por su contenido alto de azúcares y rendimiento mayor de biomasa (Weijde *et al.*, 2013).

En la última década, Estados Unidos y Europa mostraron interés en Switchgrass y Miscanthus, pero sus rendimientos de biomasa fueron más bajos que los del género *Cenchrus*. Rocha *et al.* (2017) encontraron rendimientos entre 11.53 y 41.37 Mg DM ha⁻¹ de *P. purpureum*. Sin embargo, el rendimiento de biomasa de la variedad Maralfalfa y otros genotipos del género *Cenchrus* se relaciona con la producción y las condiciones climáticas.

Valor calorífico y contenido de humedad.

El valor calorífico por unidad de masa evalúa la energía disponible en la biomasa. Las concentraciones altas de contenido de agua en la biomasa disminuyen la eficiencia del sistema de combustión, ya que la mayor parte del calor liberado se utiliza para evaporar el agua. El contenido de agua fue similar ($p > 0.05$) en las frecuencias de cosecha diferentes (Cuadro 1). El contenido energético fue mayor en la frecuencia de cosecha de 180 d (21.0 MJ kg⁻¹ DM) y diferente de ($p \leq 0.05$) los otros CF. No hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la CF a los 120 d (16.7 MJ kg⁻¹ DM) y 150 d (17.1 MJ kg⁻¹ DM) (Cuadro 1). Tumuluru (2015) consignó 17.4 a 18.7 MJ kg⁻¹ DM y 17.3 a 17.8 MJ kg⁻¹ DM para Switchgrass y rastrojo de maíz, respectivamente. Esos resultados fueron similares al valor registrado a los 150 d.

Los valores calóricos obtenidos en esta investigación fueron superiores a los encontrados por Mohammed *et al.* (2015) en el pasto Napier (*P. purpureum*), 18.1, 16.2 y 16.5 MJ kg⁻¹ DM en hojas, tallos y planta entera, respectivamente. Rocha *et al.* (2017) encontraron valores de 17.9 a 18.3 MJ kg⁻¹ DM en *P. purpureum* y los resultados del estudio de Marafon *et al.* (2020) fueron 16.3 a 17.2 MJ kg⁻¹ DM para 16 genotipos de *C. purpureus*; valores similares se obtuvieron en este estudio. Algunos valores caloríficos reportados para la biomasa de coníferas y latifoliadas fueron de 5.6 a 23.4 MJ kg⁻¹ DM, respectivamente (Nhuchhen y Salam, 2012); estos valores son similares a la frecuencia de cosecha a los 180 d. La pro-

color, odor, and wilt resistance in plants. Before characterizing the lignocellulosic biomass, it is necessary to remove these compounds to avoid interference with others analytical determinations. They are easily eliminated with inert solvents like acetone, a benzene-ethanol solution, cold water, and ether. In this study, the highest extractives compounds content was at the CF of 150 d (15.5%), which was different from ($p \leq 0.05$) and greater than the other harvest frequencies with 11.9 and 12.5% at 120 and 180 d after sowing, respectively (Table 1). In other studies, the values reported were 11.8 and 12.3% for Toledo grass (*U. brizantha*), and Napier grass (*P. purpureum*), respectively (Mohammed *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2016). The mean in this study was higher than the reported by Santiago *et al.* (2016).

Holocellulose

The holocellulose is the combination of cellulose and hemicellulose and the Gramineae species contain between 68 to 73% (Santiago *et al.*, 2016). The holocellulose concentration in this research showed differences ($p \leq 0.05$) regarding CF (Table 1), the values were between 60.6 and 66.3% (150 and 120 d). In other studies, Rengsirikul *et al.* (2013) reported 67.4% holocellulose for Taiwan grass (*P. purpureum*), similar value to the 120 d of CF. However, the holocellulose concentration obtained in this study was lower than the one estimated by Rocha *et al.* (2017) for *C. purpureus* (67.4 - 69.7%). Santiago *et al.* (2016) measured 73.6% de holocellulose at CF of 180 d in Toledo grass, which was higher than the value obtained at 120 d frequency (66.3%). Other holocellulose values in C4 gramineae were: 62.4% (*P. purpureum* cv. Napier) (Mohammed *et al.*, 2015) and 67.8% (*Megathyrsus maximus*) (Lima *et al.*, 2014).

Cellulose

The highest cellulose content was found at the CF of 120 d (38.5%), although the difference was not significant ($p > 0.05$) from the others CF (Table 1). In other studies the cellulose content of C4 grasses was determined for bioenergetic purposes, for instance Napier grass (*P. purpureum*) 36.3%; *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* 34.5% and 45.3%, respectively; Toledo (*U. brizantha*) 42.1%; *P. purpureum* 40.2 to 42.6%; *C. purpureus* 36% (Mohammed *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2016;

ducción anual mayor de energía (686.1 Gigajulios; GJ) por hectárea para el pasto Maralfalfa se logró con CF a 180 d (dos cortes por año) (Cuadro 1). Este resultado fue superior al de Santiago *et al.* (2016), quienes obtuvieron rendimientos de 466.6 GJ ha⁻¹ y⁻¹ en pasto Toledo (*Urochloa brizantha*).

Compuestos extractivos

Los compuestos extractivos son productos naturales que rodean la pared celular. Y son responsables del color, el olor y la resistencia al marchitamiento en las plantas. Antes de caracterizar la biomasa lignocelulósica es necesario eliminar estos compuestos para evitar interferencias con otras determinaciones analíticas. Estos compuestos se eliminan fácilmente con solventes inertes como la acetona, una solución de benceno-etanol, agua fría y éter. En este estudio, el contenido mayor de compuestos extractivos estuvo en el CF de 150 d (15.5%), el cual fue diferente de ($p \leq 0.05$) y mayor que las otras frecuencias de cosecha con 11.9 y 12.5% a los 120 y 180 d después de la siembra, respectivamente (Cuadro 1). En otros estudios, los valores calculados fueron 11.8 y 12.3% en pasto Toledo (*U. brizantha*) y pasto Napier (*P. purpureum*), respectivamente (Mohammed *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2016). La media de este estudio fue superior a la obtenida por Santiago *et al.* (2016).

Holocelulosa

La holocelulosa es la combinación de celulosa y hemicelulosa y las especies de Gramineae contienen entre 68 a 73% (Santiago *et al.*, 2016). La concentración de holocelulosa en esta investigación mostró diferencias ($p \leq 0.05$) respecto a la CF (Cuadro 1); los valores estuvieron entre 60.6 y 66.3% (150 y 120 d). En otros estudios, Rengsirikul *et al.* (2013) determinaron 67.4% de holocelulosa en el pasto Taiwan (*P. purpureum*), valor similar a los 120 d de CF. Sin embargo, la concentración de holocelulosa obtenida en este estudio fue menor que la calculada por Rocha *et al.* (2017) para *C. purpureus* (67.4 - 69.7%). Santiago *et al.* (2016) encontraron 73.6% de holocelulosa a CF de 180 d en pasto Toledo, el cual fue superior al valor obtenido en la frecuencia de 120 d (66.3%). Los valores de holocelulosa obtenidos en otras gramineas C4 fueron: 62.4% (*P. purpureum* cv. Napier) (Mohammed *et al.*, 2015) y 67.8% (*Megathyrsus maximus*) (Lima *et al.*, 2014).

Rocha *et al.*, 2017; Marafon *et al.*, 2020). The chemical composition of the plants is variable and related with the species. Moreover, the phenological state is modified by the climate conditions and the planting season. The mean of cellulose concentration in this study was 36.3%, which is similar to the values reported by Mohammed *et al.* (2015), and Marafon *et al.* (2020). However, the cellulose amount in these grasses were lower than the concentration reported by Lima *et al.* (2014), and Santiago *et al.* (2016) in grasses of the *Urochloa* genus.

Hemicelluloses

Hemicelluloses constitute 21 to 50% of the biomass in Gramineae species (Mohammed *et al.*, 2015). These polymers are mostly made up of pentoses and hexoses that can be hydrolyzed into simple sugars like xylose, arabinose, galactose, glucose, and mannose. The highest hemicelluloses concentration was found at 120 d of CF (30.0%). It was statistically different ($p \leq 0.05$) and higher than the 150 d of CF (25.8%), which was the lowest hemicellulose concentration (Table 1). In tropical grasses, other hemicellulose concentration values were 19.6 to 36% (Rengsirikul *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2017; Marafon *et al.*, 2020). In our study, the mean of hemicellulose concentration was 28.5%, which is similar to that 28% reported by Lima *et al.* (2014) in *Panicum maximum*.

Crude protein

It is necessary to evaluate the protein content since high values of this compound limit the bioconversion of sugars into bioethanol. Crude protein forms bonds with ferulic acid and increases the resistance and insolubility of the whole structure. In our study, the highest CP concentration was 5.0% at 120 d, which was not different ($p > 0.05$) from the other cutting frequencies; however, there was a concentration decrease from 5.0 to 3.2% at 120 and 150 d of CF, respectively (Table 1).

The CP content in this study was lower than others previously reported. Some studies on tropical grasses showed that the CP concentration decreased as the cutting frequency increased. For example, Santiago *et al.* (2016) respectively reported 8.2, 4.8

Celulosa

El contenido mayor de celulosa se encontró en la CF a 120 d (38.5%), aunque la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$) de las otras CF (Cuadro 1). En otros estudios, el contenido de celulosa de las gramíneas C4 se determinó con fines bioenergéticos, por ejemplo, pasto Napier (*P. purpureum*) 36.3%; *Brachiaria ruziziensis* y *B. brizantha* 34.5% y 45.3%, respectivamente; Toledo (*U. brizantha*) 42.1%; *P. purpureum* de 40.2 a 42.6%; *C. purpureus* 36% (Mohammed *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2017; Marafon *et al.*, 2020). La composición química de las plantas es variable y relacionada con la especie. Además, el estado fenológico se ve modificado por las condiciones climáticas y la época de siembra. La media de concentración de celulosa en este estudio fue de 36.3%, lo cual es similar a los valores calculados por Mohammed *et al.* (2015) y Marafon *et al.* (2020). Sin embargo, la cantidad de celulosa en estos pastos fue menor que la concentración obtenida por Lima *et al.* (2014) y Santiago *et al.* (2016) en gramíneas del género *Urochloa*.

Hemicelulosas

Las hemicelulosas constituyen del 21 al 50% de la biomasa en las especies de gramíneas (Mohammed *et al.*, 2015). Estos polímeros se componen principalmente de pentosas y hexosas que pueden hidrolizarse en azúcares simples como xilosa, arabinosa, galactosa, glucosa y manosa. La concentración más alta de hemicelulosas se encontró a CF 120 d (30.0%); mostró diferencia estadística ($p \leq 0.05$) y fue mayor que la obtenida en CF 150 d (25.8%), en dicha CF la concentración de hemicelulosa fue menor (Cuadro 1). En gramíneas tropicales, otros valores de concentración de hemicelulosa fueron de 19.6 a 36% (Rengsirikul *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2017; Marafon *et al.*, 2020). En nuestro estudio, la concentración media de hemicelulosa fue 28.5%, similar al 28% documentado por Lima *et al.* (2014) en *Panicum maximum*.

Proteína cruda

El contenido de proteína se debe evaluar porque valores altos de este compuesto limitan la biocon-

and 2.4% at 30, 60 and 150 d. In our study, the mean of CP concentration was 3.8%, which is lower than the average of values reported by Santiago *et al.* (2016).

Klason lignin, acid soluble lignin, acid insoluble lignin, and acid insoluble residue

The differences in lignin concentration were significant ($p \leq 0.05$) for all CF (Table 1). The highest Klason lignin content was obtained at the 120 d CF (22.2%), followed by 18.1 and 17.6%, at 180 and 150 d CF. Some studies reported lignin concentration of 22.8 and 24.3% for *P. purpureum* and 28% for *Miscanthus* sp, (Zhang *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2015). The harvest frequency of 120 d showed a higher content ($p \leq 0.05$) of acid soluble lignin (1.79%) and acid insoluble lignin (20.2%) than the other harvest frequencies (Table 1).

In a study on Marafalfa grass, Mateus *et al.* (2012) reported 0.13% acid soluble lignin and 16.3% acid insoluble lignin and these results are lower than those found in our study. The lignin content depends on physical maturity and is correlated with harvest frequency and phenological state of the plant. The acid insoluble residue was different ($p \leq 0.05$) and greater at 120 d CF (26.4%) than at 150 and 180 d, which respectively showed 22.4 and 22.9% content.

Ashes

The ash content decreased with grass maturity and changed ($p \leq 0.05$) between cutting frequencies (Table 1). The maximum content (6.2%) was found at the frequency 120 d, while the lower contents (5.2 and 4.7%) corresponded to 150 and 180 d CF. Ash content is variable: 6.06 to 8.34% for *P. purpureum* (Rocha *et al.*, 2017); 2.21 to 6.71% for 16 genotypes of *C. purpureus* (Marafon *et al.*, 2020); 2.5% for Marafalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*); 3.8% and 8.9% for Switchgrass (Mateus *et al.*, 2012; Nhuchhen and Salam, 2012).

The average ash content in our study was 5.4%, lower than (6.8%) reported by Rocha *et al.* (2017), and Nhuchhen and Salam (2012); but higher than (4.8%) the value reported by Marafon *et al.* (2020). The content of inorganic material depends on the species, growth conditions and cutting age, and it is higher at the earlier stages of cultivation (Rengsirikul *et al.*, 2013). Ashes (ash, silica, and potassium) reduces

versión de azúcares en bioetanol. La proteína forma enlaces con el ácido ferúlico y aumenta la resistencia e insolubilidad de toda la estructura. En nuestro estudio, la concentración más alta de CP fue de 5.0% a los 120 d, que no fue diferente ($p > 0.05$) de las otras frecuencias de corte; sin embargo, hubo una disminución de la concentración de 5.0 a 3.2% a los 120 y 150 d de CF, respectivamente (Cuadro 1).

El contenido de CP en este estudio fue menor que otros valores documentados en estudios previos. Algunos estudios sobre pastos tropicales mostraron que la concentración de CP disminuía a medida que aumentaba la frecuencia de corte. Por ejemplo, Santiago *et al.* (2016) calcularon respectivamente 8.2, 4.8 y 2.4% a los 30, 60 y 150 d. En nuestro estudio, la media de concentración de CP fue de 3.8%, valor que es menor que el valor medio registrado por Santiago *et al.* (2016).

Lignina Klason, lignina soluble en ácido, lignina insoluble en ácido y residuo insoluble en ácido

Las diferencias en la concentración de lignina fueron significativas ($p \leq 0.05$) para todos los CF (Cuadro 1). El contenido mayor de lignina de Klason se obtuvo a los 120 d CF (22.2%), seguido por 18.1 y 17.6%, a 180 y 150 d CF. Algunos estudios consignaron concentración de lignina de 22.8 y 24.3% en *P. purpureum* y 28% en *Miscanthus* sp, (Zhang *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2015). La frecuencia de cosecha de 120 d mostró un contenido mayor ($p \leq 0.05$) de lignina soluble en ácido (1.79%) y lignina insoluble en ácido (20.2%) que las otras frecuencias de cosecha (Cuadro 1).

En un estudio sobre pasto Marafalfa, Mateus *et al.* (2012) determinaron 0.13% de lignina soluble en ácido y 16.3% de lignina insoluble en ácido, resultados que son más bajos que los encontrados en nuestro estudio. El contenido de lignina depende de la madurez física y se correlaciona con la frecuencia de cosecha y el estado fenológico de la planta. El residuo insoluble en ácido fue diferente ($p \leq 0.05$) y mayor a los 120 d CF (26.4%) que en los 150 y 180 d, los cuales mostraron respectivamente un contenido de 22.4 y 22.9%.

Cenizas

El contenido de ceniza disminuyó con la madurez del pasto y cambió ($p \leq 0.05$) entre las frecuencias de

the energetic value of the feedstock (Nhuchhen and Salam, 2012).

Theoretical bioethanol yield

Based on the saccharification and fermentation of sugars, the theoretical maximum yield of bioethanol is 0.51 kg and 0.49 kg carbon dioxide per kg of glucose or xylose (Badger, 2002; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012). In order to obtain bioethanol, yeasts are used as the fermentation agent. One of the most used yeasts is *Saccharomyces cerevisiae*, which transforms sugars from biomass or lignocellulosic residues into ethanol. However, native *S. cerevisiae* does not metabolize 5-carbon sugars like xylose. Moreover, to achieve an economically feasible ethanol production process, it is necessary to have a microorganism that metabolizes carbohydrates from the pentose family (Barrera *et al.* 2016). Therefore, it is not possible to reach a 100% transformation of sugars.

Based on the formulas proposed by Badger (2002) and Dien (2010), the highest theoretical bioethanol yield was 246.5 L Mg⁻¹ DM⁻¹ at 120 d, which was similar ($p > 0.05$) to the yields at 180 (239.9 L Mg⁻¹ DM⁻¹) and at 150 d (229 L Mg⁻¹ DM⁻¹) (Table 1). The annual bioethanol yield is directly related with the production of harvested biomass, and in our study, the highest yield ($p \leq 0.05$) was found at 180 d (6858.2 L ha⁻¹ y⁻¹), which was 60 and 36% higher than the yields at 150 and 120 d CF.

In other studies with C4 grasses for bioenergetic purposes, estimated yields were respectively 6231, 6922, 7865, 6718 and 6331 L ha⁻¹ y⁻¹ for *Brachiaria brizanta*, *B. ruziziensis*, *Urochloa brizanta*, *Panicum maximum* and *P. purpureum* (Lima *et al.*, 2014; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2016; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012). While the highest bioethanol yield in our study was 6858.2 L ha⁻¹ y⁻¹, with a mean of 5393 L ha⁻¹ y⁻¹. Thus, these values are similar to those results obtained in other studies with tropical grasses.

CONCLUSIONS

Maralfalfa grass biomass which provided the best substrate, glucose, and xylose per area unit for bioethanol production and combustion capacity was obtained at 180 d of cutting frequency. In earlier ages, the plants contained greater proportions of crude protein, inorganic elements, water content,

corte (Cuadro 1). El contenido máximo (6.2%) se encontró en la frecuencia de 120 d, mientras que los contenidos menores (5.2 y 4.7%) correspondieron a 150 y 180 d CF. El contenido de cenizas es variable: 6.06 a 8.34% en *P. purpureum* (Rocha *et al.*, 2017); 2.21 a 6.71% en 16 genotipos de *C. purpureus* (Marafon *et al.*, 2020); 2.5% en Maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*); o 3.8% y 8.9% en Switchgrass (Mateus *et al.*, 2012; Nhuchhen y Salam, 2012).

El contenido medio de cenizas en nuestro estudio fue del 5.4%, inferior al (6,8%) informado por Rocha *et al.* (2017) y Nhuchhen y Salam (2012); pero superior al (4.8%) informado por Marafon *et al.* (2020). El contenido de material inorgánico depende de la especie, las condiciones de crecimiento y la edad de corte, y es mayor en las primeras etapas del cultivo (Rengsirikul *et al.*, 2013). Las cenizas (cenizas, sílice y potasio) reducen el valor energético de la materia prima (Nhuchhen y Salam, 2012).

Rendimiento teórico de bioetanol

Con base en la sacarificación y fermentación de azúcares, el rendimiento máximo teórico de bioetanol es de 0.51 kg y 0.49 kg de dióxido de carbono por kg de glucosa o xilosa (Badger, 2002; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012) Para obtener bioetanol, se utilizan levaduras como agente de fermentación. Una de las levaduras más utilizadas es *Saccharomyces cerevisiae*, que transforma azúcares de biomasa o residuos lignocelulósicos en etanol. Sin embargo, la *S. cerevisiae* nativa no metaboliza azúcares de 5 carbonos como la xilosa. Además, para lograr un proceso de producción de etanol económicamente factible, es necesario contar con un microorganismo que metabolice los carbohidratos de la familia de las pentosas (Barrera *et al.* 2016). Por lo tanto, no es posible alcanzar el 100% de transformación de los azúcares.

Con base en las fórmulas propuestas por Badger (2002) y Dien (2010), el rendimiento teórico de bioetanol mayor fue 246.5 L Mg⁻¹ DM⁻¹ a los 120 d, que fue similar ($p > 0.05$) a los rendimientos a 180 (239.9 L Mg⁻¹ DM⁻¹) y 150 d (229 L Mg⁻¹ DM⁻¹) (Cuadro 1). El rendimiento anual de bioetanol se relaciona en manera directa con la producción de biomasa cosechada, y en nuestro estudio, el rendimiento mayor ($p \leq 0.05$) se encontró a los 180 d (6858.2 L ha⁻¹ y⁻¹), el cual fue 60 y 36% mayor que los rendimientos a 150 y 120 d CF.

and fixed carbon. All these compounds decreased as the phenological stage of the plants increased.}

The theoretical bioethanol yield indicated that Maralfalfa grass would be a suitable option for biofuel production. But in order to achieve this, a microorganism capable of metabolizing 5-carbon carbohydrates should be obtained. Biomass yield and chemical composition of Maralfalfa grass were the better features as a potential alternative to obtain bioethanol in tropical areas.

LITERATURE CITED

- ASTM (American Society for Testing and Materials). 2012. Biological effects and environmental fate; biotechnology. In: Annual Book of ASTM Standards. Vol. 11.06. ASTM International (ed), West Conshohocken, PA, USA. 1461 p.
- Badger, P. C. 2002. Ethanol from cellulose: a general review. Trends in new crops and new uses. 1: 17-21.
- Barrera, I., Amezcua, M., Estupiñán, L., T. Martínez, and J. Aburto. 2016. Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocellulosic residues in Mexico: Case of sugarcane and Blue Agave bagasses. Chem. Eng. Res. Design. 107: 91-101.
- Brown, A., L. Waldheim, I. Landälv, J. Saddler, M. Ebadian, J. D. McMillan, A. Bonomi, and B. Klein. 2020. Advanced Biofuels – Potential for Cost Reduction. Bioenergy Technology Cooperation Programme, Task 41. IEA Bioenergy. 87 p.
- Dien, B. S. 2010. Mass balances and analytical methods for biomass pre-treatment experiments. In: Vertès, A. A., N. Qureshi, H. Blaschek, and H. Yukawa (eds). Biomass to biofuels: strategies for global industries. Wiley, Chichester, United Kingdom. pp: 213-231.
- Lima, M. A., Gomez, D. L., Steele-King, G. C., Simister, R., Bernardinelli, D., Carvalho, M. A., Rezende, A. C., Labate, C. A., R de Azevedo, E., S. J. McQueen-Mason, and I. Polikarpov. 2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. Biotechnol. biofuels. 7: 1-19.
- Mateus, L., O. Hernández, M. Velázquez, and J. De J. Díaz. 2012. Dilute sulfuric acid pretreatment of goliath grass (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) for ethanol cellulosic. Rev. Colomb. Biotechnol. 14: 146-156.
- Marafon, A. C. C., A. F. Amaral, C. Machado, J. Carneiro, N. A. Bierhals, and V. S. Guimaraes. 2020. Elephant grass biomass attributes for bioenergetic applications compared to other feedstocks. SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3598084> (Retrieved: September 2020).
- Mohammed, Y. I., A. Y. Abakr, K. F. Kazi, S. Yusup, I. Alshareef, and A. S. Chin. 2015. Comprehensive characterization of napier grass as a feedstock for thermochemical conversion. Energies. 8: 3403 – 3417.
- Nhuchhen, D. R., and P. A. Salam. 2012. Estimation of higher heating value of biomass from proximate analysis: A new approach. Fuel. 99:55-63.

En otros estudios con gramíneas C4 para fines bioenergéticos, los rendimientos estimados fueron respectivamente 6231, 6922, 7865, 6718 y 6331 L ha⁻¹ y⁻¹ para *Brachiaria brizanta*, *B. ruziziensis*, *Urochloa brizanta*, *Panicum maximum* y *P. purpureum* (Lima *et al.*, 2014; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2016; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012). Mientras que el mayor rendimiento de bioetanol en nuestro estudio fue de 6858.2 L ha⁻¹ y⁻¹, con promedio de 5393 L ha⁻¹ y⁻¹. De modo que dichos valores son similares a los resultados obtenidos en otros estudios con gramíneas tropicales.

CONCLUSIONES

La biomasa de pasto Maralfalfa que proporcionó el mejor sustrato, glucosa y xilosa por unidad de área para la producción de bioetanol y la capacidad de combustión se obtuvo a los 180 d de frecuencia de corte. En edades anteriores, las plantas contenían proporciones mayores de proteína cruda, elementos inorgánicos, contenido de agua y carbono fijado. Todos estos compuestos disminuyeron a medida que aumentaba la etapa fenológica de las plantas.

El rendimiento teórico de bioetanol indicó que el pasto Maralfalfa puede ser una opción adecuada para la producción de biocombustible. Pero para lograr esto, se debería obtener un microorganismo capaz de metabolizar penta carbohidratos (5-carbono). El rendimiento de biomasa y la composición química del pasto Maralfalfa fueron las cualidades mejores como alternativa potencial para la obtención de bioetanol en áreas tropicales.

—Fin de la versión en Español—



OECD/FAO (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos/ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2019. OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Italy. 321 p. DOI: 10.1787/agr_outlook-2019-en

- Rengsirikul, K., Ishii, Y., Kangvansaichol, K., Prapa, S., Punsuvon, V., Vaithanomsat, P., G. Nakamane, and T. Sayan T. 2013. Biomass yield, chemical composition and potential ethanol yields of 8 cultivars of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) harvested 3-monthly in central Thailand. *J. Sustain. Bioenergy Syst.* 3:107-112.
- RFA (Renewable Fuels Association). 2019. 2019 Ethanol Industry Outlook. Renewable Fuels Association. USA, p: 32. <https://ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2019/02/RFA2019Outlook.pdf>. (Retrieved: June 2020).
- Rocha, J. R. A., S. C. Machado, J. C., Carneiro, S. P. C., Carneiro, C. J., Resende, V. M. D., S. F. J. Ledo, and S. J. E. Carneiro. 2017. Bioenergetic potential and genetic diversity of elephant grass via morpho-agronomic and biomass quality traits. *Ind. Crops Prod.* 95: 485 – 492.
- Santiago, O. M., A. Honorato S. J., A. Quero C., R. Hernández G. A., C. C. López, and G. I. López. 2016. Biomasa de *U. brizantha* cv. Toledo como materia prima para la producción de bioetanol. *Agrociencia.* 50: 711-726.
- SAS Institute, Inc. 2011. Statistical Analysis System. SAS/STAT v.9.0. User's Guide. Cary, N. C. USA. 5136 p.
- Tumuluru, S. J. 2015. Comparison of chemical composition and energy property of torrefied Switchgrass and corn stover. *Front. Energy Res.* 3:1-11.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., J. Sluiter, and D. Crocker. 2012. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, Colorado USA. 17 p.
- Weijde, T. V. D., Alvim Kamei, C. L., Torres, A. F., Vermerris, W., Dolstra, O., R. G. F. Visser, and L. M. Trindade. 2013. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. *Plant Sci. J.* 4: 1-18.
- Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V., Inochanon, R., Winayanuwattikun, P., T. Yongvanich, and W. Chulalaksananukul. 2012. The potential of cellulosic ethanol production from grasses in Thailand. *J. Biomed. Biotech.* 2012: 1-10.
- Zhang, T., C. Wyman, K. Jakob, and B. Yang. 2012. Rapid selection and identification of *Miscanthus* genotypes with enhanced glucan and xylan yields from hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Biofuels* 5:1-14.

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL Y TÉRMICO EN HARINAS DE PRODUCTOS RESIDUALES DE NOPAL (*Opuntia ficus-indica*) PARA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS POLIMÉRICOS BIOBASADOS

CHEMICAL PROXIMATE AND THERMAL ANALYSES ON FLOUR FROM RESIDUAL PRODUCTS OF PEAR-CACTUS (*Opuntia ficus-indica*) TOWARDS OBTAINING BIOBASED POLYMERIC COMPOUNDS

Selene Carmen Haide **Rives-Castillo**^{1*}, Zormy Nacary **Correa-Pacheco**², Silvia **Bautista-Baños**¹, Rosa Isela **Ventura-Aguilar**², Beatriz Sofía **Schettino-Bermudez**³, Pedro **Ortega-Gudiño**⁴, Alfonso **Barajas-Cervantes**⁵

¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, km 6, calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, Morelos, 6231, México. (riveselene@gmail.com). ²CONACYT-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, km 6, calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, Morelos, 62731, México. ³Universidad Autónoma Metropolitana Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán, 04960, Ciudad de México, México. ⁴Departamento de Ingeniería Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Gral. Marcelino García Barragán #1451, Guadalajara, Jalisco 44430, México. ⁵InMateriis, Lerdo de Tejada #2334 Colonia Americana Guadalajara, Jalisco, 44160, México.

RESUMEN

Una gran cantidad de desechos se genera por la remoción de espinas en el nopal verdura con un alto contenido de fibra. Estos subproductos agrícolas son fuentes de celulosa, lignina y hemicelulosa, con potencial de uso como biomateriales en producción sustentable. Con el propósito de contribuir a la solución de un problema ambiental por el uso de plásticos convencionales, bajo la premisa de que la incorporación de harina de nopal podría integrarse a un compuesto bio polimérico para mejorar desempeño y propiedades finales como biomaterial; el objetivo de esta investigación fue realizar análisis químico proximal (AQP) y análisis térmico en harinas de subproductos de nopal del estado de Morelos, México en tres periodos de cosecha, para verificar características útiles con vistas a su adición a materiales poliméricos para envases biodegradables. En el AQP se evaluó la humedad, proteína cruda, cenizas, grasa, fibra cruda, fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN), extracto libre de nitrógeno (ELN), celulosa, hemicelulosa y lignina. Para evaluar propiedades térmicas se realizó análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). El diseño experimental fue completamente al azar, se realizó un ANDEVA con un

ABSTRACT

There is a large amount of waste generated by the removal of thorns from the pear-cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill.) cladodes with a high fibre content. These agricultural by-products are sources of cellulose, lignin and hemicellulose, with potential for use as biomaterials in sustainable production. Aiming to contribute towards solving an environmental problem due to the use of conventional plastics, and under the premise that pear-cactus flour would be added as a biopolymeric compound to improve performance and final properties of polymers; the objective of this research was to perform proximate chemical analysis (AQP) and thermal analysis on pear-cactus cladodes flour from the state of Morelos, Mexico in three harvest periods, to verify their useful characteristics towards being added into polymers to produce biodegradable packaging. Water content, crude protein, ash, fat, crude fibre, acidic detergent fibre (FDA), neutral detergent fibre (FDN), nitrogen-free extract (ELN), cellulose, hemicellulose and lignin were evaluated in the AQP. To evaluate thermal properties, thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) were performed. The experimental design was completely randomized; an ANOVA was performed with a factorial data arrangement and Tukey's mean comparison test. The AQP in the flours showed significant differences ($p \leq 0.05$) in ashes, crude fibre, neutral detergent fibre, cellulose, hemicellulose and lignin. The pear-cactus flours were similar in the three months of sampling and had a similar thermal profile in

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2093-9096>.

Recibido: abril, 2021. Aprobado: julio, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 403-416. 2021.

arreglo de datos factorial y prueba de comparación de medias de Tukey. El AQP en las harinas mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en cenizas, fibra cruda, fibra detergente neutra, celulosa, hemicelulosa y lignina. Las harinas de nopal fueron similares en los tres meses de muestreo y tuvieron perfil térmico similar en TGA y DSC. T_g se obtuvo entre 46-48 °C, T_m entre 32-130 °C y temperatura de descomposición final a 455 °C. Las pruebas térmicas indicaron que la harina de nopal puede adicionarse a matrices poliméricas sin que ocurra descomposición en su uso como material bio-basado, esto es, un polímero derivado de materiales biológicos.

Palabras clave: *Opuntia ficus - indica*, harina de nopal, subproducto, análisis termogravimétrico, calorimetría diferencial de barrido.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad toma importancia la búsqueda de materiales de fuentes naturales, ecológicos, renovables y sustentables, como algunos productos y subproductos que genera la agroindustria. El nopal (*Opuntia ficus - indica*) es un cultivo endémico de América, con uso amplio como producto agroindustrial. El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera registró que el estado de Morelos produjo 392 466.06 Mg de nopal⁶, principalmente en cuatro municipios: Tepoztlán, Tlalnepantla, Tlayacapan y Totolapan. Marín-Bustamante *et al.* (2018) evaluaron una producción anual de cerca de 40 000 Mg de desechos del nopal.

A pesar de que los materiales lignocelulósicos residuales son los más apreciados por su potencial alto para la obtención de celulosa sin daño a los ecosistemas forestales, existen pocos estudios específicos sobre su uso. Colín-Chávez *et al.* (2021) indicaron la posibilidad de utilizar desechos o subproductos de nopal, desarrollaron un material con residuos de cladodios para su uso como papel de embalaje. El interés creciente por lograr productos biodegradables ha llevado al desarrollo de compuestos a partir de biomateriales derivados de fuentes celulósicas diversas. Estos materiales resultan útiles como propuestas sustentables para resolver problemas ambientales como el uso indiscriminado de plásticos en la industria agrícola.

TGA and DSC. T_g was obtained between 46-48 °C, T_m between 32-130 °C, and the final decomposition temperature at 455 °C. Thermal tests indicated that pear-cactus flour can be added to polymeric matrices without decomposition occurring when used as a bio-based material, that is, a polymer derived from biological materials.

Keywords: *Opuntia ficus - indica*, pear-cactus flour, by-product, thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry.

INTRODUCTION

Nowadays, the search for materials from natural sources, ecological, renewable and sustainable, such as some products and by-products generated by agribusiness, becomes important. Pear-cactus (*Opuntia ficus - indica*) is an endemic crop in America, widely used as an agronomic and industrial product. The Mexican Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera recorded that the state of Morelos produced 392 466.06 Mg of pear-cactus cladodes⁶, mainly in four municipalities: Tepoztlán, Tlalnepantla, Tlayacapan and Totolapan. Marín-Bustamante *et al.* (2018) evaluated an annual production of some 40 000 Mg of pear-cactus waste.

Despite the fact that waste lignocellulosic materials are the most appreciated for their high potential to obtain cellulose without damaging forest ecosystems, there are few specific reports on their uses. Colín-Chávez *et al.* (2021) indicated the possibility of using waste or by-products of pear-cactus; they developed a material with cladode residues for use as packaging paper. The growing interest in achieving biodegradable products has led to the development of compounds from biomaterials derived from various cellulosic sources. These materials are useful as sustainable proposals to solve environmental problems, such as the indiscriminate use of plastics in the agricultural industry.

The pear-cactus tissues have a high fibre content, according to Hernández-Urbiola *et al.* (2011), who documented 13.26% of total fibre on a dry basis; while the crude fibre values refer to the total content of digestible and indigestible carbohydrates. On the other hand, Greco *et al.* (2013) indicated that in the

⁶SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) 2019. Atlas Agroalimentario. <https://www.gob.mx/siap> (Consultado: mayo 2020).

Los tejidos del nopal tienen contenido de fibra alto, de acuerdo con Hernández-Urbiola *et al.* (2011) quienes documentaron 13.26% de fibra total en base seca. Mientras los valores de fibra cruda hacen referencia al contenido total de carbohidratos digeribles y no digeribles. Por otra parte, Greco *et al.* (2013) indicó que en la composición química del nopal existe una gran cantidad de minerales (19.6% en peso), un contenido muy alto de polisacáridos (70%), incluida la celulosa (21.6% en peso) y un contenido de lignina bajo (3.6% en peso). De acuerdo con Hernández-Urbiola *et al.* (2011) los tejidos de subproductos de nopal son ricos en pectina, celulosa y agua mientras que las espinas están constituidas de lignina y celulosa.

Los polisacáridos se estudian por su disposición vasta y su potencial de aplicación como biomateriales sustentables, biodegradables y recursos renovables. Por tal motivo, la caracterización de las propiedades químicas y térmicas de harinas de nopal es necesaria para determinar su utilidad como material biodegradable o como refuerzo para biopolímeros. Entonces, bajo la premisa de que la incorporación de harina de nopal podría integrarse a un compuesto bio polimérico para mejorar desempeño y propiedades finales como biomaterial; el objetivo de esta investigación fue realizar análisis químico proximal (AQP) y análisis térmico en harinas de subproductos de nopal del estado de Morelos, México en tres periodos de cosecha, para verificar características útiles con vistas a su adición a materiales poliméricos para envases biodegradables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los nopales variedad Milpa Alta se colectaron en el municipio de Tlalnepantla, Morelos, donde se producen con un manejo convencional del cultivo. Cladodios de desecho se seleccionaron por su tamaño (25 a 35 cm) pues ya estaban dañados o tenían edad superior a los 3 meses. El peso fue osciló entre los 300 a 1000 g por cladodio. Tres muestreos se realizaron en 2019, en mayo (época seca), agosto y septiembre (época de lluvias).

Obtención de harina de nopal

De acuerdo con la metodología propuesta por Scaffaro *et al.* (2019) con modificaciones en tiempo y temperatura de secado;

chemical composition of pear-cactus tissues there is a large amount of minerals (19.6% by weight), a very high content of polysaccharides (70%), including cellulose (21.6% by weight) and a low lignin content (3.6% by weight). According to Hernández-Urbiola *et al.* (2011), the pear-cactus by-product tissues are rich in pectin, cellulose and water, while the thorns are made of lignin and cellulose.

Polysaccharides are studied for their vast availability and potential application as sustainable, biodegradable biomaterials and renewable resources. For this reason, the characterization of the chemical and thermal properties of pear-cactus flour is necessary to determine its usefulness as a biodegradable material as a reinforcement for biopolymers. Thus, under the premise that pear-cactus flour would be added as a biopolymeric compound to improve performance and final properties of polymers; the objective of this research was to perform proximate chemical analysis (AQP) and thermal analysis on pear-cactus cladodes flour from the state of Morelos, Mexico in three harvest periods to verify their useful characteristics towards being added into polymers to produce biodegradable packaging.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Pear-cactus cladodes of the Milpa Alta variety were collected in the municipality of Tlalnepantla, Morelos, where they are produced with a conventional crop management. Waste cladodes were selected for their size (25 to 35 cm) as they were already damaged or were older than 3 months. Weight ranged from 300 to 1000 g per cladode. Three samplings were carried out in 2019, in May (dry season), August and September (rainy season).

Obtaining pear-cactus flour

According to the methodology proposed by Scaffaro *et al.* (2019), with modifications in drying time and temperature, each cladode was rinsed with tap water to remove soil debris, then cut into prisms of approximately 2 cm in length. They were spread on an aluminum tray and dried in a drying oven (Binder® FD23ULE2, Germany) at constant temperature, 60 °C for 24 h to avoid thermal degradation of the components. Once the sample was dry, it was ground with a blender (Osterizer® 465-43, Mexico) for 1 min. Afterwards, the particle size of the flour obtained was homogenized with a Num. 50 sieve mesh (100 μ m sieve size).

cada claddio se enjuagó con agua potable para eliminar restos de suelo, luego se cortaron en prismas de 2 cm de longitud aproximada. Los cortes se extendieron sobre una charola de aluminio y se secaron en horno de secado (Binder® FD23ULE2, Alemania) a temperatura constante, 60 °C durante 24 h para evitar la degradación térmica de los componentes. Una vez seca la muestra, se molió con una licuadora (Osterizer® 465-43, México) durante 1 min. Después, se homogenizó el tamaño de partícula de la harina obtenida con un tamiz de malla No. 50 (100 µm). Las harinas se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas plásticas selladas y etiquetadas con peso, temperatura, día de muestreo y tipo de harina.

Análisis Químico Proximal

El análisis químico proximal se realizó en la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco, con los métodos propuestos por AOAC (2000). El contenido de humedad se determinó por diferencia entre el peso del material fresco y el peso constante de la muestra en un horno de secado (Riossa® H-82, México). La ceniza total se determinó al incinerar muestra en una mufla (FELISA®FE-360, México) a 500 °C. El contenido de grasa cruda se determinó por extracción etérea libre de nitrógeno en el equipo (Labconco®, E.U.A.). La determinación de proteína cruda se realizó con micro Kjeldahl (FOSS® Tecator™, Dinamarca). La fibra cruda se evaluó por el método Weende modificado a partir de AOAC (2000). Los análisis de fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN), celulosa, hemicelulosa y lignina se determinaron según el método clásico de Van Soest (AOAC, 2000). El extracto libre de nitrógeno (ELN), se determinó como la diferencia de la suma de todas las composiciones con el 100%. Todos los análisis se realizaron por triplicado con cada una de las harinas obtenidas durante los muestreos.

Análisis térmicos

Análisis termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La determinación de las propiedades térmicas se realizó en la empresa In Materiis, localizada en Guadalajara, Jalisco; se llevó a cabo en un analizador STA-PT – 1600 (LINSEIS®, Alemania) que realiza análisis simultáneos de TGA y DSC. Las muestras se sometieron a un programa controlado de temperatura para determinar el porcentaje de pérdida de peso por descomposición, deshidratación y otros componentes, así como para determinar sus transiciones térmicas. La rampa de calentamiento fue de 20 a 500 °C con una velocidad de 10 °C por min en atmósfera inerte de nitrógeno a 8 L h⁻¹, de acuerdo con López-García *et al.*

The flours were stored at room temperature in sealed and labelled plastic bags specifying weight, temperature, sampling day and type of flour.

Proximate Chemical Analysis

The proximate chemical analysis was carried out at the Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco, with the methods proposed by AOAC (2000). Water content was determined by the difference between the weight of the fresh material and the constant weight of the sample in a drying oven (Riossa® H-82, Mexico). Total ash was determined by incinerating the sample in a muffle (FELISA®FE-360, Mexico) at 500 °C. The crude fat content was determined by nitrogen-free ether extraction analysis in the equipment (Labconco®, USA). Crude protein determination was performed with micro Kjeldahl (FOSS® Tecator™, Denmark). Crude fibre was evaluated by the Weende method modified from AOAC (2000). The analyses of acidic detergent fibre (FDA), neutral detergent fibre (FDN), cellulose, hemicellulose and lignin were determined according to the classical method of Van Soest (AOAC, 2000). The nitrogen-free extract (ELN) was determined as the difference of the sum of all the compositions with 100%. All the analyses were carried out in triplicate with each one of the flours obtained during the samplings.

Thermal analysis

Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The determination of the thermal properties took place in the company In Materiis, located in Guadalajara, Jalisco. It was done on a STA-PT-1600 analyzer (LINSEIS®, Germany), which performs simultaneous analyses of TGA and DSC. Samples were subjected to a controlled temperature program to determine the percentage of weight loss due to degradation, dehydration and other components, as well as to determine their thermal transitions. The heating curve was from 20 to 500 °C, with a speed of 10 °C per min in an inert nitrogen atmosphere at 8 L h⁻¹, according to López-García *et al.* (2017). The test was carried out in triplicate with each of the flours obtained during the samplings.

Statistical analysis

All the experiments were done in triplicate. With ANOVA followed by a Tukey mean comparison test with $p \leq 0.05$, the statistical software used was SigmaPlot 13 (SYSTAT, 2018).

(2017). La prueba se realizó por triplicado con cada una de las harinas obtenidas durante los muestreos.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Con ANDEVA seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey con $p \leq 0.05$, el paquete estadístico usado fue SigmaPlot 13 (SYSTAT, 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico proximal

De las pruebas realizadas a las harinas de nopal, se observó que el porcentaje de humedad (5.12%) fue el mismo para las tres harinas de cada muestreo sin diferencia ($p > 0.05$) estadística significativa (Cuadro 1). Esto fue similar a lo obtenido por Hernández-Urbiola *et al.* (2011) quienes valoraron la humedad de harinas de nopal y obtuvieron 5.03% de humedad en harinas de cladodios de 40 d de edad.

En cuanto al contenido de proteína cruda, esta fue ligeramente superior en la harina de los cladodios del mes de mayo (12.17%), los cuales se colectaron en temporada seca y fueron diferentes ($p \leq 0.05$) a las harinas de los cladodios colectados en agosto

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate chemical analysis

From the tests run on the pear-cactus flours, we observed that the water content percentage (5.12%) was the same for the three flours of each sampling with no significant ($p > 0.05$) differences between them (Table 1). This was similar to that obtained by Hernández-Urbiola *et al.* (2011) who evaluated water content of pear-cactus flour and obtained 5.03% water content in 40 d old cladodes flour.

The crude protein content was slightly greater in the flour of cladodes of May (12.17%), which were collected in the dry season and were different ($p \leq 0.05$) to the flour of the cladodes collected in August (11.61%) and September (11.50%) in the rainy season. This agrees with Uche *et al.* (2017) who reported 11.60% protein in *Opuntia dillenii* flour, a variety of pear-cactus cultivated in Mexico, Cuba, USA, and Bahamas, among others.

The ash content was different ($p \leq 0.05$) in each sampling and was greater (24.61%) in the pear-cactus flours of cladodes collected in September, compared to those of previous months (May 16.45% and August 19.92%). This could be due to the volcanic ash falling from the Popocatepetl volcano during

Cuadro 1. Composición química proximal (% base seca) de las harinas de nopal cosechado en mayo, agosto y septiembre.
Table 1. Proximate chemical composition (dry base %) in flours of pear-cactus harvested in May, August and September.

Componente (%)	Mayo	Agosto	Septiembre
Humedad	5.12 ± 0.06 a	5.12 ± 0.06 a	5.12 ± 0.06 a
Proteína cruda	12.17 ± 0.11 a	11.61 ± 0.74 ab	11.50 ± 0.30 ab
Cenizas	16.45 ± 0.10 a	19.92 ± 0.04 b	24.61 ± 0.18 c
Grasa	1.48 ± 0.06 a	1.58 ± 0.02 a	1.71 ± 0.10 a
Fibra cruda	12.07 ± 0.49 a	10.52 ± 0.24 b	9.12 ± 0.06 b
[†] FDN	16.39 ± 0.13 a	13.26 ± 1.06 b	10.52 ± 1.71 c
[†] FDA	11.32 ± 0.12 a	11.79 ± 0.24 a	11.92 ± 0.84 a
ELN	57.72 ab	56.41 ab	53.13 c

FDN (fibra detergente neutra), FDA (fibra detergente ácida) y ELN (extracto libre de nitrógeno); [†]FDN y FDA, proceden de la fibra cruda total. Valores indican promedios del análisis por triplicado ± desviación estándar. Letras distintas entre filas indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ FDN (neutral detergent fibre), FDA (acidic detergent fibre) and ELN (nitrogen free extract); [†]FDN and FDA proceeded from total crude fibre. Values indicate means of triplicate analysis ± standard deviation. Different letters among rows indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

(11.61%) y septiembre (11.50%) en época de lluvias. Esto concuerda con Uche *et al.* (2017) quienes registraron 11.60% de proteína en harina de *Opuntia dillenii*, una variedad de nopal cultivada en México, Cuba, E.U.A. y Bahamas, entre otros.

El contenido de cenizas fue diferente ($p \leq 0.05$) en cada muestreo y fue superior (24.61%) en las harinas de nopal de los cladodios de septiembre respecto a los de meses anteriores (mayo 16.45% y agosto 19.92%). Esto pudo deberse a la caída de ceniza volcánica desde el volcán Popocatepetl durante septiembre del 2019, período con una actividad volcánica mayor durante las fechas de muestreo; por ello las cenizas pudieron depositarse en los tejidos epidérmicos de los cladodios, las cenizas están constituidas principalmente de sílice.

El incremento en el contenido de cenizas en las harinas de nopal se puede atribuir al aumento de ligninas que se relacionan directamente con minerales insolubles (hasta 30%). Estos forman parte de las estructuras no energéticas de la pared celular de las plantas y le confieren estructura y rigidez (Chávez-Sifones *et al.*, 2013). También otros autores han señalado que el contenido de cenizas se incrementa con la edad debido al contenido alto de minerales como magnesio, calcio y fósforo, presentes durante la maduración de los cladodios. Rodiles-López *et al.* (2019) documentaron contenidos de cenizas de 18.41 a 23.24% en cladodios maduros de 50 d a 3 años.

El porcentaje de grasa no mostró diferencia estadística con valores de 1.48 a 1.71%. Rodríguez-Félix y Cantwell (1988) describieron que el porcentaje de grasas en harinas de nopal era 1% para nopales de 20 cm de longitud. Rodiles-López *et al.* (2019) señalaron resultados similares con 1.50% de grasa en harinas de mucílago de nopal para el desarrollo de una tortilla más saludable. Respecto al contenido de fibra cruda, los valores mostraron diferencias ($p \leq 0.05$) entre las harinas ya que estos oscilaron entre 9.12 y 12.07%. Hernández-Urbiola *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares obtuvieron con valores correspondientes de 6.15, 11.0 y 13.26% de fibra total en base seca. Los valores de fibra cruda hacen referencia al contenido total de carbohidratos digeribles y no digeribles que se encuentran en las muestras que se evaluaron.

Sin embargo, para conocer más a fondo el contenido de fibra soluble y fibra insoluble fue necesario realizar otras pruebas, entre ellas la de FDN, la cual proveyó información sobre el contenido

September 2019, a period with greater volcanic activity during the sampling dates. For this reason, ashes could be deposited in the epidermal tissues of the cladodes; ashes are mainly made of silica.

The increase in ashes content in the pear-cactus flours can also be attributed to the increase in lignin, which are directly related to insoluble minerals (up to 30%). Those are part of the non-energetic structures of plants in the cell wall, bringing structure and rigidity (Chávez-Sifones *et al.*, 2013). Other authors have also pointed out that the ash content increases with age due to the high content of minerals such as magnesium, calcium and phosphorus, present during the maturation of the cladodes. Rodiles-López *et al.* (2019) reported ash contents of 18.41 to 23.24% in mature cladodes from 50 days to 3 years of age.

Fat percentage did not show statistical difference with values from 1.48 to 1.71%. Rodríguez-Félix and Cantwell (1988) described that the percentage of fat in pear-cactus cladodes flour was 1% for those of 20 cm in length. Rodiles-López *et al.* (2019) reported similar results with 1.50% fat in pear-cactus mucilage flours to produce a healthier Mexican tortilla. The values of crude fibre content showed differences ($p \leq 0.05$) among the flours since they ranged between 9.12 and 12.07%. Hernández-Urbiola *et al.* (2011) obtained similar results with corresponding values of 6.15, 11.0 and 13.26% of total fibre on a dry base. Crude fibre values referred to the total content of digestible and non-digestible carbohydrates found in the evaluated samples.

However, to learn more about the content of soluble fibre and insoluble fibre, it was necessary to perform other tests, among them the FDN test, which provided information on the hemicellulose, pectin and protein content in the vegetative parts, mainly constituted by structural carbohydrates (Hernández-Urbiola *et al.*, 2011). In this case, statistical differences ($p \leq 0.05$) were found among the sampling months; in May (dry season) a higher percentage was obtained with 16.39%, compared to the months of the rainy season (August, 13.26%, and September, 10.52%).

After the FDA test, the statistical analysis showed no significant differences ($p > 0.05$) in the flour of the cladodes collected in May (11.32%) and August (11.79%); the percentage was very similar in the three months of sampling. This is related to the content of insoluble fibre (cellulose and lignin);

de hemicelulosa, pectinas y proteínas de las partes vegetativas, constituidas principalmente por los carbohidratos estructurales (Hernández-Urbiola *et al.*, 2011). En este caso, se encontraron diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre los meses de muestreo; mayo (época seca) fue en el cual se obtuvo un porcentaje mayor con 16.39%, en comparación con los meses de temporada de lluvias (agosto, 13.26% y septiembre, 10.52%).

En cuanto a la prueba de FDA, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas ($p > 0.05$) en las harinas de los cladodios del mes de mayo (11.32%) y agosto (11.79%); el porcentaje fue muy similar en los tres meses de muestreo. Este resultado se relaciona con el contenido de fibra insoluble (celulosa y lignina), ambos polisacáridos son de importancia para este estudio. Por tal motivo, se planteó una cuantificación más acertada para obtener un panorama mejor de su uso como biomaterial biodegradable.

El ELN presentó diferencias ($p \leq 0.05$) entre los meses de muestreo; mayo fue el mes que obtuvo un porcentaje mayor con 57.72%, seguido del mes de agosto con 56.41% y por último el mes de septiembre con 53.13%. Resultados similares presentados por FAO (2016) indicaron que el ELN para cladodios de 3 a 12 meses se encuentra entre 58 y 60%, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación. La fracción que representa el ELN no contiene celulosa, sino otros compuestos como el almidón y azúcares, en especial pectinas, uno de los constituyentes principales de los cladodios de nopal (Hernández-Urbiola *et al.*, 2011).

Los contenidos totales de celulosa, hemicelulosa y lignina de las harinas de cladodios de cada mes de muestreo se cuantificaron. Como se puede observar, los contenidos mayores respectivos de celulosa y hemicelulosa estuvieron en las harinas del mes de mayo, 11.07 y 16.39% (Cuadro 2). Mientras que el contenido mayor de lignina se obtuvo en septiembre con un 4% de las harinas procesadas de los cladodios colectados en septiembre, con tamaño mayor durante el muestreo. Estos resultados también coincidieron con los expuestos por Yang *et al.* (2015) quienes señalaron contenidos de celulosa entre 9.8 - 13.1% en cladodios maduros provenientes de áreas con poco estrés hídrico. En cuanto al contenido de lignina total, los resultados fueron similares a los de Osuna-Ceja *et al.* (2019) con valores entre 1.0 - 2.7% en subproductos de nopal forrajero.

both polysaccharides are important for this study. Therefore, a more accurate quantification would help to obtain a wider scope of their use as a biodegradable biomaterial.

The ELN showed differences ($p \leq 0.05$) among sampling months; May was the month that obtained a higher percentage with 57.72%, followed by August with 56.41% and finally September with 53.13%. Similar results by FAO (2016) indicated that the ELN for cladodes from 3 to 12 months is between 58 and 60%, which agrees with the results obtained in this study. The fraction that the ELN represents does not contain cellulose, but other compounds such as starch and sugars, pectin in particular, one of the main constituents of pear-cactus cladodes (Hernández-Urbiola *et al.*, 2011).

Total cellulose, hemicellulose and lignin contents of the cladodes flour in each month of sampling were quantified. As observed, the highest respective contents of cellulose and hemicellulose were in the flours of cladodes collected in May, 11.07 and 16.39% (Table 2). Whereas the highest lignin content was obtained in September with 4% of the processed flours from the cladodes collected in September, with a larger size during the sampling. These results also coincided with those reported by Yang *et al.* (2015), who indicated cellulose contents between 9.8 - 13.1% in mature cladodes from areas with little water stress. Results on the total lignin content were similar to those of Osuna-Ceja *et al.* (2019) with values between 1.0 - 2.7% in pear-cactus by-products collected for forage.

Previous studies on the chemical composition of pear-cactus indicated variation under climatic conditions when cutting the cladodes. Despite this, the study by Rodiles-López *et al.* (2019) indicated that these changes are proportional to the age of the cladode, with considerable increases in ashes, calcium and protein contents. A similar behavior occurs with the lignin content in cacti, which increases according to the age of the stem.

Pear-cactus cladodes waste flours have great potential as renewable biomaterials in the addition of polymeric matrices, due to interactions between their functional groups and those of biodegradable polymers such as PLA. This occurs because they can increase the mechanical properties of resistance and Young's modulus, as well as to accelerate their biodegradation (Scaffaro *et al.*, 2019).

Cuadro 2. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (% en base seca) en harina de nopal de cladidos colectados en mayo, agosto y septiembre.**Table 2. Cellulose, hemicellulose and lignin content (% on a dry base) of pear-cactus flour from cladodes collected in May, August and September.**

Mes de muestreo	(%) Celulosa	(%) Hemicelulosa	(%) Lignina
Mayo	11.07 ± 2.75 a	16.39 ± 0.13 a	1.73 ± 0.45 ab
Agosto	10.66 ± 0.59 ab	13.26 ± 1.06 b	1.04 ± 0.23 a
Septiembre	10.86 ± 0.89 a	10.52 ± 1.71 c	4.00 ± 0.06 c

Valores indican promedios de análisis por triplicado ± desviación estándar en base seca. Letras distintas entre filas indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ Values indicate means of triplicate analysis ± standard deviation on a dry base. Different letters among rows indicate statistical differences (Tukey $p \leq 0.05$).

Estudios previos sobre la composición química del nopal señalaron su variación entre condiciones climáticas al corte de los cladodios. A pesar de esto, investigaciones como la de Rodiles-López *et al.* (2019) indicaron que estos cambios son proporcionales a la edad del cladodio, con incrementos considerables en los contenidos de cenizas, calcio y proteínas. De la misma manera, un comportamiento similar se da con el contenido de lignina en las cactáceas, el cual se incrementa conforme con la edad de la penca.

Las harinas de residuos de nopal tienen un gran potencial como biomaterial renovable en la adición de matrices poliméricas, por las interacciones entre sus grupos funcionales y los de polímeros biodegradables como el PLA. Ya que pueden aumentar las propiedades mecánicas de resistencia y el módulo de Young, así como acelerar su biodegradación (Scaffaro *et al.*, 2019).

Análisis térmicos

Análisis termogravimétrico (TGA)

En el TGA de las harinas de los meses de mayo, agosto y septiembre se observó un comportamiento similar al de otras variables entre los meses muestreados (Figura 1). La primera pérdida de peso en el mes de mayo se observó a los 124.44 °C con una pérdida de peso de 6.43%, del mes de agosto, se observó a partir de los 86.43 °C con un 6.83% de pérdida de masa, y en el mes de septiembre, a partir de los 127.60 °C con una pérdida de masa de 6.6%. Esto se debe en lo principal a la pérdida de humedad en los materiales vegetales (Stefanidis *et al.*, 2014). Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) obtuvieron resultados similares con harinas de mucílago de cáscaras de tunas (*Opuntia*

Thermal analysis

Thermogravimetric Analysis (TGA)

In the TGA of the flours from cladodes collected in May, August and September a similar behaviour to that of other variables was observed among the variable month of sampling (Figure 1). The first drop in May was observed at 124.44 °C amounting a weight loss of 6.43%; in August, it was observed at 86.43 °C with a 6.83% mass loss; and in September, at 127.60 °C with a mass loss of 6.6%. This is mainly due to the loss of water in plant materials (Stefanidis *et al.*, 2014). Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) obtained similar results with mucilage flours from

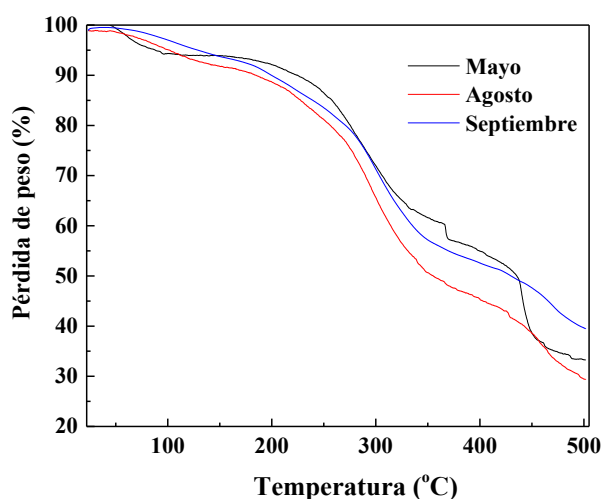


Figura 1. Curva de análisis termogravimétrico (TGA) de la harina de cladodios de nopal colectadas en mayo, agosto y septiembre.

Figure 1. Thermogravimetric analysis curve (TGA) of the pear-cactus flour from cladodes collected in May, August and September.

ficus - indica), en ese estudio, la primera transición representativa de la pérdida de peso ocurrió de 25 a 120 °C, debido a la pérdida en el contenido de agua.

La transición siguiente en harinas de cladodios del mes de mayo, se observó a partir de los 231 °C con una pérdida en peso del 11.08%, mientras que, en el mes de agosto, fue a partir de los 157.21 °C con una pérdida en peso del 13.56%. Para las harinas del mes de septiembre, la transición fue a partir de los 237 °C con una pérdida en peso del 16.81%. A partir de los 327.85 °C, se observaron pérdidas de peso superiores al 40%. Estos resultados son similares a los documentados por Stefanidis *et al.* (2014) quienes mencionaron que la pérdida de peso a estas temperaturas fue representativa de la descomposición de polisacáridos, esto ocurrió dentro de los 200 a 320 °C con pérdidas de peso hasta 59.7%. Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) observaron algo muy similar en su estudio, que entre 120 y 290 °C hubo descomposición en la biomasa de los componentes hemicelulosa y lignina; y que esta última comenzó a degradarse a partir de los 120 °C. En nuestra investigación, el contenido de lignina fue significativo ($p \leq 0.05$) respecto a la edad de los cladodios (Cuadro 2).

El mucílago de nopal es hidrofílico y su contenido de carbohidratos alto lo hace muy heterogéneo. Por tal motivo, la variación entre la pérdida de masa (en peso) que se presentó a partir de los 210 °C hasta los 310 °C (donde se observó la pérdida mayor, Figura 1) es característica de la descomposición de los polisacáridos; con la temperatura de carbonización a 431.34 °C. Al respecto, Pinto *et al.* (2016) obtuvieron un resultado similar con una temperatura de carbonización del mucílago de quingombó (*Abelmoschus esculentus*) de 400 °C. Y Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) identificaron la descomposición de polisacáridos a partir de los 120 °C y la carbonización total de materiales sin mucílago de nopal a los 280 °C.

El comportamiento de las muestras de harina de los tres meses fue similar ($p > 0.05$) en cuanto a la pérdida de peso ya que ocurrió a temperaturas semejantes, esto tal vez se debió a que las harinas se obtuvieron de cladodios de la misma edad aproximada y del mismo municipio. A la fecha existen pocas publicaciones sobre el uso de harina de nopal como material de refuerzo en matrices poliméricas. Entre estas destaca la investigación de Scaffaro *et al.* (2019) quienes desarrollaron un bio compuesto con ácido poliláctico (poly L-lactic acid, PLA) y adición de

prickly pear-cactus fruits peel (*Opuntia ficus - indica*). In their study, the first representative transition of weight loss occurred from 25 to 120 °C, due to water content loss.

The following transition in cladodes flour collected in May was observed at 231 °C, with a weight loss of 11.08%, while in August, it was at 157.21 °C, with a weight loss of 13.56%. The transition of the flours from cladodes collected in September was at 237 °C, with a weight loss of 16.81%. Starting at 327.85 °C, weight losses of over 40% were observed. These results are similar to those reported by Stefanidis *et al.* (2014), who mentioned that the weight loss at these temperatures was representative of polysaccharides degradation. This occurred within 200 to 320 °C, with weight losses up to 59.7%. Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) reported closely similar results in their study, observing that between 120 and 290 °C occurred biomass degradation in components such as hemicellulose and lignin; and that the latter began to degrade at 120 °C. In our research, the lignin content was significant ($p \leq 0.05$) at comparing cladode age (Table 2).

Pear-cactus mucilage is hydrophilic, and its high carbohydrate content makes it very heterogeneous. For this reason, the variation in the loss of mass (in weight) that occurred from 210 °C to 310 °C (the greatest weight loss point, Figure 1), is characteristic from polysaccharides degradation, with the carbonization temperature at 431.34 °C. In this regard, Pinto *et al.* (2016) obtained a similar result with the carbonization temperature of okra mucilage (*Abelmoschus esculentus*) at 400 °C. Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) identified the decomposition of polysaccharides starting at 120 °C and the total carbonization of materials without pear-cactus mucilage at 280 °C.

The behaviour of the flour samples of the three months was similar ($p > 0.05$) in terms of weight loss since it occurred at similar temperatures; this was due perhaps to the flours were obtained from cladodes of an approximate age and at the same municipality. To date there are few publications on the use of pear-cactus flour as a reinforcing material in polymeric matrices. Among these, the research by Scaffaro *et al.* (2019) stands out by developing a bio compound with polylactic acid (PLA) and the addition of cladode fibres from adult pear-cactus. That biomaterial demonstrated a remarkable adherence

fibras de cladodio de nopal adulto. El bio material demostró una adherencia notable del polímero con las fibras de nopal, atribuido a la carga interfásica del PLA; lo cual también incrementó la ductilidad del material.

Una investigación reciente de Colín-Chávez *et al.* (2021) informó sobre el uso de fibras de subproductos de nopal de dos años para el desarrollo de un material biodegradable de embalaje; en el cual se obtuvieron láminas de papel comparables con fibras maderables y no maderables. Las harinas lignocelulósicas toman gran importancia por su potencial como biomateriales para el refuerzo de matrices poliméricas. Además, son una fuente renovable, abundantes, económica y al tratarse de biomasa residual presentan buenas propiedades mecánicas para su uso como biomaterial biodegradable (Abdul Khalil *et al.*, 2016).

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las transiciones son fenómenos importantes que sirven para conocer el comportamiento térmico de los polímeros, pues describen la rigidez de las cadenas poliméricas. Así ayudan a entender y referenciar mejor su uso posible para adición en biomateriales de acuerdo con lo descrito por Gheribi *et al.* (2019). Las transiciones de temperatura de las harinas de nopal de cladodios colectados en los meses de mayo, agosto y septiembre también se describieron en este estudio (Figura 2). El primer evento térmico correspondiente a la T_g (transición vítrea) se observó entre los 46 y 48 °C, para cladodios de mayo, agosto y septiembre (Figura 2A). Estos resultados fueron similares a lo publicado por otros autores que observaron valores T_g de 45 °C en harinas de mucílago de nopal (Gheribi *et al.*, 2019).

Después, se presentó un segundo evento térmico entre los 32 y los 130 °C con un pico endotérmico a 90 °C, mismo que correspondió a la temperatura de fusión (T_m) con una pérdida de peso menor al 10% que correspondió con la pérdida de agua y componentes de bajo peso molecular (Figura 2B), de manera similar a lo consignado por Madera-Santana *et al.* (2018). También Manani *et al.* (2018) expusieron un primer evento térmico para harinas de cladodio de nopal adulto entre los 35–120 °C, intervalo que identifica la pérdida de humedad. El ablandamiento de las harinas de nopal durante sus transiciones térmicas es complejo y coincidente con aquéllas del

of the polymer to the pear-cactus fibres, attributed to the interphase load of PLA, also increasing the ductility of the material.

A recent study by Colín-Chávez *et al.* (2021) reported on the use of two-year-old pear-cactus by-product fibres for the development of a biodegradable packaging material; in which sheets of paper comparable with wood and non-wood fibres were obtained. Lignocellulosic flours take on great importance with potential as biomaterials for reinforcing polymeric matrices. In addition, they are a renewable, abundant, inexpensive source and, as they are residual biomass, they present good mechanical properties for use as a biodegradable biomaterial (Abdul Khalil *et al.*, 2016).

Differential scanning calorimetry (DSC)

Transitions are important phenomena that serve to understand the thermal behaviour of polymers; describing the stiffness in polymer chains. Thus, they help to understand and reference their addition to biomaterial applications, as it was described by Gheribi *et al.* (2019). The temperature transitions of the pear-cactus flour from cladodes collected in May, August and September were also described in this study (Figure 2). The first thermal event corresponding to the T_g (glass transition) was observed between 46 and 48 °C, for cladodes collected in May, August and September (Figure 2A). These results were similar to those published by other authors, who reported a T_g of 45 °C for pear-cactus mucilage flour (Gheribi *et al.*, 2019).

Later, a second thermal event occurred between 32 and 130 °C, with an endothermic peak at 90 °C, which corresponded to the melting temperature (T_m), with a weight loss of less than 10% that corresponded to the loss of water and low molecular weight compounds (Figure 2B), similar to that reported by Madera-Santana *et al.* (2018). Also, Manani *et al.* (2018) reported a first thermal event for adult pear-cactus cladodes flour between 35–120 °C, an interval that identifies water content loss. The softening of pear-cactus flour during thermal transitions is complex and it coincides with those of PLA. This phenomenon has been observed, according to Scaffaro *et al.* (2019), in the case of lignocellulosic fills from pear-cactus fibre flours; and it can be attributed to the presence of minerals and impurities

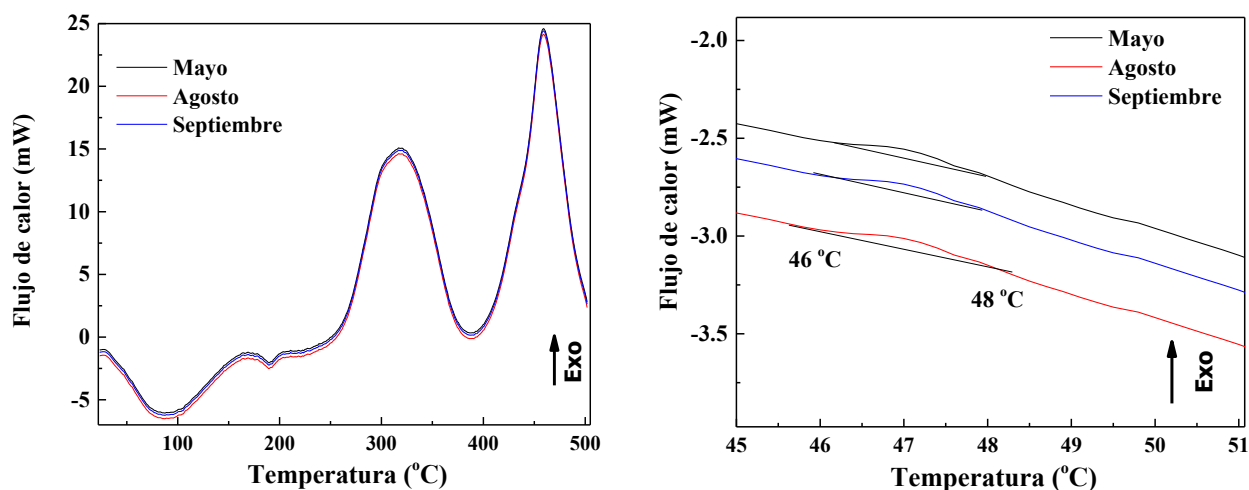


Figura 2. Curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las harinas de cladodios de nopal. (A) Termograma completo y (B) Detalle de la Transición vítrea (T_g).

Figure 2. Differential scanning calorimetry curve (DSC) of pear-cactus cladodes flour. (A) Complete thermogram, and (B) Detail of the glass transition (T_g).

PLA. Este fenómeno se ha observado de acuerdo con Scaffaro *et al.* (2019) en el caso de rellenos lignocelulósicos de harinas de fibra de nopal y puede atribuirse a la presencia de minerales e impurezas en las fibras crudas que inducen la degradación de matrices poliméricas.

El tercer evento exotérmico se presentó entre los 240 y los 380 °C con un pico a los 315 °C que correspondió a la descomposición térmica de las proteínas y polisacáridos. Este evento muestra la descomposición habitual de los polisacáridos que ocurre de entre los 210 a 350 °C y define también la interacción de otros componentes como son la celulosa, hemicelulosa y lignina (Stefanidis *et al.*, 2014). Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) observaron la aparición de estos picos a partir de los 120 °C para compuestos lignocelulósicos, en particular la hemicelulosa que se puede verificar entre los 170 a 190 °C.

El último evento se presentó entre los 394 y los 500 °C con un pico a los 455 °C el cual correspondió a la degradación total de los componentes, como es la lignina presente en las muestras, de acuerdo con Stefanidis *et al.* (2014). Otros autores como Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) mencionaron que la depolimerización de la pectina, otro de los componentes principales del nopal, se observó entre 154 y 281 °C. Por último, la descomposición final de la muestra ocurrió a 460 °C (Figura 2A).

La T_g fue similar para las tres muestras de harina, con valores en 45 y 48 °C, al igual que las otras

in the raw fibres that induce the degradation of polymeric matrices.

The third exothermic event occurred between 240 and 380 °C, with a peak at 315 °C that corresponded to the thermal decomposition of proteins and polysaccharides. This event shows the usual polysaccharides degradation that occurs between 210 to 350 °C, and it also defines the interaction of other components such as cellulose, hemicellulose and lignin (Stefanidis *et al.*, 2014). Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) observed the appearance of these peaks starting at 120 °C for lignocellulosic compounds, particularly hemicellulose, which can be observed between 170 and 190 °C.

The last event occurred between 394 and 500 °C with a peak at 455 °C, which corresponded to the total degradation of the components, such as the lignin present in the samples, according to Stefanidis *et al.* (2014). Other authors, such as Guadarrama-Lezama *et al.* (2018) indicated that pectin depolymerization which is another of the main components of pear-cactus was observed at 154 to 281 °C. Finally, the complete decomposition of the sample occurred at 460 °C (Figure 2A).

T_g was similar in the three flour samples, values between 45 and 48 °C, as the other transitions. No difference ($p > 0.05$) was observed among the sampling months. That could be due to flour was obtained from cladodes with approximate age at the cutting, and at the same municipality. TGA and DSC techniques are

transiciones. No se observó diferencia ($p>0.05$) entre los meses de muestreo. Esto pudo deberse a que las harinas se obtuvieron de cladodios con la misma edad aproximada al corte y eran del mismo municipio. Las técnicas de TGA y DSC son complementarias. En el TGA, se pudo observar la estabilidad térmica de las tres muestras y las transiciones térmicas en el DSC. En el termograma de TGA el producto de las etapas de descomposición térmica estuvieron alrededor de 310-317 y 450 °C y correspondieron con temperatura entre 240-380 °C (pico máximo en 315 °C) y 394-500 °C (pico máximo en 455 °C), observados en los termogramas DSC. Estas transiciones permitieron conocer los intervalos de temperatura en los cuales el bio material se degradó y fundió, para así tener vistas del uso que podrá tener dicho biomaterial, adicionado a manera de biopolímero en una matriz polimérica.

El uso de refuerzos de harinas lignocelulósicas de nopal en matrices poliméricas facilita las interfaces y mejora las propiedades de rotura de polímeros como el PLA. Los materiales producidos a partir de biomasa ayudan a rellenar los poros de la matriz polimérica y mejoran no solo el rendimiento sino también la ductilidad de los materiales (Pérez-Fonseca *et al.*, 2017; Scaffaro *et al.*, 2019). Esta mejora en propiedades facilitaría su uso en un modelo de extrusión para la fabricación de fibras biodegradables que sirvan para el desarrollo de materiales biopoliméricos biodegradables.

CONCLUSIONES

El análisis químico proximal mostró porcentajes similares de humedad, proteína cruda, grasa y fibra detergente ácida en las tres harinas de cada muestreo sin diferencia estadística. El contenido de cenizas fue superior en las harinas de nopal de cladodios colectados en septiembre al igual que el contenido de lignina y fibra cruda. En fibra cruda, fibra detergente neutra, extracto libre de nitrógeno, contenido de celulosa y hemicelulosa, el valor fue mayor en mayo, mes de época seca.

Aunque hubo algunas diferencias entre tipo de harina proveniente de subproductos del nopal y otras entre tres meses de cosecha, todas mostraron un comportamiento similar en sus propiedades térmicas. El análisis térmico indicó estabilidad térmica, la cual podría permitir a la harina formar parte de una

complementary. In the TGA, thermal stability of the three samples was observed, and thermal transitions in the DSC. In the TGA thermogram, the product of the thermal degradation stages was around 310-317 and 450 °C, and it corresponded to temperature between 240-380 °C (maximum peak at 315 °C) and 394-500 °C (maximum peak at 455 °C), observed in the DSC thermograms. Those transitions allowed us to know the temperature ranges in which the biomaterial degraded and melted. This is useful to get a scope of the use that such biomaterial may have, added as a biopolymer into a polymeric matrix.

The use of lignocellulosic pear-cactus flour reinforcements in polymeric matrices facilitates the interfaces and improves the breaking properties of polymers such as PLA. Materials produced from biomass help to fill the pores of the polymeric matrix and improve not only the performance but also the ductility of the materials (Pérez-Fonseca *et al.*, 2017; Scaffaro *et al.*, 2019). This improvement in properties would facilitate their use in an extrusion model for manufacturing of biodegradable fibres that would serve to develop biodegradable biopolymeric materials.

CONCLUSIONS

The proximate chemical analysis showed similar percentages in water content, crude protein, fat and acidic detergent fibre in the three types of pear-cactus flour, with no statistical differences. The ashes content was higher in the pear-cactus flour from cladodes collected in September, as well as the content of lignin and crude fibre. In crude fibre, neutral detergent fibre, nitrogen-free extract, cellulose and hemicellulose content, the value was higher in May, a dry month.

Although there were some differences among flour type from pear-cactus by-products, and others among three harvest months, they all showed a similar behaviour in thermal properties. Thermal analysis indicated thermal stability, which would allow flour to be part of a polymeric matrix to be used as a biomaterial for biodegradable packaging.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the postgraduate funds (doctorate research

matriz polimérica para su uso como biomaterial para envases biodegradables.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los fondos para postgrado (beca doctoral no. 706180). Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por los fondos de la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI).

LITERATURA CITADA

Abdul Khalil, H.P.S., Y. Davoudpour, K. S. Chaturbhuj, Md. S. Hossain A. S Adnan, R. Dungani, M.T. Paridah, Z. Islam Sarker, M.R Nurul Fazita, M.I Syakir, and M.K.M. Haafiz. 2016. A review on nanocellulosic fibres as new material for sustainable packaging: Process and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 64: 823-836 <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.072>

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th edition. Washington D.C. <http://www.fao.org/3/ab489s/ab489s03.htm> (Consultado: noviembre 2020).

Colín-Chávez, C., H. Soto-Valdez, J. Turrado-Saucedo, A. Rodríguez-Félix, E. Peralta, A. R. Saucedo-Corona, and M. Guzmán-Corona. 2021. Papermaking as potential use of fibers from Mexican *Opuntia ficus-indica* waste. 23: 141 - 150 <https://doi.org/10.18633/biotecnica.v23i1.1315>.

Chávez-Sifones, M. and M. E. Domine. 2013. Lignin, structure and applications: depolymerization method for obtaining aromatic derivatives of industrial interest. *Av. Cien. Ing.* 4: 15 - 46 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323629266003>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. Utilización agroindustrial del nopal. Roma, Italia. 133 p.

Gheribi, R., Y. Habibi, and K. Khwaldia, 2019. Prickly pear peel as a valuable resource of added - value polysaccharide: Study of structural, functional and film forming properties. *Int. J. of Bio. Macro.* 126: 238 - 245 DOI: 10.1016/j.ijbio-mac.2018.12.228

Greco, A., R. Gennaro, A. Timo, F. Bonfantini, and A. Maffezzoli. 2013. A comparative study between bio-composites obtained with *Opuntia ficus-indica* cladodes and flax fibers. *J Polym. Environ.* 21:910-916 <https://doi.org/10.1007/s10924-013-0595-x>

Guadarrama-Lezama, A. Y., J. Castaño, G. Velázquez, H. Carrillo-Navas, and J. Álvarez-Ramírez. 2018. Effect of nopal mucilage addition on physical, barrier and mechanical properties of citric pectin-based films. *J. Food Sci. Technol.* 55: 3739-3748 DOI: 10.1007/s13197-018-3304-x

Hernández-Urbiola, M. I., Pérez-Torrero, E. and Rodríguez-García, M. E. 2011. Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus-indica*) at varied ages in an organic harvest. *Int J. Environ Res. Public Health* 8:1287-1295 DOI: 10.3390/ijerph8051287

López-García, F., Jiménez-Martínez, C., Guzmán-Lucero, D., Maciel-Cerda, A., Delgado-Macuil, R., Cabrero-Palomino,

grant num. 706180). To the Instituto Politécnico Nacional (IPN) through the funds of Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI).

—End of the English version—



D., Terrés-Rojas, E., and Arzate-Vázquez, I. 2017. Physical and chemical characterization of biopolymer film made with corn starch and nopal xonostle (*Opuntia joconostle*) mucilage. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 16: 147-158.

Madera-Santana, T., Vargas-Rodríguez, L., Núñez-Colín, C. A., González-García, G., Peña-Caballero, V., Núñez-Gastélum, J. A., Gallegos-Vázquez, C., and Rodríguez-Núñez, J. R. 2018. Mucilage from cladodes of *Opuntia spinulifera* Salm-Dyck: chemical, morphological, structural and thermal characterization. *J. of Food.* 16:650-657 DOI: 10.1080/19476337.2018.1454988

Manani, F., H. Elhleli, M. Ammar, R. Passas, E. Elaloui, and Y. Moussaoui. 2018. Green process for fibrous networks extraction from *Opuntia* (Cactaceae): Morphological design, thermal and mechanical studies. *Ind. Crops Prod.* 126, 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.033>

Marín-Bustamante, M. Q., Chanona-Pérez, J. J., Güemes-Vera, N., Arzate-Vázquez, I., Perea-Flores, M. J., Mendoza-Pérez, J. A., Calderón-Domínguez, G. and Cásarez-Santiago, R. 2018. Evaluation of physical, chemical, microstructural and micromechanical properties of nopal spines (*Opuntia ficus-indica*). *Ind. Crops Prod.* 123:707-718 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.030>

Osuna-Ceja, E., Figueroa-Sandoval, B., Martínez-Gamiño, M. A., y Pimentel-López, J. 2019. Un sistema agroforestal de secano para el altiplano semiárido de México. *Rev. Mex. Cien. Agr.* 22:89-103 DOI: 10.29312/remexca.v0i22.1861

Pérez-Fonseca, A. A., Robredo-Ortíz, J. R., González-Núñez, R. and Rodríguez, D. 2017. Effect of thermal annealing on the mechanical and thermal properties of polylactic acid-cellulosic fiber biocomposites. *App. Polym. Sci.* 1 -9 DOI: 10.1002/APP.43750

Pinto, C. M. A. Mottin, A. C., and Ayres, E. 2016. Preparation and characterization of Okra mucilage (*Abelmoschus esculentus*) edible films. *Macromol. Symp.* 367: 90-100 DOI: 10.1002/masy.20160001990

Rodiles-López, J. O., Arriaga-Martínez, L. P., Martínez-Flores, H. E., Zamora-Vega, R., y García-Martínez, R. M. 2019. Desarrollo de una tortilla adicionada con harinas de aguacate y nopal y su efecto en la reducción de colesterol, triglicéridos y glucosa en ratas. *Biotecnica.* 21: 71 - 77 DOI: <https://doi.org/10.18633/biotecnica.v21i2.909>

Scaffaro, R., Maio, A., Gulino, E. F., and Megna, B. 2019. Structure-property relationship of PLA-*Opuntia ficus indica* biocomposites. *Composites Part-B.* 167:199-2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.12.025>

Stefanidis, S. D., K. G. Kalogiannis, E. F. Iliopoulou, C. M. Michailof, P. A. Pilavachi, and A. A. Lappas. 2014. A study of

- lignocellulosic biomass pyrolysis via the pyrolysis of cellulose, hemicellulose and lignin. J. Anal. Appl. Pyrol. 105: 143-150 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2013.10.013>
- Uche, C. N., Benjamin, A., and Peter, A. 2017. Chemical composition and physicochemical analysis matured stems of *Opuntia dillenii* grown in Nigeria. Food Sci. Tech. 5:106 – 112 DOI: 10.13189/fst.2017.050502
- Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J. A., Cushman, J. C., Tian, E., and Lin, H. 2015. Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. Biomass and bioenergy 76:43-53 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.004>

GRANOS SECOS DE DESTILERÍA CON SOLUBLES DE MAÍZ Y SUPLEMENTACIÓN DE XILANASA EN POLLAS Y GALLINAS BOVANS WHITE

DISTILLERS DRIED GRAINS WITH SOLUBLES FROM MAIZE AND XYLANASE SUPPLEMENTATION IN BOVANS WHITE PULLETS AND HENS

Jennifer Pérez-Martínez^{1*}, Juan Manuel Cuca-García¹, Carlos Miguel Becerril¹, Arturo Pro-Martínez¹, Omar Hernández-Mendo¹, Mariano González-Alcorta², Víctor Valdés-Narváez³, Silvia Carrillo-Domínguez⁴

¹Ganadería. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo 56230 México. (jean-bodin_@hotmail.com). ²Zootecnia. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo 56230 México. ³Consultor independiente. ⁴Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán. Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez, Sección 16, Tlalpan 14080 Ciudad de México.

RESUMEN

Durante la producción de etanol a partir del maíz se generan granos secos de destilería con solubles (GSDS, conocidos en inglés como DDGS) utilizados en la avicultura por su contenido alto de nutrimentos. La hipótesis fue que los GSDS cubren los requerimientos nutrimentales en pollas y gallinas y la xilanasa mejorará las variables productivas. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue determinar la inclusión de GSDS y xilanasa en alimento para pollas y gallinas. En este estudio se usaron 400 pollas de un día a 70 semanas de edad, distribuidas en 10 tratamientos, con cinco repeticiones, de ocho pollas cada una, y un arreglo factorial 5 x 2 con cinco niveles de GSDS (0, 8, 16, 24 y 32%) y dos de xilanasa (0 y 0.05%). Las variables fueron rendimiento productivo, madurez sexual, calidad de huevo, costo de la polla y de un kg de huevo. Los resultados indicaron que en pollas los GSDS y la xilanasa no modificaron las variables productivas y de madurez sexual ($p > 0.05$); en postura a partir de 16% de GSDS se empezó a afectar la producción, mientras que la enzima tuvo un efecto positivo ($p \leq 0.05$) en rendimiento productivo. Con 32% de GSDS, el costo de crianza y un kg de huevo aumentó ($p \leq 0.05$). En calidad de huevo los GSDS mejoraron las unidades Haugh y el color de la yema ($p \leq 0.05$), mientras que la xilanasa las afectó ($p \leq 0.05$). En conclusión, en pollas se pueden incluir hasta 32% de GSDS con éxito en las variables productivas y de madurez sexual, mientras que la xilanasa no es necesaria. En gallinas los GSDS a partir de 16% causan efectos adversos en el rendimiento y precio del huevo, en tanto que la xilanasa mejora las variables productivas y disminuye el costo del huevo.

ABSTRACT

During ethanol production from maize corn, distillers dried grains with solubles (DDGS, at tables labelled in Spanish as GSDS) are generated and used in poultry farming because of their high nutrient content. The hypothesis was that DDGS meet nutrient requirements in pullets and hens and xylanase will improve productive variables. Therefore, the objective of the study was to determine the inclusion of DDGS and xylanase in pullet and hen feed. In this study, 400 pullets from one day to 70 weeks of age were used, distributed in 10 treatments, with five replicates of eight pullets apiece, and a 5 x 2 factorial arrangement with five levels of DDGS (0, 8, 16, 24 and 32%) and two of xylanase (0 and 0.05%). Variables were productive yield, sexual maturity, egg quality, cost per pullet and per kg of egg. Results indicated that in pullets, DDGS and xylanase did not modify the productive and sexual maturity variables ($p > 0.05$); in laying, from 16% DDGS onwards, production began to be affected, while the enzyme had a positive effect ($p \leq 0.05$) on yield. With 32% DDGS, the cost of rearing and one kg of egg increased ($p \leq 0.05$). In egg quality, DDGS improved Haugh units and yolk color ($p \leq 0.05$), while xylanase affected them ($p \leq 0.05$). In conclusion, in pullets up to 32% DDGS can be included with success for productive and sexual maturity variables, while xylanase is not necessary. In hens, DDGS above 16% cause adverse effects on egg yield and price, while xylanase improves productive variables and decreases egg cost.

Key words: protein, enzyme, egg quality, sexual maturity, cost.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6387-5726>.

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

Publicado en *Agrociencia* 55: 417-431. 2021.

Palabras clave: proteína, enzima, calidad de huevo, madurez sexual, costo.

INTRODUCCIÓN

Los granos secos de destilería con solubles (GSDS) se empezaron a utilizar en la producción pecuaria por su costo bajo, pero la demanda alta aumentó su precio. En la avicultura se utilizan por su alto índice de proteína, aminoácidos, energía y fósforo, los cuales equivalen a tres veces el contenido de los granos de los cuales proceden, así como xantofilas (40 mg L^{-1}) (Liu, 2012). Sin embargo, en la avicultura el problema principal de utilizar GSDS es la variabilidad del contenido de aminoácidos y el nivel de energía, además pueden contener micotoxinas y el contenido de fibra detergente neutro es 33.2% (De Blas *et al.*, 2019).

Los GSDS contienen polisacáridos no amiláceos (PNA), los cuales son polímeros de monosacáridos unidos a través de enlaces glucosídicos que inhiben la digestión del almidón en las aves, aumentan la viscosidad intestinal y modifican la fisiología y salud intestinal (Choct, 2015). Por eso se incorporaron enzimas exógenas para PNA en la dieta de las aves, las cuales mejoran la digestibilidad de los nutrientes, porque las aves no tienen suficientes enzimas para digerir la fibra por completo (Alagawany *et al.*, 2018). Por lo tanto, bajo la hipótesis de que los GSDS podrían cubrir los requerimientos nutrimentales en pollas y gallinas y la xilanasa podría mejorar las variables productivas; el objetivo de este estudio fue determinar en pollas y gallinas Bovans White, si la inclusión de GSDS y xilanasa en la dieta influyen en el comportamiento productivo, madurez sexual, calidad de huevo, precio de producción de una polla y de un kg de huevo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, México. En este estudio se usaron 400 pollas Bovans White, de 1 d a 70 semanas de edad, y se dividió en dos etapas, crianza y postura. Las aves se asignaron al azar a diez tratamientos, con cinco repeticiones y ocho pollas en cada una. Las pollas se alojaron en criadoras eléctricas de batería, hasta la semana seis de edad; después se colocaron en jaulas de desarrollo, en la semana 15 pasaron a jaulas para ponedoras, dos aves por jaula de $30 \times 45 \text{ cm}$, con comederos lineales y bebederos automáticos en una caseta convencional.

INTRODUCTION

Distillers dried grains with solubles (DDGS) began to be used in livestock production because of their low cost, but high demand increased their price. In poultry farming, they are used for their high protein, amino acids, energy and phosphorus, which are equivalent to three times the content of the grains from which they are derived, as well as xanthophylls (40 mg L^{-1}) (Liu, 2012). However, in poultry farming the main problem of using DDGS is the variability of amino acid content and energy level, in addition they may contain mycotoxins and the neutral detergent fiber content is 33.2% (De Blas *et al.*, 2019).

DDGS contain non-starch polysaccharides (PNA), which are polymers of monosaccharides linked through glycosidic bonds that inhibit starch digestion in birds, increase intestinal viscosity, and modify intestinal physiology and health (Choct, 2015). Therefore, exogenous enzymes for PNA were incorporated into the poultry diet, which improve nutrient digestibility, because birds do not have enough enzymes to digest fiber completely (Alagawany *et al.*, 2018). Therefore, on the hypothesis that DDGS would meet the nutritional requirements of pullets and hens and xylanase would improve productive variables; the objective of this study was to determine in Bovans White pullets and hens, whether the inclusion of DDGS and xylanase in feed would influence productive behavior, sexual maturity, egg quality, production price of a pullet and a kg of egg.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Mexico. The study used 400 Bovans White pullets, from 1 day to 70 weeks old; the study was divided into two stages, rearing and laying. The birds were randomly assigned to ten treatments, with five replicates and eight pullets per treatment. The pullets were housed in electric battery brooders until six weeks of age; then they were placed in development cages, and at week 15 they were moved to laying cages, two birds per a $30 \times 45 \text{ cm}$ cage, with linear feeders and automatic drinkers in a conventional booth.

In the rearing stage, the study was divided into three periods: 0 to 6, 7 to 12 and 13 to 18 weeks. The laying stage was divided into eight periods of six weeks each, and a ninth period consisting of four weeks so that the production was adjusted to 364 days.

En la etapa de crianza el estudio se dividió en tres períodos: de 0 a 6, de 7 a 12 y de 13 a 18 semanas. La etapa de postura se dividió en ocho períodos de seis semanas cada uno, y un noveno periodo que constó de cuatro semanas para que la producción se ajustara a 364 d.

Las dietas fueron isoproteicas con base en sorgo y pasta de soya para las etapas de iniciación, crecimiento y desarrollo (Cuadro 1) y postura (Cuadro 2). Con ellas se cubrieron los requerimientos para pollas y gallinas en postura (NRC, 1994; Cuca

The diets were iso-protein diets based on sorghum and soybean paste for the stages: starter, growth, development (Table 1), and laying (Table 2). They covered the requirements for chicks, pullets and laying hens (NRC, 1994; Cuca *et al.*, 2009). The amounts of sorghum and soybean paste varied with the addition of 0, 8, 16, 24 and 32% DDGS with two concentrations 0 and 0.05% of xylanase (40 000 IU g⁻¹). The control was the diet that did not contain DDGS nor xylanase; water and feed were offered *ad libitum*. The cost of the diets was obtained by multiplying the

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales durante la fase de crianza (%).
Table 1. Composition of the experimental diets (%) during the rearing stage.

Ingrediente		Iniciación (1 d a 6 semanas)				
GSDS [†]	0.00 [‡]	8.00 [‡]	16.00 [‡]	24.00 [‡]	32.00 [‡]	
Sorgo (10.3% PC)	69.09	64.61	60.14	55.68	51.21	
Pasta de soya (48.5% PC)	25.69	21.78	17.85	13.86	9.89	
Vitaminas y minerales [§]	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	
Alimento (\$ kg ⁻¹) ^b	5.46	5.49	5.52	5.59	5.65	
Análisis calculado						
EM (kcal ⁻¹ kg)	3000	3000	3000	3000	3000	
Proteína cruda	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	
Calcio	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Fósforo disponible	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	
Lisina	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10	
Metionina+Cistina	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	
Triptófano	0.22	0.21	0.19	0.19	0.19	
Treonina	0.64	0.62	0.62	0.62	0.62	
Nutrimento analizado (PC%)						
0% xilanasa	21.58	21.60	21.19	21.19	21.5	
0.05%xilanasa [°]	21.43	21.9	21.4	21.8	21.4	
Ingrediente		Crecimiento (7 a 12 semanas)				
Sorgo (10.3% PC)	72.59	69.23	65.86	62.52	59.20	
Pasta de soya (48.5% PC)	21.21	17.03	12.84	8.64	4.40	
Vitaminas y minerales [§]	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	
Alimento (\$ kg ⁻¹) ^b	4.96	4.96	4.97	4.99	5.03	
Análisis calculado (%)						
EM (kcal ⁻¹ kg)	2900	2900	2900	2900	2900	
Proteína cruda	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	
Calcio	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Fósforo disponible	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	
Lisina	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	
Metionina+Cistina	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	
Triptófano	0.19	0.18	0.17	0.16	0.16	
Treonina	0.57	0.57	0.56	0.56	0.56	
Nutrimento analizado (PC%)						
0% xilanasa	19.97	18.78	18.29	18.05	18.80	
0.05% xilanasa [°]	19.70	18.35	18.87	18.28	18.38	

Continúa...

Continúa Cuadro 1.

Ingrediente	Desarrollo (13-18 semanas)				
Sorgo (9.5% PC)	73.85	70.49	67.14	63.79	60.44
Pasta de soya (48% PC)	18.23	14.04	9.84	5.64	1.44
Vitaminas y minerales	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Alimento (\$ kg ⁻¹) ^b	4.84	4.84	4.85	4.87	4.89
Análisis calculado					
EM (kcal ⁻¹ kg)	2865	2865	2865	2865	2865
Proteína cruda	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00
Calcio	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Fósforo disponible	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Lisina	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Metionina+Cistina	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
Triptófano	0.17	0.16	0.16	0.16	0.16
Treonina	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Nutrimento analizado (PC%)					
0% xilanasas	17.58	17.25	17.89	17.13	17.81
0.05% xilanasas ^c	17.83	17.96	17.44	17.68	17.99

[†]GSDS= granos secos de destilería con solubles, iniciación y crecimiento (28.6% PC) y desarrollo (28% PC). [‡]Las dietas con los cinco niveles de GSDS eran sin y con enzima. [§]Aporta por kilogramo de alimento: vitamina A, 9000 UI; vitamina D₃, 2500 UI; vitamina E, 20 UI; vitamina K, 3.0 mg; vitamina B₂, 8.0 mg; vitamina B₁₂, 0.015 mg; ácido pantoténico, 10 mg; ácido nicotínico, 60 mg; niacina, 40 mg; ácido fólico, 0.5 mg; colina (cloruro de colina), 300 mg; D-biotina, 0.055 mg; tiamina, 2.0 mg; hierro, 65.0 mg; zinc, 100 mg; manganeso, 100 mg; cobre, 9.0 mg; selenio, 0.3 mg; yodo, 0.9 mg. ^bFNDARFP= Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero; Precio mercado en México 20 diciembre 2019, MXN \$ por USD = 18.70. ^cXilanasas (EC 3.2.1.8), 40 000 UI g⁻¹, proveedor DUPONT-DANISCO ANIMAL NUTRITION, México; EM, energía metabolizable; PC, proteína cruda. [♦] (DDGS) GSDS = distillers dried grains with solubles, starters and growth (28.6% PC) and development (28% PC). Xilanasas = xylanase. [‡]The diets with the five levels of DDGS were without and with the enzyme. [§]Contributes per kilogram of food: vitamin A, 9000 IU; vitamin D₃, 2500 IU; vitamin E, 20 IU; vitamin K, 3.0 mg; vitamin B₂, 8.0 mg; vitamin B₁₂, 0.015 mg; pantothenic acid, 10 mg; nicotinic acid, 60 mg; niacin, 40 mg; folic acid, 0.5 mg; choline (choline chloride), 300 mg; D-biotin, 0.055 mg; thiamine, 2.0 mg; iron, 65.0 mg; zinc, 100 mg; manganese, 100 mg; copper, 9.0 mg; selenium, 0.3 mg; iodine, 0.9 mg. ^bFNDARFP= Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero; Market price in Mexico December 20, 2019, MXN \$ per USD = 18.70. ^cXylanase (EC 3.2.1.8), 40 000 UI g⁻¹, DUPONT-DANISCO ANIMAL NUTRITION supplier, Mexico; EM, metabolizable energy; PC, crude protein.

et al., 2009). Las cantidades de sorgo y pasta de soya variaron al adicionar los niveles de GSDS en 0, 8, 16, 24 y 32% con dos concentraciones 0 y 0.05% de xilanasas (40 000 UI g⁻¹). El tratamiento control fue la dieta que no contenía GSDS ni xilanasas; el agua y alimento se ofrecieron *ad libitum*. El costo de las dietas se obtuvo al multiplicar la cantidad de ingredientes por su precio. La iluminación artificial comenzó en la semana 18 con 12 h d⁻¹ de luz; a partir de la semana siguiente (19) se permitió un incremento semanal de 30 min de luz por día hasta alcanzar 16 ½ h d⁻¹ de luz.

amount of ingredients by their price. Artificial lighting started in week 18, with 12 h d⁻¹ light; beginning in week 19, a weekly increase of 30 min of light per day was allowed until reaching 16 ½ h d⁻¹ of light.

During the experiment, two batches of DDGS from the same supplier were used and each batch was randomly sampled to determine protein and amino acid content using the NIRS calibration equation (Table 3).

Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales durante la etapa de postura (18-70 semanas de edad) de gallinas Bovans White (%).**Table 2. Composition of experimental diets (%) during the laying stage (age 18-70 weeks) of Bovans White hens.**

Ingrediente					
GSDS (28% PC) [†]	0.00 [‡]	8.00 [‡]	16.00 [‡]	24.00 [‡]	32.00 [‡]
Sorgo (8% PC)	63.72	59.62	55.54	51.45	47.37
Pasta de soya (47% PC)	23.71	19.46	15.16	10.86	6.56
Aceite crudo de soya	0.83	1.11	1.41	1.70	1.99
DL-metionina (99%) [§]	0.35	0.34	0.32	0.31	0.30
L-lisina (54.6%) [§]	0.01	0.10	0.19	0.28	0.38
L-treonina (98.5%) [§]	0.06	0.07	0.09	0.11	0.13
L-triptófano (99%) [§]	0.00	0.00	0.01	0.02	0.04
CaCO ₃ (38%) ^b	10.06	10.14	10.22	10.29	10.37
Fosfato dicálcico (18/21) ^a	0.46	0.36	0.26	0.16	0.06
Vitaminas y minerales ^{††}	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Pigmento	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Sal	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Alimento (\$ kg ⁻¹) ^{‡‡}	5.17	5.18	5.21	5.25	5.29
Análisis calculado (%)					
EM (kcal ⁻¹ kg)	2751	2751	2751	2751	2751
Proteína cruda	16.50	16.50	16.50	16.50	16.50
Fibra cruda	2.43	3.07	3.85	4.62	5.34
Calcio	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Fósforo disponible	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Lisina	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
Metionina+Cistina	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
Triptófano	0.20	0.18	0.18	0.18	0.18
Treonina	0.61	0.60	0.60	0.60	0.61
Nutrimento analizado (PC%)					
Lote 1 Xilanasa 0%	17.79	17.74	17.99	16.93	16.79
Lote 1 Xilanasa 0.05% ^{§§}	16.89	17.51	17.70	17.63	17.68
Lote 2 Xilanasa 0%	17.84	17.55	17.14	17.44	17.06
Lote 2 Xilanasa 0.05% ^{§§}	18.10	17.97	16.85	17.43	17.44

[†]GSDS= granos secos de destilería con solubles. [‡]Las dietas con los cinco niveles de GSDS eran sin y con enzima. [§]Porcentaje de pureza; ^b38%= calcio; ^a18%= fósforo y 21%= calcio. ^{††}Aporta por kilogramo de alimento: vitamina A, 9000 UI; vitamina D₃, 2500 UI; vitamina E, 20 UI; vitamina K, 3.0 mg; vitamina B₂, 8.0 mg; vitamina B₁₂, 0.015 mg; ácido pantoténico, 10 mg; ácido nicotínico, 60 mg; niacina, 40 mg; ácido fólico, 0.5 mg; colina (cloruro de colina), 300 mg; D-biotina, 0.055 mg; tiamina, 2.0 mg; hierro, 65.0 mg; zinc, 100 mg; manganeso, 100 mg; cobre, 9.0 mg; selenio, 0.3 mg; yodo, 0.9 mg. ^{‡‡}FNDARFP= Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero; Precio mercado en México 20 diciembre 2019, MXN \$ por USD = 18.70. ^{§§}Xilanasa (EC 3.2.1.8), 40000 UI g⁻¹, proveedor DUPONT-DANISCO ANIMAL NUTRITION, México; EM, energía metabolizable; PC, proteína cruda. [♦]†(DDGS) GSDS = distillers dried grains with solubles. Xilanasa = xylanase. [‡]The diets with the five levels of DDGS were without and with enzyme. [§]Purity percentage; ^b38%= calcium; ^a18%= phosphorus and 21%= calcium. ^{††}Contributes per kilogram of food: vitamin A, 9000 IU; vitamin D₃, 2500 IU; vitamin E, 20 IU; vitamin K, 3.0 mg; vitamin B₂, 8.0 mg; vitamin B₁₂, 0.015 mg; pantothenic acid, 10 mg; nicotinic acid, 60 mg; niacin, 40 mg; folic acid, 0.5 mg; choline (choline chloride), 300 mg; D-biotin, 0.055 mg; thiamine, 2.0 mg; iron, 65.0 mg; zinc, 100 mg; manganese, 100 mg; copper, 9.0 mg; selenium, 0.3 mg; iodine, 0.9 mg. ^{‡‡}FNDARFP= Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero; Market price in Mexico December 20, 2019, MXN \$ per USD = 18.70. ^{§§}Xylanase (EC 3.2.1.8), 40000 UI g⁻¹, DUPONT-DANISCO ANIMAL NUTRITION supplier, Mexico; EM, metabolizable energy; PC, crude protein.

Durante el experimento se utilizaron dos lotes de GSDS del mismo proveedor y se hizo un muestreo al azar de cada lote para determinar contenido de proteína y aminoácidos por medio de la ecuación de calibración NIRS (Cuadro 3).

Variables productivas

Durante la crianza las variables de respuesta fueron: alimento consumido por ave (AC, g d⁻¹) semanal, peso vivo (PV, g) catorcenal y ganancia de peso (GP, g) catorcenal, conversión alimenticia (CA, kg alimento por GP). En la etapa de postura se midió cada semana desde la semana 21 a 73: alimento consumido por gallina (AC, g d⁻¹), conversión alimenticia (CA, kg de alimento por kg de huevo), porcentaje de postura (PP), masa de huevo de gallina (MH, g d⁻¹), peso del huevo (PH, g d⁻¹). Por último, se cuantificó el total de kg de huevo producido por ave (KHP, durante 364 d).

Variables de madurez sexual

De la semana 18 a 21 se evaluó madurez sexual con las siguientes variables: peso vivo de las aves (PV, g), edad al primer huevo (EPH, d), peso del primer huevo (PPH, g), edad del ave a 50% de postura (EAP, d) y peso del huevo al 50% de postura (PHP, g).

Variables de calidad de huevo

Para medir la calidad del huevo se tomaron cinco huevos por repetición de cada tratamiento en la semana 23, 47 y 72 del experimento, y se midió: la altura de albúmina (AA), unidades Haugh (UH) con un equipo Egg Multi Tester (QCM System, Technical Services y Supplies, Dunnington, Reino Unido), pigmentación de la yema (CY) con un aparato automático SSQ[®] que mide la coloración de la yema con base al abanico de DSM para yema y grosor de cascarón (GC), y para medir esta variable se utilizó un tornillo micrométrico.

Costo de una polla y costo de un kg de huevo

El costo de la polla (CP) se determinó al multiplicar el consumo de alimento por el costo de las dietas, mientras que el costo de un kg de huevo producido (CKHP) se calculó con la conversión alimenticia y el precio unitario de las dietas. En ambas variables el costo se expresó solo por concepto de alimentación.

Análisis estadístico

Para las variables de madurez sexual, costo de polla y KHP el diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo

Cuadro 3. Análisis de aminoácidos de los GSDS.
Table 3. Amino acid analysis of GSDS (DDGS).

Materia seca (%)	89.53	90.37
Aminoácidos	Lote 1 (%)	Lote 2 (%)
Metionina	0.553	0.577
Cistina	0.552	0.566
Metionina+Cistina	1.105	1.143
Lisina	0.840	0.807
Treonina	1.063	1.053
Triptófano	0.231	0.225
Arginina	1.245	1.282
Isoleucina	1.033	1.059
Leucina	3.314	3.368
Valina	1.365	1.396
Histidina	0.739	0.749
Fenilalanina	1.398	1.420

Productive variables

During rearing the response variables were feed consumed per hen (AC, g d⁻¹) weekly, fortnightly (every two weeks) live weight (PV, g) and fortnightly weight gain (GP, g), feed conversion (CA, kg feed per GP). In the laying stage, the following were measured each week from week 21 to 73: feed consumed per hen (AC, g d⁻¹), feed conversion (CA, kg feed per kg egg), laying percentage (PP), hen egg mass (MH, g d⁻¹), egg weight (PH, g d⁻¹). Finally, the total kg of egg produced per bird (KHP, for 364 d) was quantified.

Sexual maturity variables

From week 18 to 21, sexual maturity was evaluated with the following variables: live weight of the birds (PV, g), age at first egg (EPH, d), weight of the first egg (PPH, g), age of the bird at 50% of laying (EAP, d) and weight of the egg at 50% of laying (PHP, g).

Egg quality variables

To measure egg quality, five eggs per replicate were taken from each treatment at 23, 47 and 72 weeks of the experiment and the following was measured: albumen height (AA), Haugh units (UH) with an Egg Multi Tester (QCM System, Technical Services and Supplies, Dunnington, UK), yolk pigmentation (CY) with an automatic SSQ[®] device that measures yolk coloration based on the DSM yolk fan and eggshell thickness (GC), and a micrometer screw was used to measure this variable.

factorial 5 x 2 y los datos se analizaron con el PROC GLM del SAS (SAS Institute, Inc., 2011).

Para las variables desempeño productivo de la crianza y la postura, el CKHP y calidad de huevo el diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 5 x 2. El análisis de varianza se realizó con el procedimiento MIXED de SAS. Las diferencias ($p \leq 0.05$) entre medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey (SAS Institute, Inc., 2011).

RESULTADOS Y DISCUSION

Variables de madurez sexual

La adición de los GSDS no causó diferencias en los resultados de madurez sexual para PV ($p > 0.05$) entre tratamientos (Cuadro 4). El manual de la línea Bovans White (Hendrix Genetics, 2015) recomendaba un PV mínimo de 1229 kg y máximo de 1292 kg a las 18 semanas. Las aves de nuestro estudio estuvieron dentro de dicho intervalo, lo cual indica que las concentraciones de GSDS cubrieron los requerimientos nutrimentales de las pollas. Para alcanzar la madurez sexual se requieren los nutrientes adecuados para un buen desarrollo corporal, el emplumado y formación del aparato reproductivo, y evitar una reducción en su crecimiento (Braz *et al.*, 2011).

Cost per one pullet and cost per one kg of egg

The cost of the pullet (CP) was determined by multiplying feed consumption by the cost of the diets, while the cost of one kg of egg produced (CKHP) was calculated with feed conversion and the unit price of the diets. In both variables the cost was expressed for feed only.

Statistical analysis

For the variables of sexual maturity, pullet cost and KHP, the experimental design was completely randomized with a 5 x 2 factorial arrangement and the data were analyzed with PROC GLM of SAS (SAS Institute, Inc., 2011).

For the variables of productive performance at rearing and laying, CKHP and egg quality, the experimental design was completely randomized with a 5 x 2 factorial arrangement. Differences ($p \leq 0.05$) among treatment means were compared with Tukey test (SAS Institute, Inc., 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Sexual maturity variables

The addition of DDGS caused no differences in sexual maturity results for PV ($p > 0.05$) among

Cuadro 4. Influencia de los niveles de GSDS y xilanasa en la madurez sexual de gallinas Bovans White en etapas de postura.
Table 4. Influence of GSDS (DDGS) and xylanase levels on sexual maturity of Bovans White laying hens.

GSDS (%)	PV (g)	EPH (d)	PPH (g)	EAP (d)	PHP (g)
0	1297	144	38.4	155	44.9
8	1272	144	40.0	153	44.7
16	1268	147	39.5	154	44.9
24	1281	143	38.2	152	44.2
32	1268	142	38.4	152	45.3
EEM	2.51	0.56	0.16	0.40	0.11
Xilanasa (%)					
0	1286.8	145.1	38.9	154	44.8
0.05	1267.3	143.5	38.8	153	44.8
EEM	2.75	0.22	0.05	0.04	0.02

PV, peso vivo; EPH, edad al primer huevo; PPH, peso del primer huevo; EAP, edad del ave al 50% de postura; PHP, peso del huevo al 50% de postura; GSDS, granos secos de destilería con solubles. EEM, error estándar de la media. ♦PV, live weight; EPH, age at first egg; PPH, first egg weight; EAP, age of bird at 50% of laying; PHP, egg weight at 50% of laying; GSDS, distillers dried grains with solubles; xilanasa = xylanase; EEM, standard error of the mean.

La inclusión de los GSDS no modificó la EPH y PPH ($p>0.05$) con un promedio de 144 d y 40 g respectivamente. Estos resultados no coincidieron con el manual ISA (Hendrix Genetics, 2015) el cual mencionaba que las aves rompen postura en la semana 19 con un PPH de 43.7 g. En EAP no hubo diferencias ($p>0.05$), con una media de 152 a 155 d, lo cual coincidió con lo reportado en el manual de la línea, pero el PHP (45.3 g) fue 4.2 g menor respecto a la guía Bovans White. Estas diferencias en EPH, PPH y PHP se atribuyeron a los contrastes de ingesta de PC y EM en las dietas de cada investigación (Li *et al.*, 2013).

La inclusión exógena de xilanasa no cambió ($p>0.05$) las variables de madurez sexual. Durante la crianza la actividad enzimática se debe a los ingredientes de la dieta, así como su contenido de PNA (Slominski, 2011), lo cual sugiere que durante esta etapa la adición de xilanasa en dietas con sorgo, pasta de soya y GSDS, no resultó un beneficio para esas variables.

Variables productivas

La adición de los GSDS no causó diferencias en AC ($p>0.05$) durante la crianza (Cuadro 5) y la postura (Cuadro 6) lo cual se atribuyó a que las dietas eran isoenergéticas, y las aves ajustaron su consumo de alimento al nivel de energía que requerían (Lesson y Summers, 2005). La enzima no influyó en el AC ($p>0.05$) durante la crianza, pero en la postura tuvo un efecto positivo al disminuir el AC en 0.75% ($p\leq 0.05$), porque las enzimas liberan energía adicional bloqueada por arabinoxilanos (AX) (Abd El-Hack *et al.*, 2019).

Durante la postura en AC hubo diferencias ($p\leq 0.05$) como resultado de la interacción GSDS x xilanasa. El valor más alto de ingesta diaria fue con la combinación de 0, 8 y 32% de GSDS y 0% enzima, mientras que el consumo menor se encontró con 0, 16, 24 y 32% de GSDS y 0.05% de enzima. Entonces, durante la postura la xilanasa ayudó a disminuir el AC en dietas con base en sorgo-pasta de soya y sorgo-pasta de soya-GSDS.

Los niveles de GSDS no causaron diferencias ($p>0.05$) en PV durante la crianza (Cuadro 5), debido a la influencia de la concentración energética de las dietas (Cuadro 1 y 2) (Lesson y Summers, 2005). La enzima tampoco influyó ($p>0.05$) en el PV porque

treatments (Table 4). The Bovans White line manual (Hendrix Genetics, 2015) recommended a minimum PV of 1229 kg and a maximum of 1292 kg at 18 weeks. The birds in our study were within this range, which indicates that the DDGS concentrations covered the nutritional requirements of the pullets. In order to reach sexual maturity, adequate nutrients are required for good body development, feathering and formation of the reproductive apparatus, and to avoid a reduction in growth (Braz *et al.*, 2011).

The addition of DDGS did not modify EPH and PPH ($p>0.05$) with an average of 144 d and 40 g respectively. These results did not match the ISA manual (Hendrix Genetics, 2015), which indicated that birds break laying at week 19 with a PPH of 43.7 g. In EAP, there were no differences ($p>0.05$), with a mean of 152 to 155 d, which matched what was reported in the line manual, but the PHP (45.3 g) was 4.2 g lower with respect to the Bovans White guide. These differences in EPH, PPH and PHP were attributed to the contrasting CP and ME intakes in the diets of each research (Li *et al.*, 2013).

The exogenous inclusion of xylanase did not change ($p>0.05$) sexual maturity variables. During rearing, the enzyme activity is due to the diet ingredients, as well as its PNA content (Slominski, 2011), suggesting that during this stage the addition of xylanase in diets with sorghum, soybean paste and DDGS, was not a benefit for those variables.

Productive variables

The addition of DDGS did not cause difference in AC ($p>0.05$) during rearing (Table 5) nor laying (Table 6), which was attributed to the fact that the diets were isoenergetic, and the birds adjusted their feed intake to the energy level they required (Lesson and Summers, 2005). The enzyme did not influence AC ($p>0.05$) during rearing, but in laying it had a positive effect by decreasing AC by 0.75% ($p\leq 0.05$), because enzymes release additional energy blocked by (AX) arabinoxylans (Abd El-Hack *et al.*, 2019).

During laying, there were differences ($p\leq 0.05$) in AC as a result of the (DDGS) GSDS x xylanase interaction. The highest value of daily intake was with the combination of 0, 8, and 32% DDGS and 0% enzyme, while the lowest intake was found with 0, 16, 24, and 32% DDGS and 0.05% enzyme. Thus, during laying, xylanase helped to decrease AC in

Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados del análisis de varianza en pollas Bovans White, durante 18 semanas de experimentación (%).**Table 5. Least square means of the analysis of variance in Bovans White pullets, during 18 weeks with experimental diets.**

Tratamientos	AC (g)	PV (g)	GP (g)	CA	CPP
GSDS %					
0	337.3	758.4	121.7	3.25	30.24b
8	342.6	748.1	116.1	3.38	30.23b
16	343.6	751.3	116.2	3.49	30.84ab
24	340.3	751.1	119.3	3.23	31.03ab
32	337.7	741.4	116.6	3.73	31.48a
EEM	3.40	4.04	1.58	0.21	0.13
Xilanasa %					
0	340.9	747.9	117.2	3.50	32.34
0.05	342.4	752.2	118.8	3.33	32.51
EEM	1.39	2.20	1.0	0.13	0.91
Interacciones					
GSDS x xilanasa	NS	p≤0.058	NS	NS	NS

Medias con letra distinta entre columna son diferentes ($p \leq 0.05$). AC, alimento consumido; PV, peso vivo; GP, ganancia de peso; CA, conversión alimenticia; CPP, costo de producción por polla; EEM, error estándar de la media; GSDS, granos secos de destilería con solubles; NS, no significativo ($p > 0.05$). ♦ Means with different letter among rows are different ($p \leq 0.05$). AC, feed consumed; PV, live weight; GP, weight gain; CA, feed conversion; CPP, cost of production per pullet; EEM, standard error of the mean; GSDS, distillers dried grains with solubles; xilanasa = xylanase; NS, not significant ($p > 0.05$).

Cuadro 6. Efecto de los niveles (%) de granos secos de destilería con solubles y xilanasa en el comportamiento productivo de gallinas Bovans White en 22 a 73 semanas con dietas experimentales.**Table 6. Effect of levels (%) of distillers dried grains with solubles and xylanase on productive behavior of Bovans White hens during 22 to 73 weeks with experimental diets.**

GSDS (%)	AC Ave d ⁻¹ g ⁻¹	PP (%)	PH (g)	CA (g)	MH (g)	KHP (kg)	CKHP \$
0	106.8	92.2a	59.9abc	1.9b	55.3a	20.145a	10.00d
8	107.1	91.3ab	60.3a	1.9b	55.1ab	20.031a	10.14c
16	106.3	90.6bc	60.20ab	1.9b	54.4bc	19.815a	10.23c
24	105.7	90.2bcd	59.2cd	1.9b	53.4d	19.472ab	10.44b
32	106.6	87.5e	58.8d	2.1a	51.1e	18.736b	11.04a
EEM	0.36	0.58	0.31	0.02	0.33	0.64	0.03
Xilanasa (%)							
0	106.9a	89.7b	59.8a	2.0a	53.6a	20.160a	10.47a
0.05	106.1b	91.0a	59.5a	1.9b	54.3b	19.861a	10.27b
EEM	0.23	0.36	0.19	0.01	0.20	0.40	0.08
Interacción							
GSDS x xilanasa	p≤0.05	p≤0.05	NS	NS	NS	NS	NS

Medias con letra distinta entre columna son diferentes ($p \leq 0.05$). GSDS, granos secos de destilería con solubles; AC, alimento consumido; PP, porcentaje de postura; PH, peso de huevo; CA¹, Conversión alimenticia, (g alimento g⁻¹ huevo); MH, masa de huevo; KHP, kg de huevo producido; CKHP, costo de un kg de huevo producido. EEM, error estándar de la media; NS, no significativo ($p > 0.05$). ♦ Means with different letters among rows are different ($p \leq 0.05$). GSDS, distillers dried grains with solubles; xilanasa = xylanase; AC, feed consumed; PP, percentage of laying; PH, egg weight; CA, Feed conversion, (g feed g⁻¹ egg); MH, egg mass; KHP, kg egg produced; CKHP, cost of one kg of egg produced. EEM, standard error of the mean; NS, not significant ($p > 0.05$).

durante la crianza la eficiencia de la enzima depende del contenido de PNA de los ingredientes sobre los que ésta actuará (Slominski, 2011).

Durante la crianza los niveles de GSDS no cambiaron ($p>0.05$) la GP (Cuadro 5), lo cual se atribuyó a la calidad de la proteína de los GSDS (contenido y estabilidad de aminoácidos) (Cuadro 3). Esto se logra con las nuevas y mejores técnicas de extracción de etanol en las instalaciones modernas, que se relacionan con un secado más suave al no utilizar temperaturas elevadas causantes de la unión del grupo amino al aldehído. Eso resultaba en la formación un compuesto complejo el cual hacía indigerible la proteína para el ave (Światkiewicz *et al.*, 2013). La xilanasa tampoco modificó la GP porque el PV no varió, de acuerdo con Oliveira *et al.* (2019) quienes no encontraron que la enzima modificara estas variables en pollas de 7 a 17 semanas.

En PV se encontró diferencia ($p\leq 0.05$) en la interacción GSDS $\times$ xilanasa y el valor más bajo se detectó al utilizar 8 y 32% de GSDS sin enzima. Respecto al primer nivel Abd El-Hack (2015; 2019) mostró que al añadir menos del 10% de GSDS con enzimas esta variable no cambió. En cuanto al nivel de 32% sin enzima, el bajo PV se atribuyó al contenido de fibra alto de las dietas (Cuadro 1). En conclusión, la adición de este nivel de la enzima ya no mejoró la digestibilidad de los nutrientes.

En PP las gallinas alimentadas con 0 y 8% de GSDS tuvieron el mejor PP y al aumentar su nivel en la dieta (16, 24 y 32%), la producción de huevo tuvo decrementos respectivos de 1.7, 2.1 y 5.0% ($p\leq 0.05$) en comparación con el control (Cuadro 6). Esto se atribuye a que el aumento del nivel de GSDS incrementó la fibra en las dietas (Cuadro 2) y con ello los PNS, lo cual aumentó la viscosidad de la digesta y disminuyó la absorción de nutrientes (Abd El-Hack *et al.*, 2017). Lo anterior coincide con Deniz *et al.* (2013), quienes encontraron que el PP disminuyó con 15.5 y 20% de GSDS porque en ambos experimentos el contenido de fibra aumentó (Cuadro 2) al adicionar los GSDS. La inclusión de xilanasa en las dietas mejoró el PP en 1.4% ($p\leq 0.05$) porque la función de la enzima es romper la pared celular de los arabinoxilanos e hidrolizarlos en arabinosa y xilosa, lo cual significa disponibilidad de energía (Khusheeba y Maqsood, 2013). Esto no coincide con Abd El-Hack *et al.* (2017) quienes no encontraron diferencias en PP al adicionar enzimas, debido a que ellos

diets based on sorghum-soybean paste and sorghum-soybean paste with DDGS.

DDGS levels did not cause differences ($p>0.05$) in PV during rearing (Table 5), due to the influence of the energy concentration of the diets (Table 1 and 2) (Lesson and Summers, 2005). The enzyme neither influenced ($p>0.05$) on PV because during rearing the efficiency of the enzyme depends on the PNA content of the ingredients on which it will act (Slominski, 2011).

During rearing, DDGS levels did not change ($p>0.05$) GP (Table 5), which was attributed to the protein quality of the DDGS (amino acid content and stability) (Table 3). This is achieved by new and improved ethanol extraction techniques in modern facilities, which are related to lighter drying with not so high temperatures that would cause binding of the amino group to the aldehyde. That resulted in the composition of a complex compound making the protein indigestible to the bird (Światkiewicz *et al.*, 2013). Xylanase also did not modify GP because PV did not vary, according to Oliveira *et al.* (2019) who did not find that the enzyme modified these variables in 7- to 17-week-old pullets.

In PV, difference ($p\leq 0.05$) was found in the (DDGS) GSDS $\times$ xylanase interaction and the lowest value was detected when using 8 and 32% DDGS without enzyme. Regarding the first level Abd El-Hack (2015; 2019) showed that when adding less than 10% DDGS with enzymes this variable did not change. In regard to the 32% level without enzyme, the low PV was attributed to the high fiber content of the diets (Table 1). It could be concluded that the addition of this level of enzyme no longer improved nutrient digestibility.

In PP, the hens fed with 0 and 8% DDGS had the best PP and as their level in the diet increased (16, 24 and 32%), egg production decreased 1.7, 2.1, and 5.0% respectively ($p\leq 0.05$) compared to the control (Table 6). This is attributed to the fact that increasing the level of DDGS increased fiber in the diets (Table 2) and PNS, which increased digesta viscosity and decreased nutrient absorption (Abd El-Hack *et al.*, 2017). The aforementioned agrees with Deniz *et al.* (2013), who found that PP decreased with 15.5 and 20% DDGS because in both experiments, fiber content increased (Table 2) upon addition of DDGS. The inclusion of xylanase in the diets improved PP by 1.4% ($p\leq 0.05$) because the function of the

utilizaron otra enzima y concentraciones diferentes a las de nuestra investigación.

En PP la interacción GSDS $\times$ xilanasa fue significativa ($p \leq 0.05$) y la combinación de 0, 8, 16 y 24% con xilanasa mejoró esta variable, mientras que disminuyó con 8, 16, 24 y 32% sin enzima. Por lo tanto, se puede concluir que la xilanasa hidrolizó enlaces de hidratos de carbono hasta 24% de GSDS para aumentar la disponibilidad y mejorar la producción de huevo (Khusheeba y Maqsood, 2013).

Los niveles de GSDS 0, 8, 16 y 24% no afectaron el PH, pero al incluir 32% de GSDS el PH disminuyó 1.1 g ($p \leq 0.05$) (Cuadro 6). Esto no coincide con Abd El-Hack *et al.* (2019), quienes al añadir 6, 12 y 18% de GSDS encontraron que el PH disminuyó respecto al control. Esto sucedió porque al agregar los GSDS aumentó el AC y con ello el contenido de FC (Cuadro 2), lo cual incrementó la pérdida endógena de nitrógeno y se redujo la digestibilidad aparente de las proteínas, un factor importante para PH. En cambio, nuestros resultados no mostraron diferencias de AC entre tratamientos. La suplementación enzimática no influyó en el PH ($p > 0.05$) lo cual coincide con Ghazalah *et al.* (2011) quienes adicionaron enzimas en dietas con 7, 15 y 23% y el PH no mejoró porque no aumentó el coeficiente de digestibilidad de PC. Así, en nuestra investigación, la xilanasa utilizada no influyó en la digestibilidad de PC.

Los niveles de GSDS no modificaron la CA ($p > 0.05$) durante la crianza (Cuadro 5) porque no hubo diferencias en AC y GP. Pero en la postura 32% de GSDS tuvo un efecto negativo en CA al aumentar 5% ($p \leq 0.05$) (Cuadro 6) respecto al control. Esta variable se obtiene al dividir el AC y el PH, y la variable CA se afectó al disminuir el PH en 2.5% y con 32% de GSDS. Deniz *et al.* (2013) encontraron que más de 20% de GSDS redujo el PH y AC, lo cual empeoró la CA. La xilanasa modificó positivamente la CA al disminuirla en 5% ($p \leq 0.05$) y esto se atribuye a que la enzima disminuyó el AC ($p \leq 0.05$). Abd El Hack *et al.* (2015) incluyeron 0, 25, 50 y 75% de GSDS y 0 y 250 mg kg⁻¹ de un cóctel de enzimas Gallazyme® (β -glucanasa, xilanasa, celulasa, proteasa y amilasa) y encontraron que la CA no se modificó.

A partir de 16% de GSDS la MH se redujo ($p \leq 0.05$) respecto al control (Cuadro 6), lo cual coincide con Abd El-Hack *et al.* (2019) quienes encontraron que 18% de GSDS tuvo un efecto negativo

enzyme is to break the cell wall of arabinoxylans hydrolyzing them into arabinose and xylose, which means energy availability (Khusheeba and Maqsood, 2013). This does not agree with Abd El-Hack *et al.* (2017) who did not found difference in PP when adding enzymes, because they used another enzyme and different concentrations to those in our research.

In PP the (DDGS) GSDS $\times$ xylanase interaction was significant ($p \leq 0.05$) and the combination of 0, 8, 16 and 24% with xylanase improved this variable, while it decreased with 8, 16, 24, and 32% without enzyme. Therefore, it can be concluded that xylanase hydrolyzed carbohydrate-bonds up to 24% DDGS to increase availability and improve egg production (Khusheeba and Maqsood, 2013).

DDGS levels 0, 8, 16, and 24% did not affect PH, but by including 32% DDGS PH decreased 1.1 g ($p \leq 0.05$) (Table 6). This did not concur with Abd El-Hack *et al.* (2019), who found that PH decreased compared to the control when adding 6, 12, and 18% DDGS. This happened because adding DDGS increased the AC and with it the FC content (Table 2), which also increased endogenous nitrogen loss, and reduced apparent protein digestibility, an important factor for PH. In contrast, our results showed no difference in AC among treatments. Enzyme supplementation did not influence PH ($p > 0.05$) which agrees with Ghazalah *et al.* (2011) who added enzymes in diets with 7, 15, and 23% and PH did not improve because the coefficient of PC digestibility did not increase. Thus, in our research, the xylanase used did not influence PC digestibility.

DDGS levels did not modify CA ($p > 0.05$) during rearing (Table 5) because there was no difference in AC and GP. But at laying, 32% DDGS had a negative effect on CA by increasing 5% ($p \leq 0.05$) (Table 6) compared to the control. This variable is obtained by dividing AC and PH, and the variable CA was affected by decreasing PH by 2.5% and with 32% DDGS. Deniz *et al.* (2013) found that more than 20% DDGS reduced PH and AC, which made CA even worse. Xylanase positively modified CA by decreasing it by 5% ($p \leq 0.05$) and this was explained because the enzyme decreased AC ($p \leq 0.05$). Abd El Hack *et al.* (2015) included 0, 25, 50, and 75% DDGS and 0 and 250 mg kg⁻¹ of a Gallazyme™ enzyme cocktail (β -glucanase, xylanase, cellulase, protease and amylase) and found that CA was not modified.

en MH, y en ambas investigaciones disminuyó el PP y PH, variables con las cuales se obtiene MH. Pero al agregar xilanasa la MH mejoró ($p \leq 0.05$) (Cuadro 6), ya que la enzima ayudó a mejorar PP, pero no PH; esto indica que la energía liberada por la enzima de los PNA fue suficiente para favorecer la MH (Leeson y Summers, 2005).

El KHP se redujo con 32% de GSDS ($p \leq 0.05$) (Cuadro 6) respecto al control, con una diferencia de 1409 kg por ave alojada, lo cual sugiere que la inclusión de GSDS no cubrió los requerimientos nutricionales que las aves necesitaban, para mantener el PP, PH, MH y AC. La adición de la xilanasa a la dieta de las gallinas no modificó el KHP ($p > 0.05$); esto se esperaba, porque de manera similar la enzima no aumentó el PH (Cuadro 6).

Costo de polla y costo de un kg de huevo

La adición de los GSDS aumentó el costo de producción ($p \leq 0.05$) de una polla de recría (Cuadro 5) y el CKHP (Cuadro 6), lo cual se justifica con el precio alto de los GSDS en el año 2019 en México (FNDARFP, 2019) y la mala CA. Investigaciones de Mas'adeh *et al.* (2011) y Abd El-Hack *et al.* (2015) demostraron que el uso de GSDS en la avicultura disminuía el costo de las dietas porque el precio de este subproducto era bajo; pero desde el 2019 la demanda aumentó el valor de GSDS. La inclusión de la enzima durante la crianza no disminuyó el costo de producción de las pollas ($p > 0.05$) porque no se encontraron diferencias en CA, pero sí disminuyó el CKHP ($p \leq 0.05$) debido a que éste tuvo una influencia positiva en la CA.

Calidad de huevo

Los niveles de GSDS en la dieta y la adición de la enzima no tuvieron efecto en AA y GC ($p > 0.05$) (Cuadro 7). Mas'adeh *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares con 25% de GSDS e indicaron que no hubo cambios en AA y GC. Los tratamientos con 16, 24 y 32% de GSDS causaron un aumento positivo ($p \leq 0.05$) en UH (Cuadro 7) y ésta disminuyó con 0 y 8% de GSDS. La mejora de UH se atribuye a que los GSDS son deficientes en lisina, lo cual llevó al aumento de lisina sintética en las dietas (Cuadro 2). Cantidades altas de lisina cambiaron las concentraciones de proteína y sólidos totales

At 16% DDGS and on, MH was reduced ($p \leq 0.05$) respect to the control (Table 6), which agrees with Abd El-Hack *et al.* (2019) who found that 18% DDGS had a negative effect on MH, and in both studies PP and PH decreased; these are variables from which MH is obtained. However, adding xylanase improved MH ($p \leq 0.05$) (Table 6), since the enzyme helped to improve PP, but not PH; this indicates that the energy released by the enzyme from PNA was enough to favour MH (Leeson and Summers, 2005).

KHP was reduced with 32% DDGS ($p \leq 0.05$) (Table 6) regarding the control, with a difference of 1409 kg per hen, suggesting that the inclusion of DDGS did not cover the nutritional requirements that the birds needed to maintain PP, PH, MH and AC. The addition of xylanase to the diet for hens did not modify KHP ($p > 0.05$); this was expected, because the enzyme similarly did not increase PH (Table 6).

Cost per pullet and cost per one kg of egg

The addition of DDGS increased the cost of production ($p \leq 0.05$) of a rearing pullet (Table 5) and CKHP (Table 6), which is justified with the high price of DDGS in 2019 in Mexico (FNDARFP, 2019) and poor CA. Research by Mas'adeh *et al.* (2011) and Abd El-Hack *et al.* (2015) showed that the use of DDGS in poultry farming decreased the cost of diets because the price of this by-product was low; but since 2019 the demand increased the value of DDGS. The inclusion of the enzyme during rearing did not decrease the production cost of pullets ($p > 0.05$) because no difference in CA was found, but the added enzyme did decrease CKHP ($p \leq 0.05$) because it had a positive influence on CA.

Egg quality

The levels of DDGS in the diet and the addition of the enzyme had no effect on AA and GC ($p > 0.05$) (Table 7). Mas'adeh *et al.* (2011) obtained similar results with 25% DDGS and indicated that there was no change in AA and GC. Treatments with 16, 24 and 32% DDGS caused a positive increase ($p \leq 0.05$) in UH (Table 7) and it decreased with 0 and 8% DDGS. The improvement in UH is attributed to DDGS being deficient in lysine, which led to the

Cuadro 7. Efecto de los niveles de granos secos de destilería con solubles y xilanasa en la calidad de huevo de gallinas Bovans White en 23, 47 y 72 semanas de experimentación.

Table 7. Effect of levels of distillers dried grains with solubles and xylanase on egg quality of Bovans White hens at 23, 47, and 72 weeks with experimental diet.

GSDS (%)	AA (mm)	GC (micrones)	UH	CY
0	7.3	456	82.9bcd	4.2e
8	7.2	463	81.3d	6.0d
16	7.1	466	83.9a	6.7c
24	7.0	456	83.2abc	7.5b
32	7.0	460	83.7ab	8.0a
EEM	0.27	0.12	0.61	0.09
Xilanasa (%)				
0	7.3	462	84.4a	6.83a
0.05	7.0	459	81.5b	6.21b
EEM	0.17	0.07	0.38	0.05

GSDS, granos secos de destilería con solubles; AA, altura de albúmina; GC, grosor de cascarón; UH, unidades Haugh; CY, color de yema, Escala de Roche. Medias con letra distinta entre columna son diferentes ($p \leq 0.05$). EEM, error estándar de la media. ♦ DDGS, distillers dried grains with solubles; xilanasa = xylanase; AA, albumen height; GC, shell thickness; UH, Haugh units; CY, yolk color, Roche Scale. Means with different letter among rows are different ($p \leq 0.05$). EEM, standard error of the mean.

de los componentes del huevo, lo cual sugiere que este aminoácido sintético tiene efectos positivos en el estado físico de la albúmina del huevo (Sun, 2013).

La adición de xilanasa tuvo un efecto negativo las UH ($p \leq 0.05$), lo cual no coincide con Abd El-Hack *et al.* (2015) quienes reportaron que al incluir un suplemento enzimático las UH mejoran. Pero Ghazalah *et al.* (2011) no encontraron efecto en las UH del huevo al añadir la enzima en la dieta de aves.

El CY mostró un aumento lineal en la escala de Roche al incrementar los niveles de GSDS en la dieta ($p \leq 0.05$; Cuadro 7), pues como coproducto los GSDS concentraron los pigmentos del maíz (xantofilas) (Yildiz *et al.*, 2018; Niemiec *et al.*, 2013) y esto ayudó a disminuir el pigmento sintético en la dieta y con ello su precio. El CY disminuyó ($p \leq 0.05$) con la adición de xilanasa, para lo cual no se encontró información que lo sustente. Abd El-Hack *et al.* (2019) encontraron que la adición de xilanasa mejoró la pigmentación del huevo, para lo cual utilizaron la escala de color hunter L, a, b, con un medidor de color Minolta®; al respecto, en nuestro estudio el aparato utilizado se basa en la escala de Roche con el Egg Multi Tester.

increase in synthetic lysine in the diets (Table 2). High amounts of lysine changed the protein and total solids concentrations of egg components, suggesting that this synthetic amino acid has positive effects on egg albumen fitness (Sun, 2013).

The addition of xylanase had a negative effect on UH ($p \leq 0.05$), which does not agree with Abd El-Hack *et al.* (2015) who reported that including an enzyme supplement improved UH. But Ghazalah *et al.* (2011) found no effect on egg UH by adding the enzyme to the poultry diet.

CY showed a linear increase on the Roche scale by increasing DDGS levels in the diet ($p \leq 0.05$; Table 7), since as a co-product DDGS concentrated corn pigments (xanthophylls) (Yildiz *et al.*, 2018; Niemiec *et al.*, 2013) and this helped to decrease the synthetic pigment in the diet and thus its price. CY decreased ($p \leq 0.05$) with the addition of xylanase, for which no supporting data was found. Abd El-Hack *et al.* (2019) found that the addition of xylanase improved egg pigmentation, for which they used the hunter color scale L, a, b, with a Minolta™ color meter; in this regard, in our study the equipment used is based on the Roche scale with the Egg Multi Tester.

CONCLUSIONES

En la etapa de crianza se pueden utilizar hasta 32% de granos secos de destilería con solubles sin afectar las variables productivas y la madurez sexual, por lo cual podrían ser una alternativa en los períodos de escasez de pasta de soya. La xilanasa no debe usarse en las pollas cuando la dieta es con base en granos secos de destilería, pasta de soya y sorgo, porque no influyó en las variables productivas, la madurez sexual y no disminuyó el costo de la polla.

Para la etapa de postura se puede incluir hasta 8% de granos secos de destilería en la dieta, porque niveles mayores mostraron efectos negativos sobre las variables productivas y aumentaron el costo de producción de huevo. La adición de xilanasa mejoró la respuesta productiva del alimento consumido, porcentaje de postura, conversión alimenticia y masa de huevo; además indujo un beneficio económico.

Respecto a calidad huevo, la inclusión de los granos secos de destilería y la xilanasa en la dieta tuvo efecto positivo en las unidades Haugh y el color de la yema.

LITERATURA CITADA

- Abd El-Hack, M. E., M. Alagawany, V. Laudadio, R. Demauero, and V. Tufarelli. 2015. Dietary inclusion of raw faba bean instead of soybean meal and enzyme supplementation in laying hens: Effect on performance and egg quality. *Saudi J. Biolog. Sci.* 1–10.
- Abd El-Hack, M. E., S. A. Mahgoub, M. Alagawany, and E. A. Ashour. 2017. Improving productive performance and mitigating harmful emissions from laying hen excreta via feeding on graded levels of corn DDGS with or without *Bacillus subtilis* probiotic. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 904–913.
- Abd El-Hack, M. E., M. M. Khalid, A. M. Faten, A. A. Swelum, A. E. Taha, R. S. Shewita, O. S. El-Sayed and A. N. Alowaimmer. 2019. Laying performance, physical, and internal egg quality criteria of hens fed distillers dried grains with solubles and exogenous enzyme mixture. *Animals*. 7: 1-17.
- Alagawany, M., Sh. S. Elnesr, and M. R. Farag. 2018. The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. *JVR*. 19: 157-164.
- Braz, N de M., F. Urgencias, R. M. Bezerra, C. E. Cruz, N. N. Farias, N. M. Silva, N. L. Sá, and R. P Xavier. 2011. Fibra na ra'õ de crescimento e seus efeitos no desempenho de poedeiras nas fases de crescimento e postura. *Rev. Brasil. Zootec.* 40: 2744-2753.
- Choct, M. 2015. Feed non-starch polysaccharides for monogastric animals: classification and function. *Anim. Prod. Sci.* 55:1360-1366.
- Cuca, G. M., E. Ávila. G, y A. Pró M. 2009. Alimentación de las Aves. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 37–154.

CONCLUSIONS

In the rearing stage, up to 32% of distillers dried grains with solubles can be used without affecting productive variables and sexual maturity, which could be an alternative in periods of soybean paste shortage. Xylanase should not be used in pullets when the diet is based on distillers dried grains, soybean paste or sorghum paste, because it did not influence productive variables, sexual maturity and did not decrease the cost of the pullet.

At the laying stage, up to 8% of distillers dried grains can be included in the diet, because there was evidence that higher levels caused negative effects on productive variables and increased the cost of egg production. The addition of xylanase improved the productive response of the feed consumed, laying percentage, feed conversion and egg mass; it also induced an economic benefit.

Regarding egg quality, the inclusion of distillers dried grains and xylanase in the diet had a positive effect on Haugh units and yolk color.

—End of the English version—

---*---

- De Blas, C., G. G. Mateos, y P. García-Rebollar. 2019. Tablas FEDNA de Composición y Valor Nutritivo de Alimentos para la Fabricación de Piensos Compuestos (3ª edición). FEDNA, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 502 p.
- Deniz, G., H. Gencoglu, S. Gezena, I. Turkmen, A. Ormanb, and C. Karaa. 2013. Effects of feeding corn distiller's dried grains with solubles with and without enzyme cocktail supplementation to laying hens on performance, egg quality, selected manure parameters, and feed cost. *Livestock Sci.* 152: 174–181.
- Hendrix Genetics. 2015. ISA A Company. <http://www.isapoultry.com/es-ES/Products/Bovans/BovansWhite.aspx> (Consulta: junio 2019).
- FNDARFP. (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural, Forestal y Pesquero). 2019. Precio granos. <https://datos.gob.mx/busca/dataset/precios-de-productos-e-insumos-agropecuarios-y-forestales> (Consulta: mayo 2020).
- Ghazalah, A., M. Abd-Elsamee, and E. Moustafa. 2011. Use of distillers dried grains with soluble as replacement for soybean meal in laying hen diets. *Intl. J. Poult. Sci.* 10: 505–513.

- Khushheba, M., and S. Maqsood. 2013. A review on role of exogenous enzyme supplementation in poultry production. *J. Food Agric.* 25: 66–80.
- Leeson, S., and J. D. Summers. 2005. *Commercial Poultry Nutrition*. 3th ed. University Books, Guelph, Ontario, Canadá. pp: 124–161.
- Li, F., L. M. Zhang, X. H. Wu, C. Y. Li, X. J. Yang, Y. Dong, A. Lemme, J. C. Han, and J. H. Yao. 2013. Effects of metabolizable energy and balanced protein on egg production, quality, and components of Lohmann Brown laying hens. *J. Appl. Poult. Res.* 22: 36–46.
- Liu, K. 2012. *Chemical Composition of DDGS. Distillers Grains: Production, Properties, and Utilization*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp: 143-178.
- Masa'deh, M., E. Purdum, and J. Hanford. 2011. Dried distillers grains with solubles in laying hen diets. *Poult. Sci.* 90: 1960–1966.
- Niemiec, J., J. Riedel, T. Szulc, and M. Stępiński. 2013. Feeding corn distillers dried grains with solubles (ddgs) and its effect on egg quality and performance of laying hens. *Annals Anim. Sci.* 13: 97–107.
- NRC (National Research Council). 1994. *Nutrient requirements of poultry*. National Academy of Sciences. Washington, National Academy Press 2101 Constitution Avenue, NW Washington, D.C. 20418, U.S.A. 176 p.
- Oliveira, A. A., G. Jeronimo, E. Rodrigues, D. Herick and M. Oliveira. 2019. Performance of lightweight replacement pullets fed rations with sunflower cake and the addition of enzymes. *Pesq. Agropec. Bras.* 54: 1-9.
- SAS Institute, Inc. 2011. *Statistical Analysis Software (SAS/STAT)*. Version 9.33 Ed. Cary, NC. USA. 528 pp.
- Slominski, B. A. 2011. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poult. Sci.* 90: 2013-2023.
- Sun, H., E. J. Lee, H. Samaraweera, M. Persia, H. S. Ragheb, and U.A. Dong. 2013. Effects of increasing concentrations of corn distiller's dried grains with solubles on the egg production, internal quality of eggs, chemical composition and nutrients content of egg yolk. *Poult. Sci.* 91: 3236–3246.
- Świątkiewicz, S., A. Włosek, A., J. Krawczyk, M. Puchała, and D. Józefiak. 2013. Effects of selected feed additives on the performance of laying hens given a diet rich in maize dried distiller's grains with solubles (DDGS). *Br. Poult. Sci.* 54: 478–485.
- Yildiz T., N. Ceylan, Z. Atik, E. Karademir and B. Ertekin. 2018. Effect of corn distillers dried grains with soluble with or without xylanase supplementation in laying hen diets on performance, egg quality and intestinal viscosity. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 24: 273-280.

PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN POR SEMILLA DE *Clinopodium mexicanum*, UNA PLANTA MEDICINAL NATIVA DE MÉXICO

PROPAGATION PROTOCOL BY SEED OF *Clinopodium mexicanum*, A NATIVE MEDICINAL PLANT FROM MEXICO

Ana Paola **Silva-Castellanos**¹, Fabiola **Magallán-Hernández**^{1*}, Santiago **Vergara-Pineda**¹,
Olivia **Ramírez-Segura**¹, Mónica **Queijeiro-Bolaños**²

¹Horticultura Ambiental. ²Biología. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Avenida de las Ciencias s/n Juriquilla, Querétaro, Querétaro. 76230 México. (fabiola.magallan@uaq.mx).

RESUMEN

El poleo verde *Clinopodium mexicanum* es una especie nativa de México que tiene demanda en los mercados locales por sus propiedades medicinales. No se encontró información sobre su cultivo, por lo cual el objetivo del presente estudio fue elaborar un protocolo de germinación de su semilla que contribuya al conocimiento de esta especie para su manejo, cultivo, comercialización y conservación. Las muestras se recolectaron en dos poblaciones silvestres del estado de Querétaro, seleccionadas por la disponibilidad de plantas y accesibilidad al lugar. El cáliz persistente y las núculas se caracterizaron morfológicamente, y se evaluó porcentaje de viabilidad y de germinación. El experimento de germinación tuvo como factor la temperatura (T) con tres tratamientos: 28, 21 y 15 °C. La humedad del sustrato (100%), la humedad ambiental (30%) y el fotoperiodo (12:12 h luz/oscuridad) se mantuvieron constantes. Los resultados se analizaron con una prueba de t de Student, un modelo lineal generalizado y dos análisis para germinación (t10 y t50). El cáliz persistente midió en promedio 1.6 × 6.7 mm (anchura × longitud), y peso expresado como 436.5 cálices por gramo; cubierta estriada, con glándulas que presentaron tonalidades verdes y cafés. Las núculas midieron 0.8 × 1.6 mm (anchura × longitud) y peso expresado como 2686.5 núculas por gramo, ovaladas de color café a negro. Las núculas de color negro presentaron 100% de viabilidad y las cafés 33%. Las núculas presentaron mixocarpia. El tratamiento óptimo para la germinación fue incrementar temperatura a 28 °C. El 10% de las semillas germinó en 4.2 d, el 50% en 6.2 d, y el porcentaje máximo de germinación 93% se alcanzó en 12 d.

ABSTRACT

Clinopodium mexicanum (poleo verde) is a native species in Mexico with demand in local markets for its medicinal properties. No information on cultivation was found, so the objective of this study was to develop a seed germination protocol to contribute to the knowledge of this species for management, cultivation, commercialization and conservation. Samples were collected in two wild populations in the state of Querétaro, selected for the availability of plants and accessibility to the site. The fruiting calyx (persistent) and the nutlets were morphologically characterized, and viability and germination percentages were evaluated. The germination experiment had temperature (T) as a factor, with three treatments: 28, 21 and 15 °C. Water content in substrate (100%), ambient humidity (30%) and photoperiod (12:12 h light/dark) were kept constant. Results were analyzed with a Student t-test, a generalized linear model and two analyses for germination (t10 and t50). The fruiting calyx measured on average 1.6 × 6.7 mm (width × length), and weight expressed as 436.5 calyxes per gram; striated shell, with glands showing green and brown tones. Nutlets measured 0.8 × 1.6 mm (width × length) and weight expressed as 2686.5 nutlets per gram, oval, brown to black. The black colored nutlets showed 100% viability and the brown ones 33%. The nutlets showed myxocarpia. The optimum treatment for germination was to increase the temperature to 28 °C. Ten percent of the seeds germinated in 4.2 d, 50% in 6.2 d, and the maximum germination percentage of 93% was reached in 12 d.

Key words: *Clinopodium mexicanum*, medicinal plants, germination, propagation.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1304-2763>.

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

Publicado en *Agrociencia* 55: 433-450. 2021.

Palabras clave: *Clinopodium mexicanum*, plantas medicinales, germinación, propagación.

INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas y medicinales contienen principios activos, es decir, son plantas que poseen sustancias con actividad terapéutica (Moré *et al.*, 2010). Dichos principios activos son producto del metabolismo secundario de las plantas, por lo que también se denominan metabolitos secundarios. Las principales funciones de los metabolitos secundarios en las plantas son la defensa contra depredadores y patógenos, como agentes alelopáticos, atracción de polinizadores, protección de la planta contra las radiaciones UV y resistencia a virus. Estos son importantes para la salud humana porque presentan valor medicinal y económico, y se pueden utilizar como ingredientes de medicamentos en la industria farmacéutica al extraerse de la planta (Moré *et al.*, 2010; Palma-Tenango *et al.*, 2017).

El uso y comercialización de las plantas aromáticas y medicinales ha aumentado debido a la necesidad de la extracción de sus metabolitos secundarios y fabricación de diferentes productos en el mundo. Sin embargo, para muchas especies de plantas que producen metabolitos secundarios de importancia para la salud humana, se desconoce su forma de propagación y no hay información sobre su cultivo. Un ejemplo es *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts, una especie nativa de México con demanda en los mercados locales de las regiones de su distribución natural debido a sus propiedades medicinales. Esta investigación contribuye al conocimiento de la germinación de la especie para cultivo, manejo, comercialización y conservación; con el fin de evitar que la diversidad de las poblaciones silvestres se agote.

C. mexicanum pertenece a la familia Lamiaceae, subfamilia Nepetoideae. Los taxónomos la ubicaban en el género *Satureja*. Ahora dicho género está confinado a Europa y las 100 especies americanas pertenecen al género *Clinopodium*. De las cuales 14 se distribuyen en México y 10 de ellas son endémicas (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). *C. mexicanum* es una especie endémica de México con distribución en los estados de Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz, en la provincia fisiográfica de la Sierra Madre Oriental (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017). Los tipos de vegetación en que se encuentra

INTRODUCTION

Aromatic and medicinal plants contain active principles, *i.e.* they are plants that possess substances with therapeutic activity (Moré *et al.*, 2010). These active principles are products of the secondary metabolism of plants and therefore they are called secondary metabolites. The main functions of secondary metabolites in plants are defense against predators and pathogens, as allelopathic agents, attraction of pollinators, plant protection against UV radiation and resistance to viruses. These are important for human health because they present medicinal and economic value and can be used as drug ingredients in the pharmaceutical industry once extracted from the plant (Moré *et al.*, 2010; Palma-Tenango *et al.*, 2017).

The use and commercialization of aromatic and medicinal plants has increased due to the need for the extraction of their secondary metabolites and the manufacture of different products around the world. However, the form of propagation of many plant species that produce secondary metabolites important for human health is still unknown and there is no information on their cultivation. One example is *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts, a native species of Mexico with demand at local markets in the regions of its natural distribution due to medicinal properties. This research contributes to the knowledge of this species germination for cultivation, management, commercialization, and conservation, in order to prevent depletion of the diversity of wild populations.

C. mexicanum belongs to the family Lamiaceae, subfamily Nepetoideae. Taxonomists used to place it in the genus *Satureja*. Now that genus is confined to Europe and the 100 American species belong to the genus *Clinopodium*. Fourteen of which are distributed in Mexico and 10 are endemic (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). *C. mexicanum* is an endemic species of Mexico with distribution in the states of Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas and Veracruz, in the physiographic province of the Sierra Madre Oriental (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017). The vegetation types where it is found are scrublands, grasslands, secondary vegetation and coniferous forests; also in transition zones between semi-arid and humid climates.

son matorrales, pastizales, vegetación secundaria y bosques de coníferas; también en zonas de transición entre climas semiáridos y húmedos.

En Querétaro, su nombre común es “poleo verde”; en algunas regiones de Oaxaca se consume como infusión para aliviar los efectos del alcohol (“hierba del borracho”) y problemas digestivos y gastrointestinales; en Guerrero se le conoce como “toronjil de monte” (Alvarado *et al.*, 2020). En la medicina tradicional mexicana, *C. mexicanum* se utiliza contra el dolor de muelas y como remedio de enfermedades del sistema nervioso (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). En estudios fitoquímicos y farmacológicos de la especie se encontró que su extracto acuoso contiene Neoponcirina como compuesto principal. Esta es una sustancia con efectos sedantes, anticonvulsivos, ansiolíticos similares al Diazepam, y antinociceptivos mayores que el Ibuprofeno, similares al Ketorolaco (Estrada-Reyes *et al.*, 2010 y Cassani *et al.*, 2013). A pesar de sus usos, hay poca información que permita su cultivo y manejo para la conservación de la especie.

C. mexicanum es una planta perenne, la cual se encuentra con botones florales, flores y núculas maduras e inmaduras todo el año, de acuerdo con un reporte preliminar del autor³. No se han realizado estudios sobre sus órganos de dispersión, pero se conoce que en algunos géneros de la familia Lamiaceae ocurre dispersión por gravedad, mixocarpia y nautocoria (Bonzani *et al.*, 2011; FSC-GEF-UNEP, 2016). En la familia Lamiaceae el fruto es una tetranúcula incluida en un cáliz persistente considerado la unidad de dispersión en dicha familia. Es decir, desde el enfoque agronómico, las núculas (frutos) se consideran “semillas”, porque son las que dan origen a la planta. Esta consideración es útil para *C. mexicanum*, por ello es importante reconocer las características del cáliz persistente ya que en sentido funcional es equivalente al fruto, y de las núculas que funcionan como semillas (Scandaliaris y Barboza, 2013).

El objetivo del estudio fue obtener un protocolo de germinación para *C. mexicanum* a través de caracterizar la morfología del cáliz persistente y de las núculas (tamaño, color, forma, cubierta y peso), determinar el porcentaje de viabilidad en una población y definir la temperatura óptima para la germinación de semillas.

In Querétaro, *C. mexicanum* common name is “poleo verde”. In some regions of Oaxaca it is consumed as an infusion to alleviate the effect of alcohol abuse; it also alleviates indigestion and other gastrointestinal problems. In Guerrero it is known as “toronjil de monte” (Alvarado *et al.*, 2020). In traditional Mexican medicine, *C. mexicanum* is used against toothache and as a remedy for nervous system diseases (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). In phytochemical and pharmacological studies on the species, it was found that its aqueous extract contains Neoponcirin as the main compound. This is a substance with sedative, anticonvulsant, anxiolytic effects similar to Diazepam, and more antinociceptive effects than Ibuprofen, rather as Ketorolac (Estrada-Reyes *et al.*, 2010 and Cassani *et al.*, 2013). Despite these uses, there is little information that allows *C. mexicanum* cultivation and management for the conservation of the species.

C. mexicanum is a perennial plant flowering and fruiting throughout the year, flower buds, flowers and mature and immature nutlets are found all year round, as it was established in a preliminary report³. No studies have been conducted on dispersal organs, but it is known that in some genera of the Lamiaceae family, dispersal by gravity, myxocarpia and nautochory occurs (Bonzani *et al.*, 2011; FSC-GEF-UNEP, 2016). In the family Lamiaceae the fruit is a structure of four grouped nutlets included in a fruiting calyx which is persistent and considered the dispersal unit in that family. This means, from the agronomic point of view, nutlets are considered as “seeds” because plants rise from them. This consideration is useful for *C. mexicanum*; therefore, it is important to recognize the characteristics of the fruiting calyx, since in a functional sense it is equivalent to a fruit; and of the nutlets that function as seeds (Scandaliaris and Barboza, 2013).

The objective of the study was to obtain a germination protocol for *C. mexicanum* by characterizing the morphology of the fruiting calyx and nutlets (size, color, shape, shell and weight), determining the percentage of viability in a population and defining the optimum temperature for seed germination.

³Magallán, F., A. Alvarado, R. Ocampo, y L. Guerrero. 2015. Informe técnico: Protocolos de propagación de plantas nativas aromáticas y medicinales con uso potencial en la industria farmacéutica y cosmética. Fondo de vinculación tecnológica. Universidad Autónoma de Querétaro. 52 p.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La recolecta de cálices persistentes y núculas de poleo verde se realizó en dos poblaciones del estado de Querétaro, México, en noviembre 2017 (Cuadro 1). La accesibilidad y disponibilidad de plantas se consideró como criterio para la selección de las localidades. Para el registro de las coordenadas se utilizó un sensor GPS (Oregon 650®, EUA).

Modo de recolecta, selección y almacenamiento

En cada localidad de estudio se recolectaron los tallos de las plantas con presencia de cálices persistentes (sin distinción de colores) en transectos de 1 km dentro de la localidad. Las coordenadas y altitud se registraron al inicio del recorrido. Para coleccionar los tallos de las plantas se utilizaron tijeras de poda. El material se colocó en bolsas de papel estraza y se transportó a temperatura ambiente. En el laboratorio, las muestras se extendieron sobre charolas de plástico para separar los cálices y las núculas, mientras que el resto del material (hojas y ramas) se regresó a las bolsas.

Para extraer las núculas de los cálices se usaron pinzas planas de punta delgada y una lámpara de escritorio con lupa (Stereon HER-730BL®, China). Para separar las núculas que se encontraban entre las hojas y las ramas (material restante) se utilizó un tamiz metálico del número 10 con abertura entre celdas de 2 mm y las núculas se almacenaron en frascos de vidrio con sílica gel, en condiciones de temperatura ambiental (21-23 °C) y sombra.

Caracterización morfológica de cálices persistentes y núculas de *C. mexicanum*

Para obtener el tamaño promedio se usó un vernier manual y se midieron 30 núculas y 30 cálices por población. El color de los cálices y núculas se determinó con tablas Munsell (2011). Para

MATERIALS AND METHODS

Study area

The collection of fruiting calyces and nutlets of *C. mexicanum* was conducted in two populations in the state of Querétaro, Mexico, in November 2017 (Table 1). The accessibility and availability of plants was considered as a criterion for the selection of localities. A GPS sensor (Oregon 650®, USA) was used to register the coordinates.

Mode of collection, selection and storage

In each study locality, the stems of plants with fruiting calyces (without color distinction) were collected in 1 km transects within the locality. The coordinates and altitude were recorded at the beginning of the transect. Pruning shears were used to collect plant stems. The material was placed in brown paper bags and transported at room temperature. In the laboratory, the samples were spread out on plastic trays to separate the calyces and nutlets, while the rest of the material (leaves and branches) was returned to the bags.

To extract the nutlets from the calyces, thin-tipped flat tweezers and a desk lamp with magnifying glass (Stereon HER-730BL®, China) were used. A metal sieve mesh (Num. 10, sieve size 2 mm) was used to separate the nutlets from the leaves and branches (remaining material) and the nutlets were stored in glass jars with silica gel under room temperature (21-23 °C) at shaded conditions.

Morphological characterization of fruiting calyces and nutlets of *C. mexicanum*.

To obtain the average size, a manual Vernier rule was used and 30 nutlets and 30 calyces were measured per population. The color of calyces and nutlets was determined with Munsell

Cuadro 1. Descripción de sitios y poblaciones para recolecta de cálices persistentes y núculas de *C. mexicanum*.

Table 1. Description of sites and populations for collection of fruiting calyces and nutlets of *C. mexicanum*.

Poblaciones		
Nombre	Sombrerete	Maguey Verde
Municipio	Cadereyta de Montes	Peñamiller
Coordenadas	20° 47' 84" N, 99° 39' 97" O	21° 05' 85" N, 99° 41' 77" O
Tipo de vegetación	Matorral xerófilo, micrófilo, y plantación de <i>Pinus cembroides</i>	Transición entre bosque de matorral xerófilo y bosque de <i>Juniperus</i>
Altitud	2512 m	2296 m

describir la cubierta del cáliz y de las núculas se seleccionó un cáliz persistente y cuatro núculas para su observación por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB). La muestra se limpió y montó en un porta muestras, para favorecer las características por observar; se capturó imagen con distintos aumentos, del cáliz y de la cubierta de las núculas tanto de la cara interna como de la externa.

Un microscopio de barrido (Carl Zeiss EVO-50°, Alemania) se utilizó en modo de presión variable sin recubrimiento. La descripción de las núculas se basó en los estudios de Scandaliaris y Barboza (2013). Para obtener el peso promedio de los cálices y las núculas que son muy pequeñas, se obtuvo el peso de 100 núculas y 100 cálices por población en una balanza analítica (Denver Instrument APX-200°, EUA) y luego se estimó el peso promedio por cáliz persistente y por núcula.

Porcentaje de viabilidad de semillas en *C. mexicanum*

Para las pruebas de viabilidad se usaron sólo semillas de la población Magüey Verde debido a su disponibilidad. En estas pruebas se separó a las núculas por color en dos muestras: 30 núculas de color negro y 30 núculas de color café. Para la prueba de viabilidad de semillas se siguió el protocolo general propuesto por González *et al.* (2019) con modificaciones. Las muestras se sumergieron en agua destilada por 48 h; transcurrido el tiempo a cada núcula se le hizo una incisión longitudinal con navaja delgada y se sumergió en una solución de cloruro de 2, 3, 5, -trifenil-tetrazolio (Golden Bell Reactivos®) al 0.5% por 24 h a 22 °C. Después de 24 h, cada semilla se observó en el microscopio de disección (Leica Zoom 2000°, China) y el resultado de su tinción se registró. La clasificación de viabilidad fue, embriones teñidos de color rojo carmín se consideraron viables, mientras que embriones teñidos en color rojo suave o blanco lechoso se consideraron no viables.

Temperatura óptima para la germinación de *C. mexicanum*

Revisión de condiciones ambientales para las pruebas de germinación

Para definir las temperaturas por probar en el estudio se revisaron los datos climatológicos de tres estaciones meteorológicas del estado de Querétaro, en los municipios de Cadereyta de Montes, Peñamiller y Pinal de Amoles, de enero 2000 a diciembre 2017 (TWC, 2018). Estos municipios se seleccionaron por tener poblaciones silvestres de la especie en estudio y por su cercanía a los puntos de colecta. La información obtenida se consideró la base para definir las condiciones ambientales del diseño experimental.

tables (2011). To describe the calyx and nutlet shell, one fruiting calyx and four nutlets were selected for observation by scanning electron microscopy (MEB). The sample was cleaned and mounted in a specimen holder. An image of the calyx and the shell of the nutlets of both the internal and external faces was captured with different magnifications.

A scanning microscope (Carl Zeiss EVO-50°, Germany) was used in variable pressure mode without overlay. The description of the nutlets was based on the studies of Scandaliaris and Barboza (2013). Because of their small size, to obtain the average weight of calyxes and nutlets, the weight of 100 nutlets and 100 calyxes per population was measured in an analytical balance (Denver Instrument APX-200°, USA); then the average weight per fruiting calyx and per nutlet was estimated.

Percentage of seed viability in *C. mexicanum*

For viability tests, only seeds from the Magüey Verde population were used due to their availability. In these tests, nutlets were separated by color into two samples: 30 black nutlets and 30 brown nutlets. For the seed viability test, the general protocol proposed by González *et al.* (2019) was followed with modifications. Samples were immersed in distilled water for 48 h; after this time, each nutlet was incised longitudinally with a thin blade and immersed in a 0.5% solution of 2, 3, 5, -triphenyl-tetrazolium chloride (Golden Bell Reagents®) for 24 h at 22 °C. After 24 h, each seed was observed under a dissecting microscope (Leica Zoom 2000°, China) and the staining result was recorded. The viability classification was, embryos stained carmine red were considered viable, while embryos stained in soft red or milky white were considered non-viable.

Optimum temperature for germination of *C. mexicanum*

Review of environmental conditions for germination tests

To define the temperatures to be tested in the study, climatological data from three weather stations in the state of Querétaro, in the municipalities of Cadereyta de Montes, Peñamiller and Pinal de Amoles, from January 2000 to December 2017, were reviewed (TWC, 2018). These municipalities were selected for having wild populations of the species under study and for their proximity to the collection points. The information obtained was considered the basis for defining the environmental conditions of the experimental design.

Experimental design for germination tests

To determine the effect of temperature on the germination of *C. mexicanum* seeds, three temperature treatments (T)

Diseño experimental para pruebas de germinación

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la germinación de las semillas de *C. mexicanum* se definieron tres tratamientos de temperatura (T): T1) 28 °C, T2) 21 °C y T3) 15 °C; con base en las temperaturas máximas, mínimas y promedio de las estaciones meteorológicas consultadas (TWC, 2018). Las condiciones ambientales que se mantuvieron constantes en los tres tratamientos fueron fotoperiodo (F), 12:12 h luz/oscuridad; humedad del sustrato (HS), 100% y humedad ambiental (HA), 30%. Aunque en los datos de las estaciones meteorológicas se registró humedad ambiental promedio de 56.8 a 77.2% (TWC, 2018), se decidió establecer en 30% para evitar problemas de contaminación por hongos. Las pruebas de germinación se realizaron dentro de una cámara bioclimática refrigerada (CBRF-20°, México). Las repeticiones por tratamiento fueron cinco cajas de Petri con 30 núculas cada una (el total fue de 150 núculas por tratamiento) las cuales se evaluaron durante 20 d.

Pruebas de germinación

La prueba se realizó en cajas de Petri de vidrio, cuya desinfección se efectuó con una solución de cloro comercial al 2% por 30 min, además de alcohol al 96% (Bueno *et al.*, 2007). Dentro de cada caja de Petri numerada, se colocó una almohadilla de algodón, y sobre ella las núculas acomodadas y numeradas para dar seguimiento a su germinación individual. Las núculas se desinfectaron en una solución de cloro comercial al 2%, se añadió 0.5 mL de Tween 20 (J. T. Baker®) para romper la tensión superficial, debido a su tamaño pequeño; se dejaron 2 min en dicha solución y se enjuagaron con agua destilada. Las núculas se colocaron en la cámara bioclimática (CBRF-20°, México) en cajas de Petri sin tapa, bajo las condiciones establecidas en el diseño experimental y se regaron a saturación cada día con agua destilada. La distribución de cajas y núculas numeradas se dibujó y se registró el número de núcula en filas (1-30) y el número de días a la germinación por núcula en columnas (1-20 d). Cada semilla se revisó en el microscopio de disección (Leica Zoom 2000®, China) cada día, la emergencia de la radícula fue el indicador de la germinación.

Análisis estadístico

Para evaluar diferencias en el tamaño de cálices persistentes y núculas de las dos poblaciones se realizó una prueba de t de Student, con el programa estadístico Past 3.21 (Hammer *et al.*, 2001). Para conocer las diferencias en el porcentaje de germinación entre los tres tratamientos se utilizó un modelo lineal

were defined: T1) 28 °C, T2) 21 °C and T3) 15 °C; based on the maximum, minimum and average temperatures of the meteorological stations consulted (TWC, 2018). The environmental conditions that were kept constant in the three treatments were photoperiod (F), 12:12 h light/dark; substrate water content (HS), 100% and ambient humidity (HA), 30%. Although at the weather stations data recorded average values of ambient humidity from 56.8 to 77.2% (TWC, 2018), it was decided to set this variable at 30% to avoid fungal contamination problems. Germination tests were performed inside a refrigerated bioclimatic chamber (CBRF-20°, Mexico). The replicates per treatment were five petri dishes with 30 nutlets each which were evaluated for 20 d (total was 150 nutlets per treatment).

Germination tests

The test was set in glass Petri dishes, which were disinfected with a 2% commercial chlorine solution for 30 min, in addition to 96% alcohol (Bueno *et al.*, 2007). Inside each numbered Petri dish, a cotton pad was placed, and on top of it the nutlets that were numbered and arranged to monitor their individual germination. Nutlets were disinfected in a 2% commercial chlorine solution, 0.5 mL of Tween 20 (J. T. Baker®) was added to break the surface tension due to their small size; they were left for 2 min in this solution and rinsed with distilled water. Nutlets were placed in the bioclimatic chamber (CBRF-20°, Mexico) in Petri dishes without lids, under the conditions established in the experimental design, with watering up to saturation every day with distilled water. Nutlets distribution within the Petri dish was depicted and a number was assigned to each nutlet. For the records, the number in the nutlets (1-30) was set in rows and the number of days to germination per each nutlet was recorded in columns (1-20 d). Each nutlet was checked under the dissecting microscope (Leica Zoom 2000®, China) every day; radicle emergence was the indicator of germination.

Statistical analysis

To evaluate differences in the size of fruiting calyxes and nutlets of the two populations, a Student t-test was performed with the statistical program Past 3.21 (Hammer *et al.*, 2001). A generalized linear model (binomial error distribution and logit function) was used with SAS® JMP 7.0 (SAS Institute Inc., 2007) to determine the differences in germination percentage between the three treatments. Germination curves were obtained in the Germinator software (Joosen *et al.*, 2010) and germination was also analyzed in that program, when 10% germination (t 10) and the average (t 50) per treatment were established.

generalizado (distribución de error binomial y función de enlace logit) con JMP 7.0 de SAS® (SAS Institute Inc., 2007). Las curvas de germinación se obtuvieron en el programa estadístico Germinator (Joosen *et al.*, 2010) y en ese programa se analizó también la germinación, cuando se estableció 10% de germinación ($t = 10$) y el promedio ($t = 50$) por tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica del cáliz persistente

Tamaño

Los cáliz persistentes de la población Sombrerete presentaron intervalo de anchura 1.30 - 2.00 mm y longitud 5.30 - 8.40 mm, con tamaño promedio 1.64×6.57 mm (anchura $\times$ longitud). Los cáliz persistentes de la población Maguey Verde tuvieron intervalos de anchura 1.30 - 2.70 mm y longitud 5.30 - 8.50 mm, con tamaño promedio 1.64×6.57 mm (anchura $\times$ longitud).

El promedio de los cáliz persistentes de ambas poblaciones fue 1.60×6.70 mm (anchura $\times$ longitud). De acuerdo con la prueba de t , la diferencia en tamaño de cáliz persistentes entre las poblaciones, longitud ($t = 0.8992$, g.l. = 58, $p = 0.372$) y anchura ($t = 0.2826$, g.l. = 58, $p = 0.778$) no fue significativa (Figura 1).

Una característica notable de la familia Lamiaceae respecto al desarrollo de flores y frutos, es la presencia de cáliz persistente (Scandaliaris y Barboza, 2013). Esto significa que una vez que los óvulos han sido fecundados e inicia el desarrollo de las semillas, el cáliz permanece hasta la maduración de las núculas. Como ya se indicó, *C. mexicanum* presenta esta

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological characterization of the fruiting calyx

Size

The fruiting calyxes of the Sombrerete population had a width interval of 1.30 - 2.00 mm and length of 5.30 - 8.40 mm, with an average size of 1.64×6.57 mm (width $\times$ length). The fruiting calyxes of the Maguey Verde population had intervals of width of 1.30 - 2.70 mm and length 5.30 - 8.50 mm, with average size 1.64×6.57 mm (width $\times$ length).

The average fruiting calyxes of both populations were 1.60×6.70 mm (width $\times$ length). According to the t -test, the difference in fruiting calyx size between populations, length ($t = 0.8992$, g.l. = 58, $p = 0.372$) and width ($t = 0.2826$, g.l. = 58, $p = 0.778$) was not significant (Figure 1).

A notable characteristic of the Lamiaceae family regarding flower and fruit development is the presence of a fruiting calyx which is persistent in the plants (Scandaliaris and Barboza, 2013). This means that once the ovules have been fertilized and seed development begins, the calyx remains until the maturation of the nutlets. As it was already indicated, *C. mexicanum* shows this characteristic. Calyx size, shape, color and shell are considered relevant characters for cultivation and can be used as morphological and agronomic descriptors (Franco and Hidalgo, 2003). At comparing the average length of the fruiting calyx in this study (6.70 mm), with the taxonomic description of *C. mexicanum*, in

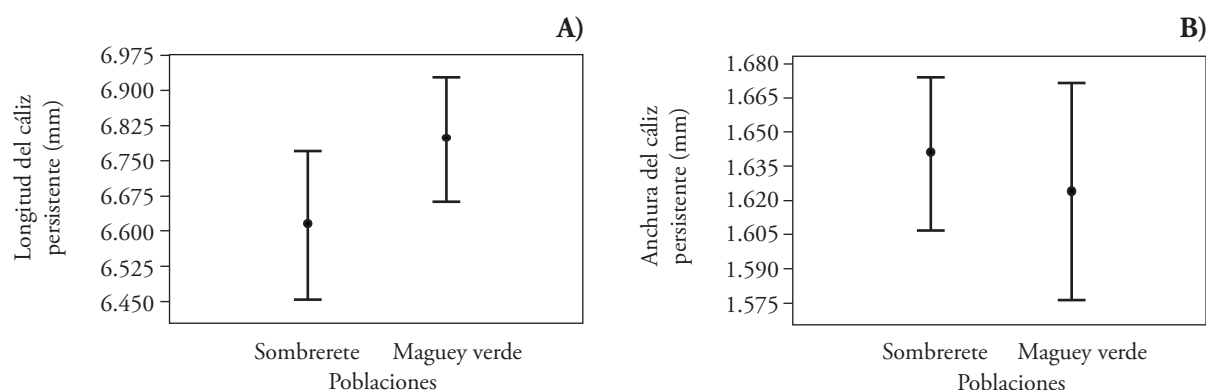


Figura 1. Diferencia de tamaño en cáliz persistente de *C. mexicanum* entre las poblaciones. A, longitud; B, anchura.
Figure 1. Size difference in fruiting calyx of *C. mexicanum* between populations. A, length, B, width.

característica; por lo tanto el tamaño, forma, color y cubierta del cáliz se consideran caracteres relevantes para cultivo y pueden usarse como descriptores morfológicos y agronómicos (Franco e Hidalgo, 2003). Al comparar la longitud promedio del cáliz persistente en este estudio (6.70 mm), con la descripción taxonómica de *C. mexicanum*, en la cual se indicó longitud de cáliz 6 mm (Hanan-Alipi, 2009) se observó que no existen cambios notables en el tamaño del cáliz durante el desarrollo de las núculas, por lo tanto, el tamaño del cáliz persistente no es un indicador de madurez. Aunque sí puede considerarse un descriptor botánico y taxonómico distintivo, pero con poca variabilidad en la especie.

Forma y color

El cáliz persistente tiene forma cilíndrica con cinco puntas (lóbulos o dientes) en el ápice, en forma de estrella. Las siguientes tonalidades de verdes y cafés se observaron: 2.5Y5/2, 2.5Y5/4, 2.5Y5/6 2.5Y6/4, 2.5Y6/6, 2.5Y6/8, 5Y7/4, 5Y7/6, 5Y7/8, 5Y8/4, 5Y8/6, 5Y8/8, 5Y8/12, 2.5GY7/10 y 2.5GY8/10 (Munsell, 2011; Figura 2).

La forma del cáliz persistente es un carácter botánico y taxonómico que se puede usar como descriptor para la especie, porque fue constante entre las muestras de ambas poblaciones. Mientras que el color sí se puede usar como un descriptor morfológico y agronómico. El cáliz persistente con tonos verdes presentó núculas inmaduras, mientras que el cáliz con tonos cafés en estado semi seco presentó núculas maduras, lo cual demuestra que el color es un indicador de madurez.

Cubierta

El cáliz persistente es estriado, pubescente y con glándulas globosas en la pared externa (Figura 2). En la pared interna presenta un anillo de tricomas ubicado en la base de los dientes (lóbulos) hacia el ápice del cáliz. Los dientes presentan tricomas abundantes, distribuidos de manera homogénea en toda su superficie; es decir tanto en las paredes internas como en las externas (Figura 3).

Los estudios morfológicos y anatómicos del género *Clinopodium* se enfocan principalmente en la descripción de las núculas (Wood, 2011; Scandaliaris y Barboza, 2013), con referencias escasas a

which calyx length was 6 mm (Hanan-Alipi, 2009), it was observed that there are no notable changes in the size of the calyx during the development of the nutlets, therefore, the size of the fruiting calyx is not an indicator of maturity. Although it can be considered a distinctive botanical and taxonomic descriptor, but with little variability in the species.

Shape and color

The fruiting calyx is cylindrical shaped with five star-shaped points (lobes or teeth) at the apex. The following shades of green and brown were observed: 2.5Y5/2, 2.5Y5/4, 2.5Y5/6 2.5Y6/4, 2.5Y6/6, 2.5Y6/8, 5Y7/4, 5Y7/6, 5Y7/8, 5Y8/4, 5Y8/6, 5Y8/8, 5Y8/12, 2.5GY7/10, and 2.5GY8/10 (Munsell, 2011; Figure 2).

The shape of the fruiting calyx is a botanical and taxonomic character that may be used as descriptor for the species, because it was constant among samples from both populations. Whereas color can be used as a morphological and agronomic descriptor. The fruiting calyx with green shades presented immature nutlets, while the calyx with brown shades in semi-dry state presented mature nutlets, which shows that color is an indicator of maturity.

Shell

The fruiting calyx is striated, pubescent and with globose glands on the external wall (Figure 2). On the inner wall there is a ring of trichomes located at the



Figura 2. Forma y variación en los colores del cáliz persistente de *C. mexicanum*.

Figure 2. Shape and variation in the colors of the fruiting calyx of *C. mexicanum*.

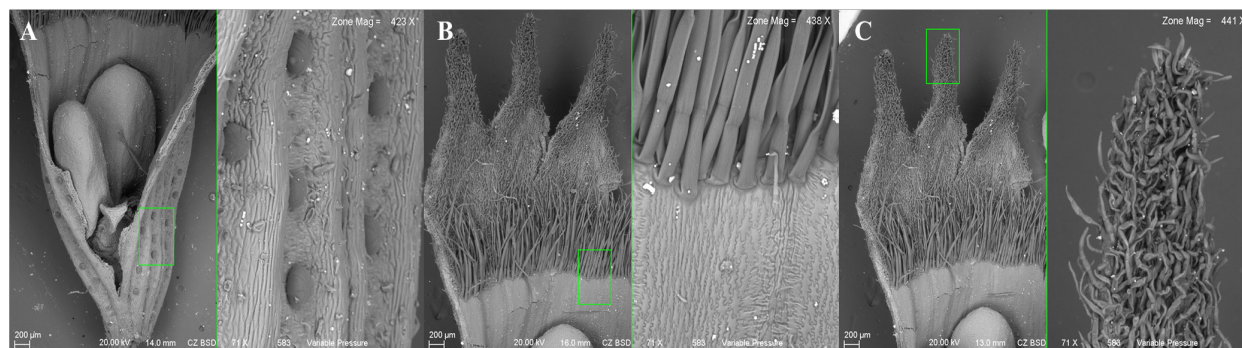


Figura 3. Cubierta del cáliz persistente de *C. mexicanum*. A. Glándulas globosas en la pared externa. B. Anillo de tricomas en la base de los dientes C. Tricomas abundantes y homogéneos en los dientes.

Figure 3. Fruiting calyx shell of *C. mexicanum*. A. Globose glands on the outer wall. B. Ring of trichomes at the base of the teeth C. Abundant and homogeneous trichomes on the teeth.

las características del cáliz persistente. Este estudio aporta información relevante de dicho carácter para *C. mexicanum*, y sirve como base para su aprovechamiento y manejo en cultivo. En referencia a la presencia del anillo de tricomas en la base de los dientes (lóbulos) del cáliz, no se trata de un carácter diagnóstico del género *Clinopodium* (Harley *et al.*, 2004), pero puede usarse como un descriptor botánico y taxonómico distintivo y constante en la especie.

Respecto a la presencia de glándulas en las paredes externas del cáliz, estas glándulas que contienen aceites esenciales en hojas y tallos son un carácter común de la familia Lamiaceae (Harley *et al.*, 2004), incluido el género *Clinopodium* (González-Gallegos *et al.*, 2017; Tapia *et al.*, 2017). Debido a que en este estudio no se hicieron pruebas específicas sobre presencia o función de aceites esenciales, solo puede inferirse que cumplen funciones de defensa contra herbívoros o microorganismos, así como atracción de polinizadores (Pichersky y Raguso, 2016).

Peso

Los 100 cálices persistentes de la población Sombrerete presentaron peso de 0.245 g, lo cual equivale a un peso promedio de 0.245×10^{-2} g; es decir, 408 cálices persistentes por gramo. Los 100 cálices persistentes de la población Maguey Verde pesaron 0.215 g, lo cual equivale a un peso promedio de 0.465×10^{-2} y a 465 cálices persistentes por gramo. El peso de los cálices persistentes y sus características puede resultar un carácter útil para el diseño de herramientas y maquinaria, para definir técnicas que faciliten procesar

base of the teeth (lobes) towards the apex of the calyx. Teeth have abundant trichomes, homogeneously distributed over their entire surface, that is, on both the internal and external walls (Figure 3).

Morphological and anatomical studies of the genus *Clinopodium* focus mainly on the description of nutlets (Wood, 2011; Scandaliaris and Barboza, 2013), with few references to the characteristics of the fruiting calyx. This study provides relevant information on that character for *C. mexicanum* that may serve as a basis for use and management in cultivation. Regarding the presence of the trichome ring at the base of the calyx teeth (lobes), this is not a diagnostic character of the genus *Clinopodium* (Harley *et al.*, 2004), but it can be used as a distinctive and constant botanical and taxonomic descriptor for the species.

Regarding the presence of glands on the outer walls of the calyx, these glands containing essential oils in leaves and stems are a common character of the family Lamiaceae (Harley *et al.*, 2004), including the genus *Clinopodium* (González-Gallegos *et al.*, 2017; Tapia *et al.*, 2017). Because no specific tests on the presence or function of essential oils were performed in this study. Thus, it can only be inferred that they may function as defense against herbivores or microorganisms, as well as pollinators attraction (Pichersky and Raguso, 2016).

Weight

The 100 fruiting calyxes of the Sombrerete population weighed 0.245 g, which is equivalent

los cálices y obtener las núculas; y en el futuro desarrollar estándares de calidad para su comercialización.

Caracterización morfológica de las núculas

Tamaño

Las núculas de la población Sombrerete presentaron intervalo de anchura 0.50 - 1.00 mm y longitud 1.00 - 1.90 mm, con promedio de 0.86×1.57 mm (anchura $\times$ longitud). Las núculas de la población Maguey Verde mostraron intervalos de anchura 0.50 - 1.00 mm y longitud 1.30 - 2.00 mm, y en promedio midieron 1.10×1.72 mm (anchura $\times$ longitud). De acuerdo con la prueba de t, la diferencia en longitud de las semillas entre poblaciones fue significativa ($t = 2.8324$; $p = 0.0063$). En el caso de la anchura de las semillas entre las poblaciones la diferencia no fue significativa ($t = 0.6145$; $p = 0.5413$) (Figura 4).

La descripción del tamaño de las unidades de dispersión de cualquier especie (núculas en el caso de *C. mexicanum*) es información importante, desde el punto de vista taxonómico y agronómico. En la longitud de núcula entre las poblaciones colectadas existió diferencia significativa, lo cual indica que factores extrínsecos pueden afectar este carácter descriptor. Sin embargo, el estudio no tuvo como objetivo correlacionar el tamaño de las núculas con los factores ambientales ni con las características del suelo, por lo tanto, no es posible aseverar dicha correlación.

Forma y color

En ambas poblaciones, la forma de las núculas fue elipsoidea y simétrica. El color de las núculas

to an average weight of 0.245×10^{-2} g; that is, 408 fruiting calyxes per gram. The 100 fruiting calyxes of the Maguey Verde population weighed 0.215 g, which is equivalent to an average weight of 0.465×10^{-2} and 465 fruiting calyxes per gram. The weight of the fruiting calyxes and their characteristics can be a useful character for the design of tools or equipment; and to define techniques that facilitate processing the calyxes to obtain the nutlets; and further also to develop quality standards for their commercialization.

Morphological characterization of the nutlets

Size

The nutlets of the Sombrerete population showed a width interval of 0.50 - 1.00 mm and length of 1.00 - 1.90 mm, with an average of 0.86×1.57 mm (width $\times$ length). Nutlets from the Maguey Verde population showed intervals of width, 0.50-1.00 mm and length, 1.30 - 2.00 mm; their average size was 1.10×1.72 mm (width $\times$ length). According to the t-test, the difference in seed length between populations was significant ($t = 2.8324$; $p = 0.0063$). In the case of seed width between populations the difference was not significant ($t = 0.6145$; $p = 0.5413$) (Figure 4).

The description of the size of the dispersal units of any species (nutlets in the case of *C. mexicanum*) is important information, from a taxonomic and agronomic point of view. There was a significant difference in nutlet length among the populations collected, which indicates that extrinsic factors may affect this descriptor character. However, the study

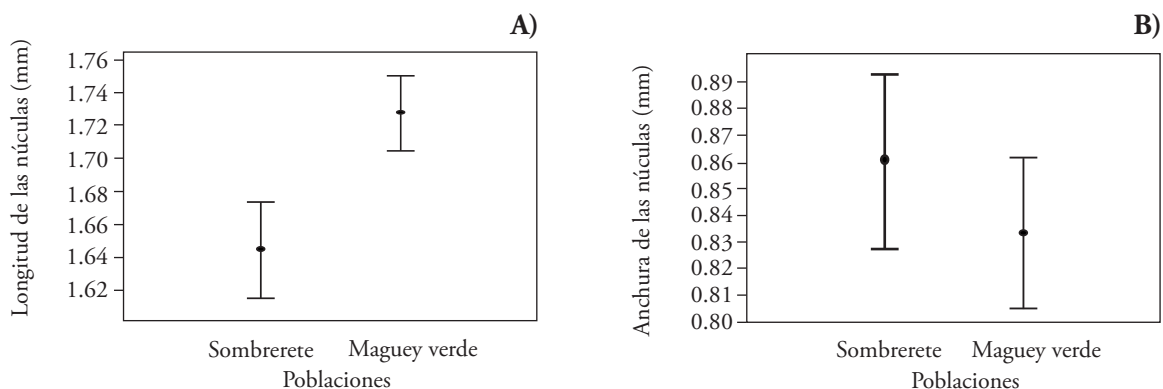


Figura 4. Diferencia de tamaño en núculas de *C. mexicanum* entre las poblaciones. A, longitud; B, anchura.
Figure 4. Difference in size of *C. mexicanum* nutlets between populations. A, length, B, width.

se observó de café a negro con las tonalidades siguientes: 5YR3/2, 2.5Y5/4, 5YR3/4, 7.5YR4/2 y 2.5YR3/4 (Munsell, 2011). Al comparar los resultados con reportes preliminares sobre la fenología de la especie³ se confirmó la presencia de núculas maduras e inmaduras en la misma época. La forma y el color son caracteres relevantes ya que son descriptores morfológicos y agronómicos de esta especie, útiles para propagación y cultivo.

Cubierta

La cubierta de las núculas presentó ornamentación reticulada redondeada-radiada y estrías cuticulares concéntricas. El hilo cárpico se ubicó en la cara ventral hacia la base de la núcula. La areola o zona perihilar presenta ceras epicuticulares de tipo cristalóide esférico y prismáticas, estas últimas muy escasas. Las ceras epicuticulares le confieren un color blanquecino en esa zona a las núculas (Figura 5).

En la familia Lamiaceae, las características en la cubierta de las núculas se asocian con su dispersión. Los estudios llevados a cabo en algunas especies de *Mentha*, muestran que las ornamentaciones de tipo reticulada y estriada permiten que las superficies de las núculas acumulen aire y esto le confiere la capacidad de flotar en agua corriente. Estas características en la ornamentación se relacionan con dispersión por nautocoria (Bonzani *et al.*, 2011). Los resultados de este estudio indicaron que las núculas *C. mexicanum* se dispersan por nautocoria, debido a que la cubierta

did not aim to correlate the size of the nutlets with environmental factors or soil characteristics, therefore it is not possible to assert such correlation.

Shape and color

In both populations, the shape of the nutlets was ellipsoid and symmetrical. The color of the nutlets was observed to be brown to black with the following shades: 5YR3/2, 2.5Y5/4, 5YR3/4, 7.5YR4/2 and 2.5YR3/4 (Munsell, 2011). Comparing the results with the preliminary report on the phenology of the species³ confirmed the presence of mature and immature nutlets at the same time. Shape and color are relevant characters since they are useful as morphological and agronomic descriptors of this species for propagation and cultivation.

Shell

The shell of the nutlets presented rounded-radiate reticulate ornamentation and concentric cuticular striations. The abscission scar was located on the ventral side towards the base of the nutlet. The areola or perihilar zone presents epicuticular waxes of spherical and prismatic crystalloid type, the latter very scarce. The epicuticular waxes give a whitish color to the nutlets in that area (Figure 5).

In the family Lamiaceae, the characteristics of the shell of the nutlets are associated with their dispersion. Studies carried out in some species of *Mentha* show

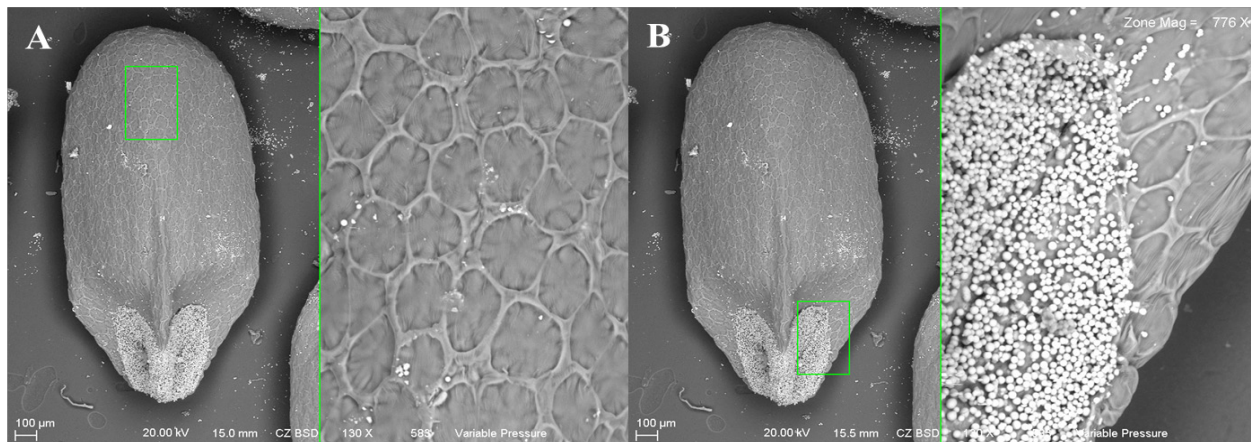


Figura 5. Cubierta de las núculas de *C. mexicanum*. A. Cubierta reticulada redondeada-radiada, estrías cuticulares concéntricas. B. Ceras epicuticulares en la zona perihilar.

Figure 5. Shell of *C. mexicanum* nutlets. A. Rounded-radiate reticulate sheath, concentric cuticular striae. B. Epicuticular waxes in the perihilar zone.

reticulada les permite flotar sobre el agua. En referencia a la presencia de ceras epicuticulares en la base de las núculas de *C. mexicanum*, es posible que su función sea proteger la zona de emergencia radicular, como lo inferido por Bonzani *et al.* (2011) en su estudio de algunas especies de *Mentha*.

Peso

En la recolecta de la población de Sombrerete en 100 núculas se obtuvo un peso de 0.039 g, lo cual equivale a un peso promedio de 0.390×10^{-2} g y a 2507 núculas por gramo. En la población de Maguey Verde, 100 núculas registraron un peso de 0.033 g, lo cual equivale a 0.330×10^{-2} g y a 2866 núculas por gramo. El registro del peso y la cantidad de núculas por gramo es información importante para su comercialización. Los resultados de este estudio mostraron una diferencia aproximada de 300 semillas por gramo entre poblaciones. Las diferencias ambientales y de suelo es probable que afecten el peso de las núculas. Sin embargo, no se llevaron a cabo estudios específicos que permitan aseverar dicha correlación.

Pruebas de viabilidad de *C. mexicanum*

Las núculas de color negro presentaron 100% de tinción en la prueba de tetrazolio y las núculas de color café 33% de tinción. Esto muestra que el cambio de coloración de café a negro es un indicador de madurez, ya que 100% de núculas teñidas equivale a 100% de viabilidad. También se observó que las núculas de color negro se obtuvieron de cáliz persistentes color café, lo cual indica que existe una relación entre el color del cáliz persistente y la madurez de la núcula. Hernández-Gómez y Miranda-Colín (2008) registraron esta relación en *Salvia hispanica* (chía). El color del cáliz persistente como indicador de madurez y el porcentaje de viabilidad de las semillas en las núculas son caracteres útiles para la germinación de poleo verde, porque facilitan a los productores la distinción entre núculas maduras e inmaduras (Figura 6) y podrán servir para determinar estándares de calidad para su comercio.

Pruebas de germinación

Los resultados mostraron que el tratamiento de temperatura con el cual se obtuvo el porcentaje de

that the reticulate and striated ornamentations allow the surfaces of the nutlets to accumulate air, and this confers them the ability to float in running water. These features in the ornamentation are related to dispersal by nautochory (Bonzani *et al.*, 2011). The results of this study indicated that *C. mexicanum* nutlets are dispersed by nautocory, because the reticulate shell allows them to float on water. In reference to the presence of epicuticular waxes at the base of *C. mexicanum* nutlets, it is possible that their function is to protect the root emergence zone, as inferred by Bonzani *et al.* (2011) in their study of some *Ment*

Weight

In the collection of the Sombrerete population, 100 nutlets had a weight of 0.039 g, which is equivalent to an average weight of 0.390×10^{-2} g and 2507 nutlets per gram. In the population of Maguey Verde, 100 nutlets had a weight of 0.033 g, which is equivalent to 0.330×10^{-2} g and 2866 nutlets per gram. Records of the weights and number of nutlets per gram is important information for marketing. Results of this study showed a difference of approximately 300 seeds per gram between populations. It is likely that the weight of the nutlets is affected by environmental and soil differences. However, no specific studies were carried out that would allow this correlation to be asserted.



Figura 6. Núculas de *C. mexicanum*. El color café (izquierda) indica núculas inmaduras, mientras que el color negro (derecha) indica núculas maduras.

Figure 6. Nutlets of *C. mexicanum*. The brown color (left) indicates immature nutlets, whereas the black color (right) indicates mature nutlets.

germinación mayor (93%) fue 28 °C; seguido del tratamiento a 21 °C (89%). El tratamiento con porcentaje de germinación menor (83%) fue el de 15 °C (Cuadro 2). De acuerdo con el modelo lineal generalizado, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento a 28 y 21 °C, ni tampoco entre 21 y 15 °C. Sin embargo, sí hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los porcentajes de germinación a 28 y 15 °C (Figura 7).

El tiempo de germinación fue 12 d en promedio para los tres tratamientos. La germinación inició en 4 d y terminó 16 d después del inicio de la prueba. El porcentaje de germinación mayor se observó entre 4 y 7 d (Figura 8).

Las unidades de dispersión (núculas) de *C. mexicanum* son quiescentes ya que germinaron con las condiciones ambientales adecuadas, sin necesidad de algún tratamiento pre germinativo (Hartmann *et al.*, 2011). Las tres temperaturas probadas estuvieron dentro del intervalo térmico específico, ya que en las tres fue posible la germinación. Las temperaturas probadas no pueden considerarse como cardinales, porque no se evaluó la temperatura mínima para la germinación. Aún así, en este estudio se observó una relación directa entre el incremento de la temperatura y el porcentaje de germinación; similar a lo indicado por Hartmann *et al.* (2011).

Los resultados mostraron las condiciones para el mayor porcentaje de germinación, lo cual favorece el aprovechamiento de las núculas para implementar propagación, producción de plántulas y optimizar tiempo en la cadena productiva. No obstante, estos resultados sólo son válidos en sistemas de producción con condiciones ambientales controladas, y deberán validarse en sistemas de producción tradicional en campo. Las unidades de dispersión (núculas) registraron

Viability tests of *C. mexicanum*

The black colored nutlets showed 100% staining in the tetrazolium test and the brown colored nutlets showed 33% staining. This shows that the change in coloration from brown to black is an indicator of maturity, since 100% of stained nutlets is equivalent to 100% viability. It was also observed that black colored nutlets were obtained from brown fruiting calyxes, which indicates that there is a relationship between the color of the calyx and the maturity of the nutlet. Hernández-Gómez and Miranda-Colín (2008) recorded this relationship in *Salvia hispanica* (or chia, in Spanish). The color of the fruiting calyx as an indicator of maturity and the seed viability percentage of the nutlets are useful characters for the germination of *C. mexicanum*, because they make it easier for producers to distinguish between mature and immature nutlets (Figure 6) and may be further used to determine quality standards for trade.

Germination tests

Results showed that the temperature treatment with the highest germination percentage (93%) was 28 °C, followed by the 21 °C treatment (89%). The treatment with the lowest germination percentage (83%) was 15 °C (Table 2). According to the generalized linear model, no significant differences were found between the treatment at 28 and 21 °C, nor between 21 and 15 °C. However, there was a significant difference ($p \leq 0.05$) between germination percentages at 28 and 15 °C (Figure 7).

Germination time averaged 12 d for the three treatments. Germination started at 4 d and ended 16 d after starting the test. The highest germination

Cuadro 2. Germinación (%) y tiempo (d) en que las núculas de *C. mexicanum* alcanzaron 10 (t 10) y 50% (t 50) de germinación por tratamientos.
Table 2. Germination (%) and time (d) in which *C. mexicanum* nutlets reached 10 (t 10) and 50% (t 50) germination per treatment.

Tratamiento T	Germinación (%)	Tiempo de germinación (d)	
		t (10)	t (50)
28 °C	93 a	4.2 a	6.2 a
21 °C	89 ab	4.0 a	5.1 b
15 °C	83 b	5.3 b	7.4 c

Medias con literal distinta indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). ♦ Means with different literals indicate significant difference ($p \leq 0.05$)

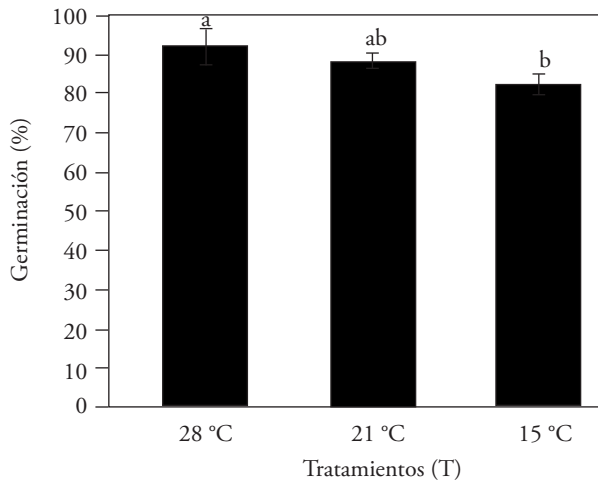


Figura 7. Germinación (%) de *C. mexicanum* en los tratamientos de temperatura.

Figure 7. Germination (%) of *C. mexicanum* in temperature treatments.

germinación >80% en los tres tratamientos en presencia de fotoperiodo 12:12 h (luz/oscuridad). Esta información podría servir para adaptar técnicas en campo a pequeña escala, como cubrir los semilleros o charolas de germinación con coberturas de color oscuro, para simular el fotoperiodo en campo y obtener porcentajes de germinación similares.

Los objetivos de este estudio no incluyeron comprobar la presencia de mixocarpia. Sin embargo, se observó la presencia de mucilagos en las núculas de *C. mexicanum* al entrar en contacto con el agua (imbibición de las núculas) durante las pruebas de viabilidad antes de la germinación. Por lo cual es posible

percentage was observed between 4 and 7 d (Figure 8).

The dispersal units (nutlets) of *C. mexicanum* are quiescent since they germinated under the appropriate environmental conditions, without the need of any pre-germinative treatment (Hartmann *et al.*, 2011). The three temperatures tested were within the specific thermal range, as germination was possible at all three. The temperatures tested cannot be considered as cardinal, because the minimum temperature for germination was not evaluated. Even so, in this study a direct relationship between temperature increase and germination percentage was observed; similar to what was indicated by Hartmann *et al.* (2011).

The results showed the conditions for the highest germination percentage, which favors the use of the nutlets to implement propagation, seedling production and optimize time in the production chain. However, these results are only valid in production systems with controlled environmental conditions and should be validated in traditional field production systems. The dispersal units (nutlets) showed >80% germination in the treatments exposed to a 12:12 h photoperiod (light/dark). This information may be used to adapt small-scale field techniques, such as covering the seedbeds with shade cloth or germination trays with dark lids to simulate the photoperiod in the field, in order to obtain similar germination percentages.

The objectives of this study did not include testing for the presence of myxocarpia. However, the presence of mucilage was observed in *C. mexicanum* nutlets upon contact with water (nutlets imbibition)

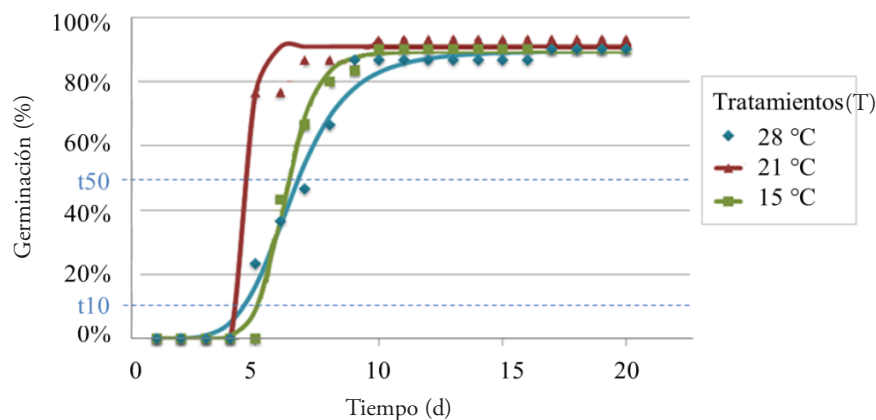


Figura 8. Tiempo transcurrido hasta 10 y 50% germinación (t 10 y t 50) con núculas de *C. mexicanum*.

Figure 8. Elapsed time to 10 and 50% germination (t 10 and t 50) with *C. mexicanum* nutlets.

inferir que *C. mexicanum* es una especie mixocárpica. La observación es relevante, debido a que la mixocarpia es común en la subfamilia Nepetoideae, pero no se presenta en todas las especies del género *Clinopodium* (Scandaliaris y Barboza, 2013).

La función del mucílago en las núculas de la familia Lamiaceae aún no se determina completamente. Algunos autores indicaron la tendencia entre las especies que viven en ambientes húmedos a no presentar mucílago, mientras que otros autores sugirieron que el mucílago protege a las semillas de la desecación y forma un microclima que incrementa el porcentaje de germinación (Bonzani *et al.*, 2011). Si estas inferencias en relación con la humedad se consideraran en el proceso de propagación y cultivo de *C. mexicanum*, los riegos deberían mantenerse a saturación para una germinación óptima.

Protocolo de propagación

Las condiciones óptimas para la germinación de las semillas de *C. mexicanum* se incluyen a continuación a manera de ficha técnica, con base en este estudio. El método de germinación se ajustó para utilizarse en invernadero o casa sombra, con las siguientes recomendaciones: 1) sustrato de germinación sugerido en recomendaciones preliminares³, 50% arena + 50% lombricomposta, para facilitar buen drenaje, 2) agua corriente, con los valores permitidos por la FAO para agua de uso agrícola (Carrazón-Alocén, 2007) y 3) en charolas de germinación o semilleros. Además, cubrir los semilleros con tapas para incrementar la temperatura; sembrar en los meses más cálidos del año porque las semillas en las núculas mostraron el mayor porcentaje de germinación a 28 °C. También, mantener el riego diario a saturación y de ser necesario regar dos veces al día en temporada de calor; utilizar sistemas de riego por aspersión fina para evitar la pérdida de las núculas, debido a su tamaño.

Información de la especie

Nombre científico: *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts. Algunos nombres comunes: poleo, poleo verde, hierba del borracho, toronjil de monte y toronjil de menta. Familia: Lamiaceae. Origen: México. Usos: aperitivo, digestivo y medicinal; sedativo, analgésico, ansiolítico, antinociceptivo.

during viability tests prior to germination. Therefore, it is possible to infer that *C. mexicanum* is a myxocarpic species. This observation is relevant, because myxocarpy is common in the subfamily Nepetoideae, but does not occur in all species of the genus *Clinopodium* (Scandaliaris and Barboza, 2013).

The function of mucilage in the nutlets of the family Lamiaceae is not yet fully determined. Some authors indicated a trend among species living in humid environments to lack mucilage, while other authors suggested that mucilage protects seeds from desiccation and forms a microclimate that increases the germination percentage (Bonzani *et al.*, 2011). If these inferences regarding moisture were to be considered in the propagation and cultivation process of *C. mexicanum*, irrigations should be maintained at saturation for optimal germination.

Propagation protocol

The optimal conditions for germination of *C. mexicanum* seeds are included below as a technical data sheet, based on this study. The germination method was adjusted for use in a greenhouse or shade house, with the following recommendations: 1) germination substrate preliminary tested by the author³, 50% sand + 50% vermicompost, to facilitate good drainage, 2) tap water, with the values allowed by FAO (Carrazón-Alocén, 2007) and 3) in germination trays or seedbeds. In addition, cover the seedbeds with shade cloth to increase temperature; sow in the warmest months of the year because the seeds in the nutlets showed the highest germination percentage at 28 °C. Also, maintaining daily irrigation at saturation and if necessary, irrigate twice a day during the hot season, using sprinkler light irrigation systems to avoid the loss of the nutlets, due to their size.

Species information

Scientific name: *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts. Some common names (in Spanish) poleo verde, hierba del borracho, toronjil del monte and toronjil de menta. Family: Lamiaceae. Origin: Mexico. Uses: aperitif, digestive and medicinal, sedative, analgesic, anxiolytic, antinociceptive.

Caracteres diagnósticos y procedimiento para recolecta

Arbusto con tallos pubescentes, hojas opuestas, ovaladas, glabras, con margen aserrado; flores solitarias, de cáliz tubular y corola anaranjada dividida en dos labios con cuatro estambres sobresalientes. Cortar con tijeras de poda, sólo las ramas que presenten cálices persistentes, almacenar el material en bolsas de papel y separar las núculas en tamiz metálico 2mm. La época de recolecta puede ser durante todo el año. Como material de propagación, cortar sólo cálices persistentes cafés (semi-secos) para obtener núculas negras (maduras).

Descripción de cálices persistentes y núculas

Cálices persistentes. Forma cilíndrica, con cinco o lóbulos o dientes en el ápice; tonalidad verde en fresco y café en seco; tamaño promedio, 1.6 × 6.7 mm (anchura × longitud); peso, 436.5 cálices persistentes por gramo.

Núculas. Elipsoideas y simétricas, café (inmaduras) a negro (maduras); cuña blanquecina en la base; tamaño promedio, 0.8 × 1.6 mm (anchura × longitud); peso: 2686.5 núculas por gramo.

Almacenamiento y tratamiento pre germinativo

Los cálices persistentes y núculas se deben colocar en frascos pequeños (100 mL) con tapa. Recomendaciones: agregar un sobre de sílica gel al interior para reducir la humedad y conservar en buen estado las muestras; mantener los frascos en condiciones de sombra a temperatura y humedad ambiental. No es necesario ningún tratamiento pre germinativo. La viabilidad observada (en porcentaje, %) de las unidades de dispersión fue 33% en núculas color café y 100% en núculas color negro.

Método y condiciones controladas para germinación (laboratorio)

Contenedor: cajas Petri de vidrio, desinfectadas, sin tapa. Sustrato: algodón. Humedad ambiental: 30%. Fotoperiodo: 12:12 h luz/oscuridad. Riego: diario a saturación, con agua destilada. Temperatura: 28 °C.

Diagnostic characters and collection procedure

Shrub with pubescent stems, opposite leaves, oval, glabrous, with serrated margin; solitary flowers, tubular persistent fruiting calyx and orange corolla divided into two lips with four protruding stamens. Cut with pruning shears only the branches with fruiting calyxes, store the material in paper bags and separate the nutlets in a metal sieving mesh (2mm). Nutlets can be collected season can be throughout the year. As propagation material, cut only brown (semi-dry) fruiting calyxes to obtain black (mature) nutlets.

Description of fruiting calyxes and nutlets

Fruiting calyxes. Cylindrical shape, with five lobes or teeth at the apex; shade green when fresh and brown when dry; average size, 1.6 × 6.7 mm (width × length); weight, 436.5 fruiting calyxes per gram.

Nutlet. Ellipsoid and symmetrical, brown (immature) to black (mature); whitish wedge at base; average size, 0.8 × 1.6 mm (width × length); weight: 2686.5 nutlets per gram.

Storage and pre-germination treatment

Fruiting calyxes and nutlets should be placed in small vials (100 mL) with lids. Recommendations: add an envelope of silica gel in the interior to reduce humidity and preserve the samples in good condition; keep the vials in shaded conditions at room temperature and humidity. No pre-germinative treatment is necessary. The observed viability (percentage, %) of the dispersion units was, 33% in brown nutlets and 100% in black nutlets.

Method and controlled conditions for germination (laboratory)

Container: glass Petri dishes, disinfected, without lid. Substrate: cotton. Ambient humidity: 30%. Photoperiod: 12:12 h light/dark. Irrigation: daily at saturation, with distilled water. Temperature: 28 °C.

Método operativo y condiciones de germinación (en invernadero o casa sombra)

Contenedor: charolas de germinación o semilleros. Sustrato: 50% arena + 50% lombricomposta o *Peat moss*. Riego: a saturación, por aspersión con agua corriente. Época de siembra: a partir de abril y mayo (según la región de la recolecta) para aprovechar las temperaturas más altas. El uso de recubrimientos o domos es aconsejable para incrementar la temperatura del semillero; así como mantener la humedad y dar seguimiento constante para prevenir la deshidratación.

Germinación

Inicio: 4 d después de la siembra. Promedio (50% germinación): 6 d después de la siembra. Término: 16 d después de la siembra. Porcentaje máximo de germinación: 93%. El tiempo y porcentaje de germinación están sujetos al manejo de las condiciones ambientales y a la viabilidad de las núculas colectadas.

CONCLUSIONES

El estudio destacó algunos caracteres botánicos relevantes de la familia Lamiaceae en los órganos y estructuras reproductivos de *Clinopodium mexicanum* para usarlos con un enfoque agronómico. Durante las etapas fenológicas floración y fructificación, el cáliz permanece en la planta. Las núculas son las unidades de dispersión, pues aparentan y cumplen la función de semillas, aunque por su anatomía son frutos.

Este es el primer reporte detallado de los caracteres botánicos, tamaño, forma, color, cubierta y peso de cálices persistentes y núculas de *C. mexicanum*. Además, se aportó evidencia de la relación entre el color de cálices persistentes y núculas respecto a estado de madurez. También se recabó información ecológica sobre dispersión y germinación, como inferir la presencia de nautocoria y mixocarpia. Las unidades de dispersión (núculas) no necesitan tratamiento pre germinativo. El aumento en la temperatura durante la germinación causó incremento directo en el porcentaje de germinación.

Por último, se diseñó un protocolo de germinación completo, el cual incluye la identificación de la especie en campo, métodos de colecta, almacenamiento y recomendaciones prácticas para iniciar la propagación de la especie en invernadero o casa

Propagation method and germination conditions (greenhouse or shade house)

Container: germination trays or seedbeds. Substrate: 50% sand + 50% vermicompost or *Peat moss*. Irrigation: saturation, by aspersion with tap water. Sowing time: from April and May (depending on the collection site) to take advantage of highest temperatures. The use of covers or domes is advisable to increase the temperature of the seedbed; as well as maintaining humidity and monitoring to prevent dehydration.

Germination

Start: 4 d after sowing. Average (50% germination): 6 d after sowing. Term: 16 d after sowing. Maximum germination percentage: 93%. The time and percentage of germination depend on environmental conditions, management and the viability of the collected nutlets.

CONCLUSIONS

The study focused on some botanical characters of the Lamiaceae family in the reproductive organs and structures of *Clinopodium mexicanum* aiming at an agronomic approach. During the phenological stages of flowering and fruiting, the calyx remains on the plant. The nutlets are the dispersal units, since they look like seeds and function as propagation units, although anatomically they are fruits.

This is the first detailed report on the botanical characters, size, shape, color, shell and weight of fruiting calyxes and nutlets of *C. mexicanum*. Evidence was also provided on the relationship between the color of the fruiting calyxes and nutlets in regard to maturity stage. Ecological information on dispersal and germination was also collected, such as inferring the presence of nautochory and myxocarpia. The dispersal units (nutlets) do not require pre-germinative treatment. The increase in temperature during germination caused direct increase in germination percentage.

Finally, a complete germination protocol was designed. It includes the identification of the species in the field, collection methods, storage and practical recommendations to initiate the propagation of the species in a greenhouse or shade house. This

sombra. Esta información es relevante para la conservación de la especie porque en la actualidad se extrae de poblaciones silvestres sin plan de manejo y sin registros de propagación ni cultivo.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, A. M., F. García-Trejo, A. Cardador-Martínez, F. Magallán-Hernández. 2020. *Clinopodium mexicanum*: potential and difficulties for the sustainable use of a Mexican medicinal plant. Bol. Latinoam. y del Caribe Plant. Medic. y Arom. 19: 149-160.
- Bonzani, N. E., V. S. Bravi, y G. E. Barboza. 2011. Estudios morfo-anatómicos de gineceo y fruto en especies de *Mentha* (Lamiaceae) de Argentina. Caldasia. 33: 349 - 366.
- Bueno, M. S., S. R. Feldman, y J. P. Ortiz. 2007. Desinfección de cariopses y regeneración de plantas de *Spartina argentinensis*. Cien. Inv. Agr. 34: 231-236.
- Carrazón-Alocén, J. 2007. Manual práctico para el diseño de sistemas de mini riego. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (PESA-FAO). 39 p.
- Cassani, J., A. G. Escalona-Araujo, M. Martínez-Vázquez, N. Manjarrez, J. Moreno, y R. Estrada-Reyes. 2013. Anxiolytic-like and antinociceptive effects of 2(S)-Neoponcirin in mice. Molecules. 18: 7584 - 7599.
- Estrada-Reyes, R., M. Martínez-Vázquez, A. Gallegos-Solís, G. Heinze, J. Moreno. 2010. Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. J. Ethnopharmacol. 130: 1-8.
- FSC-GEF-UNEP (Forest Stewardship Council- Global Environment Facility-United Nations Environment Programme). 2016. Guía para la recolección de plantas medicinales. 2ª. Ed. ForCES. República de Chile. 70 p.
- Franco, T. L., y R. Hidalgo. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8. 89 p.
- González-Gallegos, J. G., H. A. Castillo-Gómez y J. L. Fernández-Alonso. 2017. Discovery of naturalized *Clinopodium nepeta* (Lamiaceae) in Oaxaca and San Luis Potosí, México. Phytotaxa 312: 279-286.
- González, V. M. J., T. Zanatta A., G. E. Meneghello., A. B. Noguez M., Y. Lezcano A. y P. Peña. 2019. Protocolo de análisis de viabilidad de semillas de chía mediante test de tetrazolio. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 10: 1481-1489.
- Hammer, Ø., A. T. Harper D., y P. D. Ryan. 2001. Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Paleontol. Electron. 4: 9 p.
- Hanan-Alipi, A. M. 2009. Ficha *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts. Malezas de México. CONABIO. http://www.conabio.gob.mx/malezasde_mexico/lamiaceae/clinopodium-mexicanum/fichas/ficha.htm (Consultado: mayo 2018).
- Harley, R. M., S. Atkins., A. L. Budantsev., P. D. Cantino., B. J. Conn., R. Grayer., M. M. Harley., R. the Kok., T. Krestovskaya., R. Morales., A. J. Paton., O. Ryding. and T. Upson. 2004. Labiatae. In: Kubitzki, J.W. (ed.) The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants. Dicotyledons. Lamiales (except Acanthaceae, including Avicenniaceae). Springer. New York, USA. pp:167-275.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies-Jr., and R. L. Geneve. 2011. Plant Propagation: Principles and Practices. 8th Ed. Prentice Hall. Hoboken, NJ. USA. 915 p.
- Hernández-Gómez, J. A., y S. Miranda-Colín. 2008. Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispanica*). Rev. Fitotec. Mex. 31: 105-113.
- Joosen, R. V., J. Kodde, L. A. Willems, W. Ligterink, van der Plas, L. H., y H. W. Hilhorst. 2010. Germinator: a software package for high throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. Plant J. 62: 148 - 159.
- Martínez-Gordillo, M., Frago-Martínez, I., García-Peña, M. R. y Montiel, O. 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. Rev. Mex. Biodiv. 84: 30-86.
- Martínez-Gordillo, M., B. Bedolla-García, G. Cornejo-Tenorio, I. Frago-Martínez, M. García-Peña., J. González-Gallegos, S. Lara-Cabrera y S. Zamudio. 2017. Lamiaceae de México. Bot. Sci. 95: 780-806.
- Moré, E., Fanlo, M., Melero R. y Cristóbal R. 2010. Guía para la producción sostenible de plantas aromáticas y medicinales. Centro Tecnol. For. Cataluña. 10 p.
- Palma-Tenango, M., R. San Miguel-Chávez y R. M. Soto-Hernández. 2017. Aromatic and Medicinal Plants in Mexico. Intech OS chapter. DOI: 10.5772/66507.
- Pichersky, E. y R. A. Raguso. 2016. Why do plants produce so many terpenoid compounds? New Phytol 220: 692-702.
- SAS Institute Inc. 2007. New features for JMP 7.0. What's new in JMP Integration. https://www.jmp.com/support/notes/41/adl/fusion_41004_1_newfeatures7_0.pdf (Consultado: mayo 2018).
- Scandaliaris, M. y G. E. Barboza. 2013. Differentiation of Argentine species of *Clinopodium* (Lamiaceae: Nepetoideae) through morphological and anatomical characteristics of its fruits. J. Bot. Res. Inst. Texas. 7: 203-215.
- TWC (The Weather Company). 2018. Weather Underground. Product and Technology 2014-2018. <https://www.wunderground.com/> (Consultado: junio 2018).
- Tapia M., E. R., F. E. Acaro C. y A. J. Castro L. 2017. Actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara". Ágora 4: 1-6.
- Wood, J. R. I. 2011. *Clinopodium* L. (Lamiaceae) in Bolivia. Kew Bull. 66: 199-226.

—End of the English version—



LA CAFETICULTURA TRADICIONAL FRENTE A LA ROYA ANARANJADA: EL CASO DE LA REGIÓN TIERRADENTRO, CAUCA, COLOMBIA

TRADITIONAL COFFEE FARMING FACING ORANGE RUST DISEASE: THE CASE OF TIERRADENTRO REGION, CAUCA, COLOMBIA

Anabel **Martínez-López**¹, Gustavo Adolfo **Alegría-Fernández**², Gersain **Medina-Yara**³, Benigno **Rodríguez-Padrón**^{4*}

¹Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM), Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México. 56230, México. ²Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Carretera 1061 N14, Popayán, Colombia. ³Asociación Campesina de Inzá Tierradentro (ACIT), Inzá, Cauca, Colombia. ⁴Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México. 56230, México. (beroopadron_67@hotmail.com).

RESUMEN

El grado de tecnificación y las condiciones de producción del cultivo de café (*Coffea arabica*) en los países productores difieren unas de otras; pero comparten los bajos precios del grano en el mercado como problema en particular. Las mermas en la producción agravan las pérdidas, porque la roya del café es la enfermedad de mayor importancia económica. El objetivo de este estudio fue examinar el manejo tradicional del cultivo de café respecto al control de la roya en las pequeñas unidades de producción en la región Tierradentro, departamento del Cauca, Colombia, e identificar las problemáticas principales para diseñar líneas de acción para solventarlas. La metodología consistió en la selección de unidades de producción por medio de un muestreo intencional o de conveniencia, con aplicación de entrevistas semiestructuradas y el análisis de la información se realizó con estadística descriptiva. Los resultados obtenidos indicaron que los productores continúan con el sistema de producción tradicional e incorporan prácticas agronómicas para incrementar el rendimiento y mejorar la calidad del grano. Por ejemplo, la renovación con variedades resistentes a la roya, aplicación de fertilizantes, análisis de suelos, plantación en sombra y limpieza del cafetal. El problema principal identificado fue el costo alto de los insumos y los precios bajos del café en el mercado. Por lo tanto, se concluye que el cultivo tradicional del café en conjunción con la adopción de otras prácticas agrícolas logró modificar la jerarquía de los problemas al enfrentar la importancia de la roya, debido a que permitió controlar la incidencia de la enfermedad en los cafetales.

ABSTRACT

The degree of technification and the conditions for the production of coffee (*Coffea arabica*) in producing countries differ from one to another, although they share low prices for the grain in the market as a particular problem. The decrease in production aggravates losses, since coffee rust is the disease with the greatest economic importance. The aim of this study was to examine the traditional management of the coffee crop regarding the control of rust in small production units in the region of Tierradentro, department of Cauca, Colombia, as well as to identify the main problems in the design of lines of action to solve them. The methodology consisted in selecting production units, using an intentional or convenience collection of samples, with the application of semi-structured interviews, and the information was analyzed using descriptive statistics. The results obtained indicated that farmers continue using the traditional farming system and incorporate agronomic practices to increase yields and improve grain quality. Such practices include renovation of the coffee plantation with rust-resistant varieties, the use of fertilizers, soil analysis, planting under shade and cleaning the plantation. The main problem identified was the high cost of inputs and the low prices of coffee in the market. We therefore conclude that the traditional coffee plantation methods, along with the adoption of others agricultural practices, helped to modify the hierarchy of the problems by facing the importance of rust, since it allowed to control the incidence of the disease in the coffee plantations.

Key words: traditional coffee plantation, *Coffea arabica*, small-scale production units, orange rust, *Hemileia vastatrix*, traditional agricultural practices.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5594-6272>.

Recibido: septiembre, 2020. Aprobado: julio, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 451-469. 2021.

Palabras clave: cultivo tradicional de café, *Coffea arabica*, pequeñas unidades de producción, roya anaranjada, *Hemileia vastatrix*, prácticas agrícolas tradicionales.

INTRODUCCIÓN

La epidemia de roya del café, enfermedad causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, ha sido motivo de preocupación constante para los colombianos. Desde su aparición en Brasil en 1970, Colombia tomó una serie de acciones encaminadas a afrontar la llegada del patógeno. En principio se orientó al desarrollo científico a través del Centro Nacional de Investigaciones en Café (CENICAFÉ) y a la preparación constante de los productores para reconocer este patógeno en el campo. Asimismo, se entregó una variedad resistente nueva, llamada Colombia, junto con un paquete tecnológico basado en fungicidas para su control (Buriticá, 2010). Sin embargo, hoy se sabe que el hongo superó la resistencia de las variedades consideradas genéticamente resistentes, lo cual mantiene constante la problemática de mermas en el rendimiento (Renard y Larroa, 2017).

De acuerdo con Buriticá (2010), *Hemileia vastatrix* es uno de los patógenos más investigados por la ciencia agronómica. Sin embargo, a pesar de la lucha contra esta enfermedad no se ha podido erradicar en los países productores. Por lo tanto, aún quedan vacíos de conocimiento para comprender su comportamiento en el ambiente colombiano. Ya que el café es una planta de naturaleza tropical, es necesario realizar investigaciones *in situ* en los países donde se cultiva, por lo cual esta investigación se llevó a cabo con traslados al territorio Caucaño. A pesar de que en Colombia ya se cuenta con material genético resistente, con buena productividad y calidad del grano; todavía tres cuartas partes del área sembrada con café tiene variedades susceptibles expuestas al patógeno causante de la roya. La severidad del ataque depende de las condiciones ambientales, del manejo agronómico del cultivo y una epidemia severa puede afectar la producción de manera importante (Rivillas *et al.*, 2011).

Ante este escenario se optó por un control basado en el manejo tradicional de los cafetales aunado al estudio del ciclo biológico del hongo para la interrupción oportuna de su ciclo de vida. El fin es evitar porcentajes de infección altos; llegar a lograr una convivencia con el hongo, sin que existan mermas importantes en la producción. Al respecto, Castillo-

INTRODUCTION

The epidemic of coffee rust, a disease caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, has been a constant concern for Colombians. Since its appearance in Brazil in 1970, Colombia took a series of actions to face the arrival of the pathogen. It initially targeted scientific development via the National Coffee Research Center (Centro Nacional de Investigaciones en Café - CENICAFÉ) and the constant training of farmers to recognize this pathogen in the field. Likewise, a new and resistant variety was delivered, called Colombia, along with a fungicide-based technology package for its control (Buriticá, 2010). However, it is a well-known fact that the fungus overcame the resistance of varieties considered genetically resistant, which keeps yield reductions as a constant problem (Renard and Larroa, 2017).

According to Buriticá (2010), *Hemileia vastatrix* is one of the most widely researched pathogens in agricultural science. However, despite the struggle against this disease, it is not eradicated yet in coffee producing countries. Therefore, gaps in knowledge still exist to understand its behavior in the Colombian environment. Because the coffee plant is tropical in nature, research must be carried out *in situ* in the countries where it is produced, which is why this investigation was carried out with trips to Cauca. Although Colombia already has resistant genetic material, with good productivity and grain quality, three quarters of the coffee-producing areas have susceptible varieties exposed to the pathogen that causes rust. Severity of the attack depends on the environmental conditions, agronomic management, and a severe epidemic may seriously affect production (Rivillas *et al.*, 2011).

Considering this scenario, a control based on traditional management of coffee plantations is used, along with the study of the biological cycle of the fungus for the opportune interruption of its life cycle. The goal is to avoid high infection rates, to coexist with the fungus without this leading to important reductions in production. In this regard, Castillo-Ponce (2013) carried out studies in coffee-growing areas in Mexico and proved that, with an accurate and strict management schedule, pathogenic reproduction rates can be reduced.

Traditional knowledge is the “know-how” of an adequate agricultural management, since it

Ponce (2013) realizó estudios en zonas cafetaleras de México y aportó evidencia de que con un calendario preciso de manejo estricto, se pudo disminuir el nivel de reproducción del patógeno.

El conocimiento tradicional se conceptualiza como el “saber hacer” un manejo agronómico adecuado, al considerar las condiciones climáticas y ambientales de las zonas manejadas. Este conocimiento forma parte de la cosmovisión de los productores dentro de su núcleo poblacional. Y también es importante la labor de los técnicos capacitados en el tema, quienes aportan conocimiento reciente en el desarrollo de tecnologías alternativas para la mitigación de los daños causados por el hongo de la roya (Martínez-López *et al.*, 2019).

Dicho personal técnico está presente en la región Tierradentro a través de la Asociación Campesina de Inzá Tierradentro (ACIT). Ésta es una organización sin fines de lucro que ha trabajado muchos años de la mano con los campesinos para lograr mejoras en los sistemas de producción agrícola e integración con otras actividades para la generación de alimentos. La asociación tiene presencia en cinco zonas del municipio de Inzá con un equipo de extensionistas preparados para brindar orientación a los productores en cada actividad. El ámbito geográfico de la organización abarca las áreas: zona Occidente, zona Turminá, zona San José, zona Pedregal y el Parque Arqueológico de San Andrés (ACIT, 2004).

Con el apoyo de ACIT y la premisa de que los productores poseen conocimiento tradicional que aplican a través de prácticas agrícolas propias en el cultivo, como cuidado del suelo, limpieza del cafetal e incorporación de sombra; aun en las variedades tradicionales se puede mitigar los daños causados por la roya del café. El objetivo de este estudio fue examinar el manejo tradicional del cultivo de café relativo al control de la roya en las pequeñas unidades de producción en la región Tierradentro, departamento del Cauca, Colombia, e identificar sus problemas principales para proponer líneas de acción para resolverlos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La organización agraria de la República de Colombia está dividida en 32 departamentos, los cuales se dividen en municipios. Los municipios están conformados por veredas y en éstas confluyen los resguardos ocupados por indígenas y los campesinos cuya propiedad es privada. En este contexto, la región de Tierradentro

considers weather and environmental conditions of the managed areas. This knowledge is part of the cosmovision of the farmers in their population nucleus. The work of technicians trained on the topic is also important, since they provide recent knowledge on the development of alternative technologies to mitigate damages caused by the rust fungus (Martínez-López *et al.*, 2019).

This technical staff participate in the Tierradentro region, via the Inzá Tierradentro Farmers Association (ACIT). This is a non-profit organization that has worked for many years hand-in-hand with farmers to achieve improvements in agricultural farming systems, integrating other activities for food production. The association is present in five areas of the municipal area of Inzá, with a team of extension agents, trained to provide guidance to farmers in each activity. The geographic scope of the organization covers the areas of Occidente, Turminá, San José, Pedregal and the San Andrés Archaeological Park (ACIT, 2004).

With the support of the ACIT and the premise that farmers have traditional knowledge that they apply as agricultural practices typical for the crop, such as soil conservation, cleaning coffee plantation and the use of shade-trees, even in those common varieties, damages caused by coffee rust can be reduced. The aim of this study was to examine the traditional management of coffee plantations regarding the control of rust in small-scale production units in the Tierradentro region, department of Cauca, Colombia, and to identify their main problems in order to propose lines of action towards problems solutions.

MATERIALS AND METHODS

The agrarian organization of the Republic of Colombia is divided into 32 departments, which are divided into municipal areas. These are composed of “veredas” (counties) in which there is a convergence of lands occupied by indigenous people and farmers, whose land tenure is private. In this context, the region of Tierradentro is composed of two municipal areas, Inzá and Páez. The territory is located in southwestern Colombia, on the eastern slope of the Central Andes Range and it belongs to the Magdalena River basin.

The basin has an extension of approximately 6000 km² delimited in the north by the Nevado del Huila volcano, which has a height of 5756 m; in the west, by the edges of

está conformada por dos municipios, Inzá y Páez. El territorio está ubicado en el sur occidente de Colombia, en la vertiente oriental de la Cordillera Central de los Andes y pertenece a la cuenca hidrográfica del río Magdalena.

La cuenca tiene una extensión aproximada de 6000 km² delimitados al norte por el nevado del Huila, altitud 5756 m; al occidente por los filos de la Cordillera Central, Moras, Las Delicias y Guanacas; al sur y al oriente por el límite departamental del Huila (Puerta, 1987). El parteaguas del polígono triangular es el nevado del Huila (Figura 1). Tierradentro es una región accidentada y compleja, caracterizada por profundas depresiones geográficas. Debido a sus dimensiones y a su ubicación geográfica, presenta una gran variedad de climas, desde el templado frío hasta llegar al páramo. Las temperaturas y los niveles de precipitación varían según la altitud y la época del año (Márquez-Díaz, 2009).

El estudio se realizó con el enfoque cualitativo (Hernández *et al.*, 2010). De acuerdo con este método, la recolección de datos derivó de fuentes de información diversas (Figura 2). La observación participante se utiliza para identificar conflictos en la comunidad al evaluar necesidades y problemas. Así como determinar los medios para involucrar a las personas en la solución de las necesidades principales identificadas (Santoyo *et al.*, 2002).

El análisis de esta información cualitativa se realizó a través de jerarquización con tablas dinámicas en Excel[®] durante 2018. Para la selección de la muestra de productores de café, se usó la técnica de muestreo intencional o por conveniencia. Debido a que el estudio se enfocó en la producción de café con manejo tradicional, los productores elegidos cumplían con las características siguientes: tener al café como cultivo principal, realizar prácticas agrícolas tradicionales y no poseer más de cinco hectáreas.

La técnica de muestreo por conveniencia permite elegir personas informantes con las características deseadas según el objetivo de la investigación (Santoyo *et al.*, 2002); en nuestro

the Central Andes, Moras, Las Delicias and Guanacas; to the south and west, by the departmental limits of Huila (Puerta, 1987). The watershed of the triangular polygon is the Nevado del Huila (Figure 1). Tierradentro is an uneven and complex region, characterized by deep geographic depressions. Due to its dimensions and geographic location, it has a wide variety of climates, from temperate cold to the moors. Temperatures and rainfall levels vary depending on the altitude and time of the year (Márquez-Díaz, 2009).

The study was carried out using a qualitative approach (Hernández *et al.*, 2010). According to this method, the collection of data came from diverse information sources (Figure 2). Participant observation was used to identify conflicts in the community by evaluating needs and problems, as well as to determine those methods to get people involved in the solutions to the main needs identified (Santoyo *et al.*, 2002).

The analysis of this qualitative information was carried out by hierarchical organization of data using Excel[®] pivot tables in 2018. To select the sample of coffee producers, an intentional or convenience sampling method was used. Since the study was focused on traditionally managed coffee production, the farmers selected had the following characteristics: coffee was their main crop, they carried out traditional agricultural practices and to be owners of no more than five hectares.

The convenience sampling method helps to select informers with the desired characteristics according to the aim of the research (Santoyo *et al.*, 2002); in our case, crop management to control coffee rust. Thirty two small-scale coffee farmers were selected, owners of lands with less than 5 ha of coffee plantations with Arabica and other varieties susceptible to orange rust. In the region, the coffee production system is diversified with other crops such as sugarcane and pitahaya (*Selenicereus megalanthus*); this was a common characteristic of all interviewees.

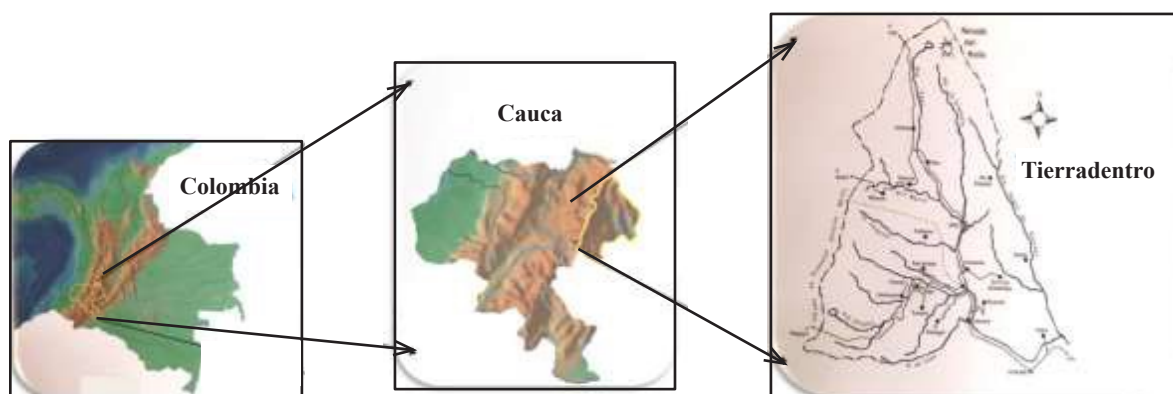


Figura 1. Localización de la región Tierradentro, Cauca, Colombia (CEMTUR, 2018).
Figure 1. Location of the Tierradentro region, Cauca, Colombia (CEMTUR, 2018).

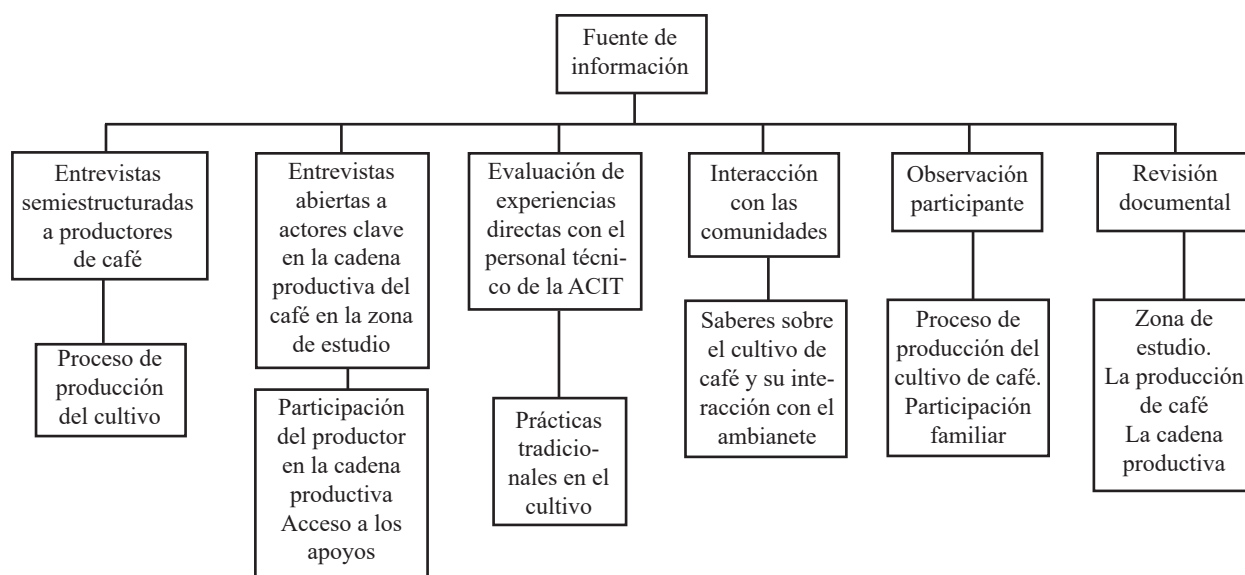


Figura 2. Fuentes principales de información para la investigación en campo.
Figure 2. Main sources of information for the field survey.

caso, el manejo del cultivo para combatir la roya del café. Treinta y dos pequeños productores de café convencional se eligieron, todos con menos de 5 ha plantadas con café arábigo y variedades susceptibles a la roya anaranjada. En la región, el sistema de producción del café se diversifica con otros cultivos como caña y pitahaya (*Selenicereus megalanthus*); ésta fue una característica común entre los entrevistados.

Las zonas de influencia de la ACIT seleccionadas en el marco del estudio regional fueron, zona Occidente, zona Turminá, zona San José y zona Pedregal, seleccionadas con base en su estructura productiva. Las entrevistas dirigidas se aplicaron con la visita a cada productor en su domicilio, además de realizar recorridos por las parcelas de café, con otros cultivos como la caña panelera y la pitahaya. La estructura de las entrevistas a productores fue la siguiente: I. Datos de la unidad de producción; II. Datos de la parcela de café; III. Saberes y prácticas agrícolas para el control de la roya.

También se seleccionaron cinco informantes clave con la metodología de bola de nieve (Santoyo *et al.*, 2002); se tomó en cuenta la participación en la cadena productiva del café, la experiencia y el tiempo de trabajo en la región. Así como la capacidad de gestión para lograr una integración entre los pequeños productores y los distintos eslabones de la cadena productiva. Un informante se eligió a nivel de producción primaria, otro a nivel de la transformación del grano, uno más a nivel de la comercialización, otro a nivel del sector social y por último, uno a nivel de desarrollo de innovaciones en la región. Las entrevistas abiertas a informantes clave se realizaron para complementar y

The areas of influence of the ACIT selected in the regional study framework were Occidente, Turminá, San José and Pedregal, which were selected based on their productive structure. The directed interviews were conducted with visits to each farmer in their households, as well as visits to all coffee plantations with other crops such as sugarcane and pitahaya. The structure of farmer interview was as follows: I. Data of the production unit; II. Data of the coffee plot; III. Agricultural knowledge and practices for rust control.

Five key informers were also selected using the snowball method (Santoyo *et al.*, 2002); their participation in the coffee production chain, experience and time they had worked in the region were also considered. Along with their management ability to bring together the small-scale farmers, and the different links of the production chain. One informer was selected on a primary production; another, for the stage of processing from berries transforming into beans; a third one, at the commercialization; another, from the social sector, and the last one, from the sector regarding innovation and development in the region. The open interviews to key informers were carried out to complement and understand how the activities are integrated into the chain, how farmers participate, the problems they face, and what progress has been made in terms of development for the small-scale production units.

A logbook journal was kept on a daily basis to record important elements and the meaning of the activities for the farmers on the crop, as well as to identify problems and solutions that farmers propose to improve their quality of life around

comprender cómo se integran las actividades en la cadena, cuál es la participación de los productores, los problemas que enfrentan, y cuáles son los avances en materia de desarrollo para las pequeñas unidades de producción.

Un diario de campo se redactó para registrar cada día los elementos importantes y el significado que las actividades en el cultivo tienen para los productores; así como para identificar los problemas y soluciones que los productores proponen para mejorar la calidad de vida en torno a la agricultura. La recopilación de material fotográfico fue útil para ilustrar la variedad amplia de productos agrícolas y pecuarios que se producen en la región. Y también para documentar la diversidad biológica, el efecto de la variedad de climas, y la flora y fauna endémicas de la región.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las unidades de producción campesina en Tierradentro

A partir de las entrevistas realizadas a los productores de café en la región, se determinó que los campesinos tienen una edad promedio de 53 años, escolaridad hasta quinto año de primaria y el 100% pertenece al campesinado. El rezago educativo es una condición inminente en la mayor parte de las regiones productoras de café, con ello se relaciona el círculo de pobreza del cual no han logrado salir. En un estudio realizado por Cardeña (2019) en una región cafetalera de Puebla, México estas proporciones resultaron similares, la autora realizó una correlación entre la edad y la escolaridad y resultó negativa. Lo cual significa que los productores con edad mayor tienen menos años de escolaridad; situación que predomina en las zonas rurales cafetaleras mexicanas, además de una condición de pobreza crónica en estos productores, agravada por la caída drástica de los precios del café desde 1989.

En Tierradentro, Colombia, las familias campesinas integran en promedio a cuatro personas, de las cuales, sólo dos participan en el cultivo del café. Esto evidencia poco interés de los integrantes por dedicarse a este cultivo, en especial los hijos jóvenes de los cafetaleros, quienes prefieren la búsqueda de ingresos en otros lugares y actividades, lo cual provoca desintegración familiar. Esta es una característica común en las zonas cafetaleras con marginación alta, Ortega y Ramírez (2013) al encontrar resultados similares en México, propusieron alternativas como el ofrecimiento de servicios a través del turismo rural,

agricultura. A compilation of photographs was useful to record the wide variety of agricultural and livestock products of the region, as well as to document the biological diversity, the effect of the variety of climates, and the flora and fauna endemic to the region.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the small-scale farming production units in Tierradentro

Using the interviews conducted on the coffee farmers in the region it was determined that the average age of the farmers is 53, their average education up to 5th year of elementary school, and the 100% are peasants (low-income landowners and producers). Incomplete formal education is an imminent condition in most coffee-producing regions, which relates to the circle of poverty that still prevails among them. In a study by Cardeña (2019), in a coffee-producing region of Puebla, Mexico, these proportions were similar; the author correlated age and education and it resulted in negative trend, meaning that older farmers have lower education levels. This situation predominates in the rural coffee-growing areas of Mexico, along with a condition of chronic poverty in these farmers, aggravated by the drastic fall in coffee prices since 1989.

In Tierradentro, Colombia, the families of the farmers are constituted of four people on average, out of which only two participate in coffee cultivation. This shows the little interest of some family members towards this crop, particularly the young adults in the offspring of coffee farmers, who prefer to search for income in other places and other activities, leading families to separate. This is a common socioeconomic feature in highly marginalized coffee-producing areas. Ortega and Ramírez (2013) found similar results in Mexico and proposed alternatives such as providing rural tourism services, requesting payments for providing environmental services, and organizational experiences surrounding coffee with the Rainforest Alliance.

The Colombian government has promoted the “Escuela y café” (School and Coffee) program as a strategy to promote coffee production among the children of farmers⁵. In Mexico there is the proposal of implementing this model in coffee-producing areas in order to promote family union, reduce migration

el desarrollo de pago por prestación de servicios ambientales y experiencias organizativas en torno al café con Rainforest Alliance.

El gobierno colombiano ha impulsado el programa “Escuela y café”, como estrategia para infundir la apropiación del cultivo de café a los hijos de productores⁵. En México existe la propuesta de implementar este modelo en las zonas cafetaleras, con el fin de promover la unión familiar, disminuir la migración de los jóvenes y aumentar la participación de los integrantes de las familias en el cultivo (IICA, 2018).

Los cafeticultores realizan la contratación de cinco trabajadores en promedio para la recolección del café. Sin embargo, no todos los productores tienen la posibilidad de cubrir estos gastos durante la cosecha. Esto ocasionalmente conlleva pérdidas por sobre maduración del fruto que no se alcanza a recolectar a tiempo. Además de la falta de solvencia para cubrir los salarios, Alviar y García (2020) afirmaron que existen otros factores que dificultan el empleo de mano de obra, entre ellos demanda de un gran esfuerzo físico con remuneración baja, falta de garantías laborales y rotación frecuente, pues los trabajadores declinan con facilidad si encuentran ofertas laborales más atractivas. En Tierradentro, el 42% de los entrevistados realiza actividades económicas adicionales a la producción de café para generar ingresos; entre estas están: la ganadería, la apertura de pequeñas tiendas de abarrotes y la cría de carpa roja (*Ciprurus carpio*) o mojarra (*Oreochromis mossambicus*). Más de la mitad de los entrevistados también se dedica a la cría de especies pecuarias menores, gallinas, pavos, conejos, cuyos, cerdos y ovejas (Figura 3).

in youngsters and increase the participation of family members in coffee cultivation (IICA, 2018).

Coffee farmers hire an average of five workers to harvest the coffee. However, not all farmers can afford this expense during harvest. This often leads to losses of the fruit that, due to overripening, is not picked in a timely manner. In addition to the inability to pay these wages, Alviar and García (2020) claimed that other factors also make hiring labor force difficult, including the demand of arduous physical effort with little payment, a lack of work rights and warrants and frequent laborers rotation, since workers decline easily if they find more attractive work offers. In Tierradentro, 42% of interviewees perform activities aside from producing coffee to increase income, including livestock, small grocery stores, and aquaculture, the breeding of red carp (*Ciprurus carpio*) or “mojarra” (*Oreochromis mossambicus*). Over half of the interviewees also breed minor livestock species such as chickens, turkeys, rabbits, pigs or sheep (Figure 3).

A large percentage of farmers also allocate resources to production of foods in family-owned orchards. Ninety percent of the coffee farmers interviewed have their own vegetable orchards. In this way, they ensure the consumption of healthy and innocuous vegetables, free of toxic products. Vegetable orchards are the result of farmer knowledge on the importance of health and environmental care, they acknowledge environment as their means of subsistence. Along with medicinal plants, families include vegetables in their small areas. This is a favorable aspect because, according to Piñeiro *et al.* (2015), the rust crisis

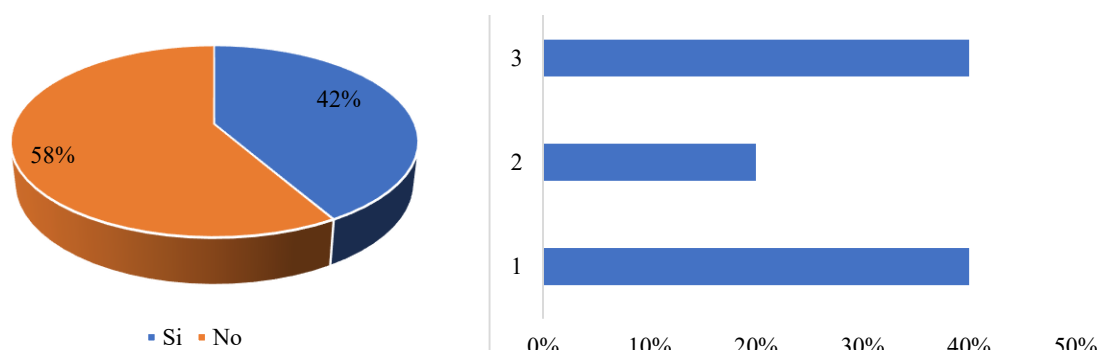


Figura 3. Actividades económicas complementarias al cultivo de café.
Figure 3. Economic activities complementary to coffee plantation.

⁵G. Medina, comunicación personal, junio 2018. Informante clave: desarrollo de innovaciones en la región.

Un porcentaje alto de los productores también dedica recursos a la producción de alimentos en huertos familiares. El 90% de los cafetaleros entrevistados tienen establecidos huertos con hortalizas; de esta manera se aseguran el consumo de vegetales sanos e inocuos, libres de productos químicos. Los huertos son el resultado de una conciencia plena de la importancia del cuidado de la salud y del ambiente, su medio de subsistencia. Además de plantas medicinales, las familias campesinas incluyen hortalizas en sus pequeñas superficies. Este resulta ser un aspecto favorable porque de acuerdo con Piñeiro *et al.* (2015) la crisis de la roya puso en riesgo la seguridad alimentaria de miles de familias entre los trabajadores agrícolas y pequeños productores.

Respecto a la organización para la producción de café, todos los entrevistados pertenecen a alguna organización o cooperativa de productores. Por medio de estas organizaciones se unen esfuerzos para aplicar tecnologías apropiadas y obtener capacitaciones. De acuerdo con lo referido por los informantes en las entrevistas, la organización hace posible que más del 90% de sus asociados reciban apoyos de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (FNC). Las organizaciones a las cuales pertenecen los productores en orden de importancia son: FNC, Asociación de Productores de Café del Oriente Caucaño (ASORCAFÉ), Pazadentro, NESPRESSO/Nestlé, Asociación para el Desarrollo y Progreso de la Comunidad Yanacona (ASPROYAN) y Asociación Campesina de Inzá Tierradentro (ACIT); con porcentajes distintos de afiliación (Figura 4).

jeopardized food security for thousands of families of agricultural workers and small-scale farmers.

Regarding the organization for coffee production, all interviewees belong to a farmer organization or cooperative. With these organizations, they join efforts to apply appropriate technologies and get training. According to statements by informers in the interviews, organizations help over 90% of their associates to obtain funds from the Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (FNC). The organizations in order of importance, to which farmers affiliate are: the –FNC, Asociación de Productores de Café del Oriente Caucaño (ASORCAFÉ), Pazadentro, NESPRESSO/Nestlé, Asociación para el Desarrollo y Progreso de la Comunidad Yanacona (ASPROYAN) y Asociación Campesina de Inzá Tierradentro (ACIT), with different affiliation percentages (Figure 4).

Participation of key social partners in the coffee production chain

The key social partners are people or entities with an important participation, that are in constant activity within the territory. In this case, both in Tierradentro where coffee is produced, as well as where coffee beans are processed and sold, and management occurs in every step of the coffee production chain.

The main problems as social partners perceive them are prices, the high investment required to produce this high quality coffee, and the low prices

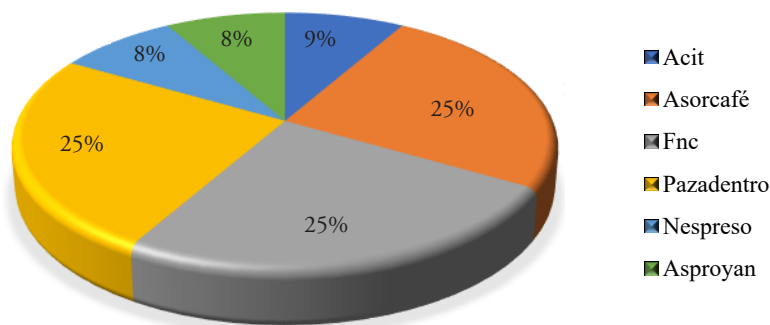


Figura 4. Afiliación (%) de los productores entrevistados a organizaciones y cooperativas.
Figure 4. Affiliation (%) of interviewed farmers to organizations and cooperatives.

Participación de actores clave en la cadena productiva del café

Los actores clave son personas físicas o morales que tienen una participación importante y están en actividad constante dentro del territorio, tanto en Tierradentro donde se produce el café, como donde se procesa y comercializa, y donde realice gestión en cada eslabón de la cadena productiva.

Los problemas principales desde la perspectiva de los actores clave son: los precios, la inversión alta requerida porque se produce café de calidad excelente, y los precios de venta bajos del producto final. La producción de café se realiza con un paquete tecnológico cuyo costo, en muchos casos, no puede ser cubierto por el productor y le obliga a buscar otras fuentes de ingresos que permita generar lo necesario para realizar la compra de insumos; por esas razones la producción de café se vuelve insostenible. Avelino *et al.* (2015) señalaron que las epidemias intensas ocurridas durante los 37 años más recientes en Centroamérica y Colombia coincidieron con periodos de rentabilidad baja del café y la caída de los precios del grano. En aquellas condiciones, tanto los aumentos en los costos de los insumos como la rentabilidad baja conllevaron a un manejo subóptimo del café, el cual lo hizo más vulnerable a plagas y enfermedades.

Los problemas ambientales estuvieron en segundo lugar. La cafeticultura en el país es muy intensiva y se realiza sin el manejo adecuado de los suelos, lo cual incrementa la erosión. Además, el sistema financiero respalda sólo a los proyectos para el establecimiento de cafetales sin sombra y se incrementa la superficie de cafetales a sol. Este tipo de manejo agrícola intenso conlleva el problema ambiental de la contaminación producida por agroquímicos y desechos generados por el beneficio del café (el proceso de despulpar la cereza para obtener el grano).

Un tercer problema que destacó es la comercialización del café a través de intermediarios, el comprador o “coyote” se queda con la mayor parte de los ingresos generados con la venta del grano. Así, comercializadores, beneficiadores y exportadores obtienen la mayor parte de los beneficios económicos. Aunque la zona es reconocida por producir café de muy buena calidad, el ingreso económico no mejora la calidad de vida de los productores. La cadena productiva del café también se puede interrumpir al no poder competir en el mercado por cantidad y calidad; así como

of the final product. Coffee is produced within a technological procedure whose cost in many cases cannot be covered by the farmers, forcing them to search for other sources of income to acquire the resources they need to purchase coffee production inputs and because of that, coffee production becomes unsustainable. Avelino *et al.* (2015) pointed out that the intense epidemics in the past 37 years in Central America and Colombia coincided with periods of low revenues from coffee and with the fall in the prices of the beans. In those conditions, either a rise in costs of inputs or low income revenues led to a suboptimal management of coffee, making it more vulnerable to pests and diseases.

The environmental problems were perceived in second place. Coffee production is very intensive in Colombia, and it is carried out without an adequate soil management, then increasing erosion. In addition, the financial system only supports projects for the establishment of coffee plantations without shade, thus the number of coffee plantations under direct sunlight increases. This type of intensive agricultural management leads to the problem of the environmental pollution caused by industrial agrochemicals and by the waste produced when coffee berry is processed (this process is called “beneficio”, and it refers to remove the pulp from the coffee berries in fermentation and washing tanks).

A third highlighted problem was the commercialization of coffee through middlemen. The middleman or “coyote” keeps most of the income produced with the sale of the coffee beans. In this way, marketers, coffee processing facilities and exporters obtain the largest part of the economic benefits. Although the area is known for producing high quality coffee, total income does not improve the quality of life for farmers. The productive chain of coffee can also be interrupted when it is unable to compete in the market for quality and quantity, or when it cannot comply with certain product conditions demanded by the client. Therefore, productivity must be increased without disregarding quality, since quality is key to becoming more competitive in the market (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

Regarding the funds granted to achieve a greater chain integration, ASORCAFÉ as part of a commercial strategy, obtained resources from buyers to finance washing tanks, driers, machinery

al no cumplir con ciertas condiciones del producto exigido por el cliente. Por lo que se debe aumentar la productividad, pero sin reducir la calidad; pues la calidad del producto es la clave para tener competitividad en el mercado (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

Respecto a los apoyos para lograr una integración mayor de la cadena, ASORCAFÉ por estrategia comercial consiguió recursos con compradores para financiar tanques tina, secadores, maquinaria y para otorgar microcréditos. Además, ASORCAFÉ cada año capacita a los productores a través de técnicos que se rigen por políticas distintas a las de la FNC, sobre todo en relación con la fertilización ecológica; la cual no afecta al ambiente y su costo es menor. Para el desarrollo de la cafecultura se suman los esfuerzos de la alcaldía del municipio de Inzá que aporta recursos para infraestructura y el Servicio Nacional de Aprendizaje de Colombia (SENA) contribuye con capacitaciones para los jóvenes, en particular en el proceso de beneficio del café.

A nivel regional en el Cauca, recién se operó un proyecto del sistema general de regalías, las cuales son recursos disponibles para la inversión social que provienen de la explotación minera (petróleo y carbón) de donde se generan recursos para los departamentos. En el Cauca estos recursos se destinaron al financiamiento de un proyecto “Cafecultura: una oportunidad en el pacto social por el Cauca”, con el cual se apoyaron a cerca de 11 000 familias en el tema de infraestructura cafetera con secaderos, tanques de fermentación y lavado, y sistemas modulares de tratamiento de aguas mieles; este proyecto tuvo una cobertura de 23 municipios en el Cauca⁶.

A nivel nacional, los recursos manejados por la FNC apoyan cuatro líneas de acción; en primer lugar, garantizar la compra de café y regular el precio para que dentro del mercado no haya compradores con precios bajos (este aspecto es relativo), para lo cual se realiza un pronóstico de cosecha. En segundo lugar, los recursos apoyan la investigación asociada con la producción y manejo agronómico del cultivo a través de CENICAFÉ; en tercer lugar, apoyan el servicio de extensión con asistentes técnicos en todos los departamentos cafeteros de Colombia; los técnicos se agrupan en comités departamentales. El servicio de extensión se brinda finca a finca o de productor a

and microcredits for producers. Additionally, ASORCAFÉ trains farmers every year through technicians that have different policies to those of the FNC, particularly with regard to environmental fertilization, which is cheaper and does not damage the environment. To aid in the development of coffee production, the government of the municipality of Inzá has provided resources for infrastructure and the SENA Colombia (Servicio Nacional de Aprendizaje) contributes by training youngsters, particularly on processing the coffee from berries to beans.

At a regional level in Cauca, a project began operating which belongs to the general system of royalties, which are resources available for social investment from the mining industry (oil and coal), from which resources are drawn for the departments. In Cauca, these resources are allocated for the funding of a project called “Cafecultura: una oportunidad en el pacto social por el Cauca” (Coffee production: an opportunity in the social agreement for Cauca), which was used to help nearly 11 000 families with coffee-producing infrastructure with driers, fermentation and washing tanks, and modular wastewater treatment systems; this project covered 23 municipal areas in Cauca⁶. Nationwide, the resources managed by the FNC support four lines of action. In the first place, to guarantee the purchase of coffee and regulate prices, meaning that nobody in the market can buy coffee at a lower price (this aspect is relative); in order to do that, a harvest forecast is needed. Secondly, the resources support research related to the production and agronomic management of the crop through CENICAFÉ. Finally, they support the training extension service with technical assistants in all the coffee-producing departments in Colombia, technicians form departmental committees. This training extension service is provided to every farm or farmer to train in pest and disease management, harvest, postharvest, crop registration, and there is even a support system to perform family-studies to apply for credits⁷.

Although different institutions seem to subsidize diverse topics related to coffee production, these supports do not have a significant impact on real life conditions. Most of the infrastructure given does not fully operate, and the most important topics farmers

⁶E. Morales, comunicación personal, junio 2018. Informante clave: transformación del grano. ♦ E. Morales, personal communication, June, 2018. Key informer: grain transformation.

productor en capacitar para manejo de plagas y enfermedades, cosecha, poscosecha, comercialización, registro de cultivos; y existe apoyo para realizar estudios para créditos⁷.

Aunque diferentes instituciones parecen subsidiar temas diversos relacionados con el cultivo de café, los apoyos no inciden significativamente en la realidad. Mucha de la infraestructura otorgada no funciona al 100%, los temas más importantes en los que se ha brindado capacitación aún no se implementan de manera estricta en los cafetales. La regulación de los precios es relativa y los ingresos por el café no alcanzan a cubrir los costos de producción; todo lo anterior es evidencia de que se requieren otras medidas para resolver este problema.

Saberes y prácticas agrícolas tradicionales implementadas por el cafeticultor para el control de la roya

En las cuatro zonas de estudio se encontraron condiciones y características homogéneas respecto al cultivo de café, los campesinos productores tienen en promedio 2.2 ha en total, de las cuales destinan 1.6 ha a la producción de café y el resto para la siembra de cultivos como caña panelera, lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y pitahaya, o para el desarrollo de la ganadería. Las plantaciones de café son relativamente nuevas. Los cafetales tienen en promedio cinco años, esto se debe principalmente a la renovación constante con variedades resistentes a la roya, como la variedad Castillo, Colombia, Tabi, F6 o San Bernardo. La edad reducida de los cafetales se debe a que cada cinco años se realiza la práctica de zoca o recepa; lo cual significa remoción y trasplante en el cultivo del cafetal.

En las parcelas, además de las variedades mejoradas, están presentes las variedades Typica, Caturra amarillo y rojo, Bourbon amarillo y rojo, y Catuai. Tanto las variedades mejoradas como las tradicionales, están sembradas a una distancia de 1.3 m entre plantas y de 1.6 m entre hileras, lo que resulta en una densidad de 4800 plantas por hectárea. La densidad alta de la plantación se traduce en una mayor necesidad de aplicación de fertilizantes; cabe indicar que la FNC estableció estas densidades para aumentar la

have been trained on are not yet strictly implemented in the coffee plantations. The regulation of prices is relative, and the coffee revenue does not cover production costs. The aforementioned shows that other measures are required to solve this problem.

Traditional agricultural knowledge and practices implemented by the coffee farmer for the control of rust

In the four study areas, homogenous conditions and characteristics were found, regarding coffee cultivation. Farmers have an average of 2.2 ha apiece, 1.6 of which are dedicated to the production of coffee, and the rest is for crops such as sugarcane, lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) and pitahaya, or for livestock. The coffee plantations are relatively new. The coffee plants have an average age of 5 years, which is mostly due to the constant renovation with rust-resistant varieties, such as the varieties Castillo, Colombia, Tabi, F6 or San Bernardo. The short age of the plants is due to every five years, the plants undergo “zoca” (transplant), which means plantlets removal and replanting of the coffee plants in the plantation.

In the plots, aside improved varieties there are also present the varieties Typica, Caturra (yellow and red), Bourbon (yellow and red) and Catuai. Both, improved and traditional varieties are planted with a distance of 1.3 m between plants and 1.6 m between rows, which results in a density of 4800 plants per hectare. The high plant density causes a greater need for fertilizers. It is worth mentioning that the FNC established these densities to increase production. Ninety percent of all coffee farmers produce their own seedlings to replant and the remaining 10% obtains plantlets from the FNC or other suppliers in the department of Huila.

The recent reconversion of the coffee crop systems in the Tierradentro region helped the shaded surface to become larger than the surface under direct sunlight, due to the beneficial effects of the shade on the crop. Some of these benefits are the incorporation of organic matter, humidity retention, nitrogen fixation, shelter for birds and epiphytic plants that naturally interact in the plantations; in

⁷G. Medina, comunicación personal, junio 2018. Informante clave: desarrollo de innovaciones en la región. ♦ G. Medina, personal communication, June, 2018. Key informer: development of innovations in the region.

producción. El 90% de los cafecultores produce su propia plántula para realizar las resiembras y el otro 10% obtiene las plántulas de la FNC o con otro proveedor en el departamento del Huila.

La reconversión reciente de los sistemas de cultivo en la región Tierradentro permitió que la superficie bajo sombra sea mayor que la superficie a pleno sol; ello obedece a los efectos benéficos que la sombra tiene sobre el cultivo. Tales como incorporación de materia orgánica, retención de humedad, fijación de nitrógeno, refugio para las aves y plantas epífitas que interactúan de forma natural dentro de los cafetales; además, se reduce la incidencia de la roya. Lugo-Morín *et al.* (2018) también describieron este efecto en un estudio realizado en la Sierra Norte de Puebla, México, los productores asociaron el cultivo de café con chalahuite (*Inga vera* Willd) y árboles frutales, y además de representar una inversión menor, mantuvieron la plantación en desarrollo y con mejora en producción. En Colombia, cuando se integra sombra, el estrato arbóreo está compuesto por una gran cantidad de especies (Cuadro 1).

Con las entrevistas y recorridos de campo también se registró la presencia de plantas, árboles o frutales cuyas cosechas se destinan al autoconsumo. Entre las especies más abundantes están plátano, aguacate, guanábana, guayaba, piña, mango, papaya, lima, limón, naranja y mandarina. Además, gracias a la influencia de la ACIT en la región, los espacios libres entre el cafetal se aprovechan para establecer un manejo integrado del cultivo de café intercalado con yuca (*Manihot esculenta*), maíz (*Zea mays*), calabaza (*Cucurbita pepo*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), en la época de zoca (renovación del cafetal).

addition, reducing the incidence of rust. Lugo-Morín *et al.* (2018) also described this effect in a study carried out in the Sierra Norte in Puebla, Mexico, in which farmers associated the plantation of coffee with chalahuite (*Inga vera* Willd) and fruit-bearing trees. Those trees represented a minor investment, but the plantation kept developing and with improvements in production. In Colombia, when shade is incorporated, the arboreal stratum integrates a considerable number of species (Table 1).

With the interviews and the field survey, we found fruit-bearing plants and trees, the harvest of which are destined to the self-supply of the farmers. Some of the most abundant species found were bananas, avocado, soursop (*Annona muricata*), guava, pineapple, mango, papaya, lime, lemon, orange and tangerine. Additionally, due to the influence of the ACIT in the region, the free spaces in the plantation are used to establish an integrated management, alternating with coffee plants, others such as yucca (*Manihot esculenta*), maize (*Zea mays*), pumpkin (*Cucurbita pepo*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), tomato (*Solanum betaceum*) and beans (*Phaseolus vulgaris*), in the “zoca” season (plantation renewal).

Regarding the processing of fruit into coffee beans, the Colombian government through the FNC in a fair trade agreement, gave the farmers the possibility of renewal with the Castillo variety (Rivillas *et al.*, 2011), technical assistance and a pulping machine per farmer. Due to this, 90% of the interviewed farmers claimed to have a pulping machine; also a drier system structure similar to a greenhouse, and a system of tanks to ferment and wash the coffee berries. Other ways in which the government has helped the farmers are with fertilizers, assessment to produce organic fertilizers, technical assistance on adequate

Cuadro 1. Especies de árboles de sombra en los cafetales de Tierradentro, Cauca, Colombia.
Table 1. Species of shade trees in the coffee plantations in Tierradentro, Cauca, Colombia.

Nombre común	Nombre científico	Taxonomía
Cachimbo	<i>Erythrina poeppigiana</i> (Walp.) O.F. Cook	Leguminosa
Guamo cerinde	<i>Inga edulis</i>	Leguminosa
Guamo machete	<i>Inga densiflora</i> Benth	Leguminosa
Chachafruto	<i>Erythrina edulis</i> Triana ex Micheli	Leguminosa
Guadua	<i>Guadua angustifolia</i>	Gramínea
Carbonero	<i>Calliandra pittieri</i> Standl	Leguminosa
Nogal	<i>Juglans regia</i>	Angiospermas

Respecto al beneficio del café, el gobierno colombiano a través de la FNC otorgó a los productores en el marco de un acuerdo de compra venta, la posibilidad de renovación con la variedad Castillo (Rivillas *et al.*, 2011), asistencia técnica y una despulpadora por productor. A partir de ello, el 90% de los entrevistados expresó que tiene despulpadoras; así como un sistema de secado tipo invernadero llamado “parabólico” y un sistema de tanques para la fermentación del café. Otros apoyos a los que los productores han tenido acceso son: fertilizantes, asesoría para la elaboración de abonos orgánicos, asistencia técnica sobre buenas prácticas agrícolas, subsidios en efectivo y sistema de tratamiento de aguas mieles. El equipo y la infraestructura para procesar el café les ha permitido a los productores tener oportunidades de comercialización.

Lo anterior muestra una diferencia importante respecto a las zonas cafetaleras de México. CEDRSSA (2018) informó que los apoyos otorgados por el gobierno mexicano al sector cafetalero se limitan a paquetes tecnológicos que incluyen fertilizantes, semillas o plántulas de café, mochilas aspersoras, incentivos económicos y eventualmente, asistencia técnica. No se orientan a infraestructura ni equipo; los incentivos son bajos al compararlos con el costo de mantenimiento de los cafetales. En México los productores de café, al no contar con la infraestructura para el beneficio húmedo, venden principalmente el café en cereza; por lo tanto, el precio que obtienen por el producto es muy bajo (Figueroa *et al.*, 2015).

El problema de la roya del cafeto ha estado presente en Tierradentro, principalmente en las plantaciones con variedades susceptibles. Además, persiste el problema de la broca del grano que se ha podido reducir con la recolección de los granos que quedan en la planta después de concluir la cosecha. Para el control de la broca en México ha sido efectivo el uso de trampas a base de alcohol metílico y etílico, método que ha incidido en el control de la plaga⁸. Además de la roya y la broca, los cafetales de Tierradentro también presentan otras enfermedades de importancia como: mancha de hierro (*Cercospora*

agricultural practices, cash subsidies and a system to treat wastewaters. The equipment and infrastructure to process coffee has allowed farmers to have better opportunities of marketing their product.

All the aforementioned show an important difference with coffee-producing areas in Mexico. CEDRSSA (2018) informed that the grants provided by the Mexican government to the coffee sector limit their technological support to some fertilizers, coffee seeds or seedlings, fertilizer backpack sprayers, partial wages and eventually, technical assistance. They are not directed on infrastructure or equipment; and those incentives are low when compared to the cost of maintenance of the coffee plantations. Coffee farmers in Mexico have no infrastructure for the wet coffee-processing method, so they mainly sell coffee berries, and therefore the price at which they sell their product is extremely low (Figueroa *et al.*, 2015).

The problem of coffee rust is present in Tierradentro, mainly in plantations with susceptible varieties. In addition, the problem of coffee-berry borer persists, although it is reduced with the collection of those discarded berries remaining in the plant after the harvest is complete. To control the coffee-berry borers in Mexico, methyl and ethyl alcohol-based traps have been effective, which has had a positive impact on the control of this pest⁸. Along with rust and borers, Tierradentro coffee plantations also present other important diseases such as leaf spot (*Cercospora coffeicola*), dieback (*Phoma spp*) and *llaga macana* gall-disease (*Cerarostomella fimbriata*), as well as common root-leaf borers such as *gallina ciega* (*Phyllophaga ravidia*) and *hormiga roja* (*Pogonomyrmex barbatus*), as it was indicated by the interviewees and verified in field transects.

In order to manage coffee plantations to maintain their production rates and resist diseases, commercial agrochemicals are generally applied. The fertilizers mostly used consist of the formulas 25-04-24, 17-06-18-02, 25-04-25, triple 15, urea, diammonium phosphate and other concentrated formulas with micronutrients, nitrogen and phosphorous. In Mexico and Colombia, farmers are convinced that

⁸Barrera, J. F., J. Herrera, A. Villacorta, H. García, y L. Cruz. 2007. Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. La broca del café en América tropical: hallazgos y enfoques. Simposio Soc. Mex. Entomol y Colegio de la Frontera Sur. México. pp: 71-83. v Barrera, J. F., J. Herrera, A. Villacorta, H. García, and L. Cruz. 2007. Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. La broca del café en América tropical: hallazgos y enfoques (Workshop) Soc. Mex. Entomol y Colegio de la Frontera Sur. México. pp: 71-83.

coffecicola), muerte descendente (*Phoma spp*) y llaga macana (*Cerarostomella fimbriata*); además de otros agentes como gallina ciega (*Phyllophaga ravidia*) y hormiga roja (*Pogonomyrmex barbatus*), según indicaron los informantes en las entrevistas y se verificó en los recorridos de campo.

Con el fin de que las plantaciones de café mantengan su producción y resistan a las enfermedades, por lo general, se realizan aplicaciones de agroquímicos. Los fertilizantes aplicados consisten en las fórmulas: 25-04-24, 17-06-18-02, 25-04-25, triple 15, urea, fosfato diamónico y fórmulas concentradas con micronutrientes, nitrógeno y fósforo. En México y en Colombia los productores tienen la convicción de que la fertilización es necesaria para mantener sanos y productivos los cafetales, así como para reducir la incidencia de enfermedades (Martínez-López *et al.*, 2019). Avelino *et al.* (2006) encontraron el mismo resultado en Honduras, en las parcelas de café fertilizadas, los productores han obtenido menos incidencia de roya, en comparación con las no fertilizadas, lo anterior se relaciona con que el crecimiento mayor de la planta resta fuerza a la enfermedad (Ferrandino, 2008).

Aunque existen diferentes tipos de control: genético, cultural o químico, el éxito de cualquiera de ellos para el control de la roya está muy ligado con el manejo agronómico del cultivo, poda, manejo de sombra, distancia de siembra adecuada, dosis apropiadas de fungicidas, pero en especial con una fertilización adecuada (Piñeiro *et al.*, 2015). Sin embargo, el límite es el precio alto de los insumos, por eso en México los pequeños productores realizan dos aplicaciones de fertilizante al año, y en muchos casos, sólo una vez por año (Buriticá, 2010; Cardeña *et al.*, 2019).

De acuerdo con la opinión de los productores en Colombia, el 97% realiza prácticas para evitar la incidencia de enfermedades y mantener el cafetal sano; las primordiales son desinfección del germinador, fertilización, encalado, eliminación de arvenses no deseadas, recolección de frutos secos en el suelo y maduros en la planta, podas, control de ingreso del personal, eliminación de plantas viejas y aplicación de productos no tóxicos. Otras prácticas realizadas por los cafetaleros de Colombia son la aplicación de compostas elaboradas con pulpa de café, aplicación de cal viva, incorporación de hojas de plátano, establecimiento de barreras vivas, establecimiento de

fertilización es necesaria to keep their plantations healthy and productive, as well as to reduce disease rates (Martínez-López *et al.*, 2019). Avelino *et al.* (2006) found the same result in Honduras. In fertilized coffee plantations, farmers have experienced a lower incidence of rust than in non-fertilized ones. This is attributed to a greater growth of the plant which reduces the strength of the disease (Ferrandino, 2008).

Despite the fact that different types of genetic, cultural or chemical control do exist, the success of either one for the control of rust is linked to the agronomic management of the crop, pruning, shade management, correct planting distance, adequate fungicide doses, but particularly with an adequate fertilization (Piñeiro *et al.*, 2015). However, the limit is the high price of fertilizers. This is the reason why, in México, small-scale producers can afford fertilizing two times per year and in many cases, only once a year (Buriticá, 2010; Cardeña *et al.*, 2019).

According to the opinions of Colombian farmers, 97% of them perform practices to avoid the incidence of diseases and keep their plantations healthy. The essential practices are disinfecting the seedbeds, fertilization, liming, weeds removal, collecting dried fruits from the ground and mature fruits from the plants, pruning, control the access of laborers, elimination of old plants and the application of non-toxic products. Other common practices among Colombian coffee farmers are the production of compost fertilizers produced with coffee pulp waste, applying calcium oxide (quicklime), incorporation of banana leaves, planting live barriers, soil analyses and general maintenance of the coffee plantations to avoid the accumulation of inorganic garbage.

From their point of view in the productive chain, main problems perceived by Colombian farmers were: in the first place, the reduced number of coffee buyers (46.9%), low bean prices (37.5%), coffee rust and coffee-berry borer (15.6%). The monopoly of the FNC is also an important problem. Because the farmers have been able to mitigate the incidence of rust in their coffee plantations through agronomic management, it has ceased to be a priority in the list (Figure 5).

Therefore, farmer demands are now aimed at obtaining government subsidies, as well as other regulatory measures from Colombian State such as the stability of coffee prices, a reduction in costs of

cercos vivos, análisis de suelo y el mantenimiento general de los cafetales para evitar la acumulación de basura inorgánica.

Entre los problemas principales que los campesinos colombianos visualizaron desde su eslabón en la cadena productiva, estuvo en primer lugar el número reducido de compradores de café (46.9%), los precios bajos del grano (37.5%), la roya y la broca del café (15.6%). El monopolio de la Federación también representa un problema importante. Debido a que los productores han podido mitigar la incidencia de roya en los cafetales a través del manejo agronómico, ésta dejó de ser prioridad en la lista (Figura 5).

Por lo que ahora, las demandas de los campesinos se dirigen a la obtención de subsidios por parte del Estado; y otras medidas regulatorias como, la estabilización del precio del café, la reducción de los precios del fertilizante, la reestructuración de las políticas para el sector agropecuario y la obtención de infraestructura para la transformación del café y de otros productos con valor comercial derivados de la misma parcela para la agregación de valor. Además de la siembra de la variedad Caturra, los productores están convencidos de que con un buen manejo es posible mantener las plantaciones con incidencia baja de roya.

Los problemas y necesidades de apoyo en Colombia son similares a los observados en México (Cardeña *et al.*, 2019) y podrían solucionarse a través de la acción conjunta de instituciones académicas y organizaciones campesinas. Desde las instituciones de apoyo al sector cafetalero es necesario respaldar la aspiración de los productores por conservar las variedades tradicionales como Caturra, Bourbon y Typica,

fertilizers, the restoration of policies for the farming sector, and the obtention of infrastructure for the processing of coffee and other commercially valuable products from the same fields for added value. In addition to planting the Caturra variety, farmers are convinced that an adequate management will help keep rust incidences low in plantations.

The problems and needs for support in Colombia are similar to those found in Mexico (Cardeña *et al.*, 2019) and would be solved with the joint action of academic institutions and farmer organizations. Institutions that support the coffee sector need to back the aspirations of farmers to preserve the traditional varieties such as Caturra, Bourbon and Typica, in Mexico and Colombia, because these get a higher cost per cup in the market, due to the high quality perceived by the consumer (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018). Their management should be complemented with adequate fertilization programs, and with strictly scheduled practices, as well as actions towards a better integration of the value chain with the production of speciality coffees.

Coffee is a short-day plant and its flowering responds to light intensity. It has a critical photoperiod of 13.5 h of astronomical sunlight. Within the latitudinal interval of the coffee-producing area in Colombia this factor is not limiting, since days with photoperiods of less than 13 h are found all year (Ramírez *et al.*, 2014). In the area of Cauca there are only two seasons every year: a short summer and a prolonged winter. This aspect decisively influences flowering and therefore, coffee production. In the region, coffee production increases when summers are intensely sunny.

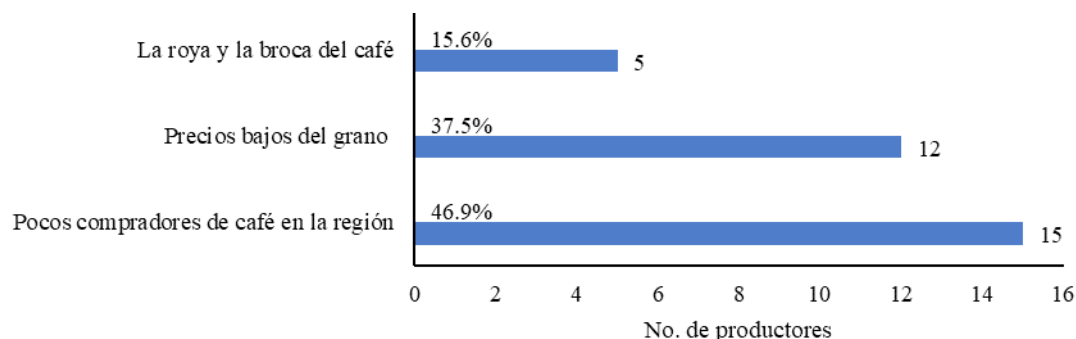


Figura 5. Principales problemas de los productores de café en Tierradentro, Cauca, Colombia.

Figure 5. Main problems faced by coffee farmers in Tierradentro, Cauca, Colombia.

en México y en Colombia, porque éstas tienen precio mayor por taza en el mercado, debido a la calidad alta que percibe el consumidor (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018). Su manejo debería complementarse con planes y programas de fertilización adecuada y con un programa estricto de prácticas. Además de acciones hacia una mejor integración de la cadena de valor por medio de la producción de cafés de especialidad.

El café es una planta de día corto y su floración responde a la intensidad lumínica; tiene un fotoperiodo crítico de 13.5 h de brillo solar astronómico. Dentro del intervalo latitudinal de la zona cafetera de Colombia este factor no es limitante, pues se registran durante todo el año días con un fotoperiodo menor de 13 h de duración (Ramírez *et al.*, 2014). En la zona del Cauca sólo se diferencian dos estaciones en el año, un verano corto y un invierno prolongado; este aspecto influye determinantemente en la floración y, por lo tanto, en la producción de café. En la región se ha observado que cuando existe un verano intenso, la producción aumenta.

Respecto a las condiciones de sombra, un debate existe en los últimos años acerca del establecimiento de árboles en los cafetales. Algunos autores mencionan que favorece la enfermedad (Staver *et al.*, 2001), mientras que otros indican que la reduce (Soto-Pinto *et al.*, 2002) o que el tipo de sombra influye en una incidencia mayor o menor (Salgado *et al.*, 2007). No obstante, la sombra regula variaciones extremas de los factores climáticos, disminuye la temperatura, evita el rocío, amortigua la lluvia, y regula las escorrentías, intercepta la velocidad del viento, mejora la calidad del café, reduce el crecimiento de arvenses y el uso de fertilizantes (López-Bravo *et al.*, 2012). En Tierradentro, los productores consideran conveniente tener un cafetal con sombra, pues ayuda a regular la incidencia de roya. En campo se pudo observar que efectivamente en las plantaciones bajo sombra las hojas de los cafetos presentaron menos síntomas de roya, en comparación con los que estaban a plena exposición solar.

Avelino y Rivas (2014) y Virginio y Astorga (2015) explicaron el fenómeno de la siguiente manera: la liberación de las uredosporas solamente es posible en presencia de agua libre durante todo el proceso hasta la penetración de las hifas; ésta puede lograrse a través de las salpicaduras provocadas por la lluvia. Después, el hongo de la roya del café penetra por los estomas del envés de la hoja; la apertura

Regarding shade conditions, there has been a debate in recent years on the establishment of trees in coffee plantations. Some authors mention that it favors the incidence of diseases (Staver *et al.*, 2001), whereas others state that shading reduces disease (Soto-Pinto *et al.*, 2002). Others propose that the type of shade has an influence on whether the incidence is higher or lower (Salgado *et al.*, 2007). Regardless, shade regulates extreme variations of weather factors, reduces temperatures, prevents the formation of dew, reduces the impact of rainfalls, regulates runoff, intercepts wind speeds, reduces the growth of weeds and the use of fertilizers (López-Bravo *et al.*, 2012). In Tierradentro, producers consider as convenient to have a plantation with shade, since it helps to regulate the incidence of rust. In a field survey it was observed that in plantations under the shade, the leaves of coffee plants displayed less symptoms of rust than those under direct sunlight.

Avelino and Rivas (2014) and Virginio and Astorga (2015) explained it as follows: the release of uredospores is only possible in the presence of free water during the entire process until hyphae penetrate, which occurs following the heavy splashes caused by the rain. The coffee rust fungus also enters through the stomata of the bottom side of the leaves. The stomatal openings increase with the intensity of light, therefore, under shady conditions stomata are less open, preventing the fungus from entering the leaf (Barquero, 2013). On the other hand, once the fungus has penetrated the leaf, its reproduction is inhibited when water availability is reduced, since this affects the growth of the germinative tubes produced by the spores (Avelino and Rivas, 2014).

Finally, the limitation of credit services is a prevalent problem and an obstacle for the actual profit of the farmers, and therefore, for the reinvestment in coffee plantations at small-scale production units in Colombia. The condition of establishing rust tolerant varieties reduces the adoption of traditional varieties and affects the quality of the coffee. In addition, it promotes a higher plant density in plantations and the removal of shade, which decisively affects the flora and fauna that naturally interacts in the coffee plantations. This is a call and a proposal for the Colombian government to develop intervention programs that give farmers easier access to credits without the condition of producing under direct sunlight. As it would help to improve their incomes

estomática aumenta con la intensidad lumínica; por ello en condiciones de sombra la apertura de los estomas se reduce y esto impide la penetración del hongo (Barquero, 2013). Por otro lado, cuando el hongo ha logrado penetrar, su reproducción se inhibe cuando se reduce la disponibilidad de agua en la hoja, ya que afecta el crecimiento de los tubos germinativos de las esporas (Avelino y Rivas, 2014).

Por último, la limitación de los servicios crediticios es un problema preponderante que representa un obstáculo para la capitalización de los productores y por lo tanto para la reinversión en las unidades de producción cafetaleras de Colombia. La condición del establecimiento de variedades tolerantes a la roya para otorgar los créditos disminuye la adopción de variedades tradicionales y afecta la calidad del café. Además, se promueve una densidad mayor en las plantaciones y la eliminación de sombra, lo cual afecta de modo determinante la flora y fauna que interactúa en los cafetales. La propuesta dirigida al gobierno colombiano es un llamado a desarrollar programas de intervención que faciliten a los productores el acceso a los créditos sin el condicionamiento de producir a sol. Ello permitiría capitalizarles sin comprometer el equilibrio ecológico que logra permanecer en los sistemas de producción diversificada bajo sombra.

CONCLUSIONES

El examen detallado *in situ* del conjunto de prácticas agrícolas implementadas por los productores para combatir la roya del café mostró que la priorización de sus problemas cambió. La comercialización del grano es ahora el problema mayor para los productores, seguido de los precios bajos y por último la roya. Los productores han sabido utilizar su conocimiento y prácticas tradicionales para mitigar los efectos de la roya y mantener sus plantaciones en producción.

Con la fertilización, incorporación de sombra, desinfección de los germinadores y el conocimiento acumulado, los productores lograron reducir significativamente el efecto negativo de la roya sobre la producción de las unidades cafetaleras. La germinación de plántulas propias asegura sanidad antes de establecerlas en campo, la fertilización asegura el crecimiento y se ha comprobado el efecto benéfico de la sombra en la producción, a través de la reducción en la incidencia del patógeno causante de la roya anaranjada.

without jeopardizing the environmental balance that remains under diversified production shade-cultivation systems.

CONCLUSIONS

On the detailed *in situ* examination of the agricultural practices implemented by farmers to fight coffee rust, it was observed that the prioritization of their problems changed. Marketing of coffee beans was perceived as the greatest problem for farmers, followed by low prices and rust infection at the end. Farmers manage to use their traditional knowledge and practices to mitigate the effects of rust and keep their plantations producing.

With fertilization, incorporation of shade, disinfection of seedbeds and their acquired knowledge, farmers significantly reduced the negative effect of rust on the production of their coffee units. The germination of their own seedlings ensures they are healthy before planting them in the field. Fertilization ensures growth and the benefits of shade in the production process has been proven by the reduction in the incidence of the pathogen that causes orange rust.

The lines of action identified include the promotion of educational and business abilities in farmers so they can accept new production methods and search for other resources still absent in this coffee-producing area of Colombia. Farming schools can help disseminate information on proper agricultural practices in coffee plantations and provide certification processes for greater access to better coffee-bean prices in the market. The Colombian coffee sector aim to redirect the Colombian government plans for development towards changes to improve plantations and increase production efficiency. In this process, increasing the flexibility in the access to credits is crucial to solve the problem of low profitability caused by the high costs of inputs in the coffee production chain.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the technical support team of the Inzá Tierradentro Farmers Association for the presence and shared knowledge that enriched this study; in particular to Ciro Marino, Eliecer Morales, Gersain Medina, Amilcar Arias, Karol Sánchez, Janer Sancho and Reinaldo Peña. To Dr. Gustavo Adolfo Alegría

Las líneas de acción identificadas incluyen, alentar en los cafeticultores la capacidad educativa y empresarial para aceptar nuevas formas de producción y gestión de los recursos no presentes aún en esta zona cafetalera de Colombia. Las escuelas campesinas pueden difundir las buenas prácticas agrícolas en cafetales y los procesos de certificación para acceder a precios mejores del grano en el mercado. En la situación actual del sector cafetalero colombiano se propone orientar los planes de desarrollo del gobierno de Colombia hacia cambios con el fin de mejorar las plantaciones y aumentar la eficiencia productiva. En este proceso, incrementar la flexibilidad en el acceso a créditos es fundamental para resarcir la rentabilidad baja ocasionada por los costos altos de los insumos en la cadena productiva del café.

AGRADECIMIENTOS

Al equipo técnico de la Asociación Campesina de Inzá Tierradentro por el acompañamiento y por el conocimiento compartido que enriqueció el estudio; en especial a los señores Ciro Marino, Eliecer Morales, Gersain Medina, Amilcar Arias, Karol Sánchez, Janer Sancho y Reinaldo Peña.

Al Dr. Gustavo Adolfo Alegría Fernández, docente de la Universidad del Cauca, por su asesoramiento y apoyo para realizar la estancia de investigación en el Cauca, Colombia.

LITERATURA CITADA

- ACIT (Asociación Campesina de Inzá Tierradentro). 2004. Diagnóstico Rural Campesino Participativo. Programa Tierradentro. Cauca, Colombia. 70 p.
- Alviar L., C. F., y F. García G. 2020. Factores que originan la escasez de mano de obra para la recolección de café en el municipio de Belén de Umbría. Universidad Católica de Pereira. Pereira, Colombia. 68 p.
- Avelino, J., H. Zelaya, A. Merlo, A. Pineda, M. Ordoñez, y S. Savary. 2006. The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecol. Mode.* 197: 431–447.
- Avelino, J., y G. Rivas. 2014. La roya anaranjada del café. In: Bertrand, B., y B. Rapidel. (eds.) *Desafíos de la Caficultura en Centroamérica*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. IICA San José, Costa Rica. pp. 194–241.
- Avelino, J., M. Cristancho, S. Georgiou, P. Imbach, L. Aguilar, G. Bornemann, P. Läderach, F. Anzueto, J. Hruska, y C. Morales. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Sec.* 7:303–321. DOI 10.1007/s12571-015-0446-9.
- Barquero M., M. 2013. Recomendaciones Para el Combate de la Roya del Café. 3a ed. ICAFE. San José, Costa Rica. 63 p.
- Fernández, Professor under the Universidad del Cauca for his assessment and support for the research stay in Cauca, Colombia.
- End of the English version—
- *—
- Buritica C., P. 2010. La roya del café en Colombia: realizaciones de impacto nacional e internacional en el siglo XX. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 63:5285–5292.
- Cardena B., I., B. Ramirez V., J. P. Juarez S., A. Huerta De la P., A. Cruz L. 2019. Campesinos y sistema de producción de café ante el problema de la roya en el municipio de Hueytamalco, Puebla, México. *Esp. Ab. Cuad. Vene. de Soc.* 28:59–78.
- Castillo-Ponce, G. 2013. La Roya Anaranjada del Café (*Hemileia vastatrix* Berk. y Br.) su Comportamiento en México: Propuestas para Enfrentar un Nuevo Brote Epidemiológico. Asociación Mexicana de la Cadena Productiva del Café (AMECAFE). México. 24 p.
- CEDRSSA (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria). 2018. El café en México, Diagnóstico y Perspectiva. Cámara de Diputados. Palacio Legislativo de San Lázaro. 33 p.
- Ferrandino, F. J. 2008. Effect of crop growth and canopy filtration on the dynamics of plant disease epidemics spread by aerially dispersed spores. *Phytopathology.* 98: 492–503. DOI:10.1094/PHYTO-98-5-0492.
- Figueroa H., E., F. Pérez S., y L. Godínez M. 2015. Importancia de la comercialización del café en México. In: Figueroa H., E., F. Pérez S., y L. Godínez M. (eds.) *Ciencias Sociales: Economía y Humanidades. Handbook T-I.* - ©ECORFAN. Texcoco de Mora, estado de México, México. pp: 64–82.
- Hernández S., R., C. Fernández C., y M. de P. Baptista L. 2010. Metodología de la investigación. 5ª. Ed. McGraw-Hill. México, D.F. pp: 7–16.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2018. Sistema de Información para apoyar el fortalecimiento de la caficultura en México. CentroGeo. https://idegeo.centrogeo.org.mx/ms/iniciativa_IICA/narrative/348 (Consultado: junio 2020).
- López-Bravo, D. F., E. de M. Virginio-Filho, y J. Avelino. 2012. Shade is conducive to coffee rust as compared to full sun exposure under standardized fruit load conditions. *Crop Prot.* 38:21–29. DOI: [org/10.1016/j.cropro.2012.03.011](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.03.011).
- Lugo-Morín, D. R., E. de J. Desiderio, y M. L. Fajardo F. 2018. Prácticas y saberes comunitarios en la Sierra Norte de Puebla: el caso del café, sus plagas y enfermedades. *Rev. Inv. Agr. y Amb.* 9:78–87. DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.2135>.
- Márquez-Díaz, C. 2009. Estrategia política para la apropiación del patrimonio cultural: Caso Tierradentro. Universidad del Rosario. Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación. <http://repositorio.urosario.edu.co/handle/10336/1114> (Consultado: junio 2020).

- Martínez-López, A., A. Cruz-León, D. M. Sangerman-Jarquín, S. Díaz-Cárdenas, J. Cervantes-Herrera, y B. Ramírez-Valverde. 2019. El estudio de los saberes agrícolas como alternativa para el desarrollo de las comunidades cafetaleras. *Rev. Mex. de Cienc. Agr.* 10:1615–1626. DOI: [org/10.29312/remexca.v10i7.2113](https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.2113).
- Ortega H., A., y B. Ramírez V. 2013. Crisis de la cafeticultura y migración en el contexto de pobreza y marginación. El caso de los productores indígenas de Huehuetla, Puebla. *Ra Ximhai*. 9:173-186.
- Piñeiro, V., S. Morley, y P. Elverdin. 2015. Los efectos de la roya en las economías centroamericanas. International Food Policy Research Institute (IFPRI). Washington DC. <http://www.ifpri.org/publication/los-efectosde-la-roya-en-las-econom%C3%ADas-centroamericanas> (Consultado: junio 2020).
- Puerta R., M. 1987. Valores Culturales de Tierradentro. Instituto Colombiano de Antropología. Universidad de Texas. USA. 62 p.
- Ramírez B., V.H., J. Arcila P., A. Jaramillo R., J.R. Rendón S., G. Cuesta G., H.D. Menza F., C.G. Mejía M., D. F. Montoya, J.W. Mejía M., J.C. Torres N., P.M. Sánchez A., J. E. Baute B., y A. J. Peña Q. 2014. Floración del café en Colombia y su relación con la disponibilidad hídrica, térmica y de brillo solar. *Cenicafé* 61:132-158.
- Renard H., M. C., y Larroa T., R. M. 2017. Política pública y sustentabilidad de los territorios cafetaleros en tiempos de roya: Chiapas y Veracruz. *Est. Lat.* 40:95–113. DOI: <http://dx.doi.org/10.22201/cela.24484946e.2017.40.61593>.
- Rivillas O., C. A., C. A. Serna G., y A. L. Gaitán B. 2011. La Roya del Cafeto en Colombia: Impacto Manejo y Costos del Control. CENICAFÉ. Chinchiná, Caldas, Colombia. 51 p.
- Salgado, B. G., R. L. G. Macedo, V. L. Carvalho, M. Salgado, N. Venturin. 2007. Progress of rust and coffee plant cercosporiose mixed with grevillea, with ingazeiro and in the full sunshine in Lavras-MG. *Ciência e Agrotecnologia*. 31:1067–1074.
- Sánchez-Hernández, S., E. Escamilla-Prado, M. A. Mendoza-Briseño, y N. Nazario-Lezama. 2018. Calidad del café (*Coffea arabica* L.) en dos sistemas agroforestales en el centro de Veracruz, México. *Agroproductividad*. 11:80-86.
- Santoyo-Cortés, V. H., P.P. Ramírez-Moreno, y M. Suvedi. 2002. Manual para la Evaluación de Programas de Desarrollo Rural. 2a ed. CIESTAAM-Universidad Autónoma Chapingo. México. 149 p.
- Soto-Pinto, L., I. Perfecto, y J. Caballero-Nieto. 2002. Shade over coffee: its effects on berry borer, leaf rust and spontaneous herbs in Chiapas, Mexico. *Agro. Syst.* 55:37–45. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020266709570>.
- Staver, C., F. Guharay, D. Monterroso, y R. G. Muschler. 2001. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. *Agro. Syst.* 53:151–170. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1013372403359>.
- Virginio F., E. y C. Astorga. 2015. Prevención y Control de la Roya del Café Manual de Buenas Prácticas para Técnicos y Facilitadores. CATIE. Costa Rica. <http://hdl.handle.net/11554/8186> (Consultado: mayo 2020).
- Virginio F., E. y C. Astorga. 2015. Prevención y Control de la Roya del Café Manual de Buenas Prácticas para Técnicos y Facilitadores. CATIE. Costa Rica. <http://hdl.handle.net/11554/8186> (consultado: mayo 2020).