



INSTITUTO DE INNOVACIÓN  
AGROPECUARIA DE PANAMÁ

ISSN L 2414-3278

# Ciencia Agropecuaria

REVISTA CIENTÍFICA N° 33



**PANAMÁ-2021**  
julio - diciembre

Ciencia Agropecuaria: revista científica/  
Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá.  
no. 33 (julio - diciembre, 2021). Panamá, PA. Semestral  
84 p.  
ISSN L 2414-3278  
1. Investigaciones Agrícolas  
2. Investigaciones Pecuarias



INSTITUTO DE INNOVACIÓN  
AGROPECUARIA DE PANAMÁ

ISSN L 2414-3278

# Ciencia Agropecuaria

---

REVISTA CIENTÍFICA N° 33

**PANAMÁ-2021**  
julio - diciembre

Publicación semestral del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP)  
La versión electrónica de la revista Ciencia Agropecuaria, se puede consultar en:  
<http://www.idiap.gob.pa/index.php/revista>

---

**Editor Principal**

Ismael Camargo Buitrago, Dr. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP)

**Editora Asociada**

Neysa Garrido Calderón, M.Sc. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) – Panamá

**Consejo Editorial**

Román Gordón Mendoza, Dr. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) – Panamá

José A. Yau, Dr. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Sistema Nacional de Investigación (SNI) – Panamá

Hilda Lezcano, Dra. Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) – Universidad de Panamá

Axel Villalobos Córtes, Dr. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Sistema Nacional de Investigación (SNI) – Panamá

Juan C. Martínez González, Dr. Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT) – México.

Pedro Guerra Martínez, M.Sc. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) – Panamá

Bruno Zachrisson, Dr. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Sistema Nacional de Investigación (SNI) – Panamá

**Diseño y Diagramación**

Gregoria del C. Hurtado Chacón Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) – Panamá

Melkissedeth Gómez Delgado Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) – Panamá

**Revisión y Traducción de resúmenes**

Audino Melgar, Ph.D. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) – Panamá

---

## CONTENIDO

---

### ARTÍCULOS

---

- |       |  |
|-------|--|
| 1-14  | <b>CAPACIDAD FITOPATOLÓGICA DE <i>Burkholderia glumae</i> EN SIETE VARIEDADES DE ARROZ COMERCIALES DE PANAMÁ</b><br><i>Rito Herrera; Martha de Von Chong; Felipe González; Víctor Camargo; José Yau; Alexis Artola</i> |
| 15-31 | <b>NIDOS DE TERMITAS ARBÓREAS ASOCIADAS AL MARAÑÓN (<i>Anacardium occidentale</i>) EN RÍO HATO, COCLÉ, PANAMÁ</b><br><i>Randy Atencio; Melvin Jaén; Vidal Aguilera</i>   |
| 32-43 | <b>POLIMORFISMOS DE MARCADORES ASOCIADOS A LA CALIDAD DE LECHE EN POBLACIONES CRIOLLAS Y TRANSFRONTERIZAS</b><br><i>Axel Villalobos-Cortés; Hilda Casillo; Manuel Murillo; Rita González-Herrera</i>                   |
| 44-63 | <b>MODELOS MIXTOS PARA ANALIZAR EXPERIMENTOS AGROPECUARIOS DE TRES FACTORES CON UN PROGRAMA ESTADÍSTICO</b><br><i>Pedro Guerra-Martínez</i>  |
-

---

**NOTA TÉCNICA**

---

64-75

**EFFECTO DEL MÉTODO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA  
BOVINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y TASA DE  
FERTILIZACIÓN *in vitro***

*Raúl H. De León-García; Roderick A. González M.;  
Pedro Guerra M.; Kristel Flores*

---

76-84

**NORMAS PARA AUTORES**

---

## CAPACIDAD FITOPATOLÓGICA DE *Burkholderia glumae* EN SIETE VARIEDADES DE ARROZ COMERCIALES DE PANAMÁ<sup>1</sup>

**Rito Herrera<sup>2</sup>; Martha de Von Chong<sup>3</sup>; Felipe González<sup>4</sup>;**

**Víctor Camargo<sup>5</sup>; José Yau<sup>6</sup>; Alexis Artola<sup>7</sup>**

### RESUMEN

*Burkholderia glumae* es el agente causal del añublo bacterial de la panícula del arroz, enfermedad que ocasiona considerables pérdidas en la producción de los cultivos en Panamá y en muchos países de América Latina. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en Panamá en los años 2002 y 2005. Debido a que el arroz es uno de los cultivos más importantes en Panamá, está claro que una distribución amplia del añublo bacterial de la panícula se convertiría en una gran desventaja para la agroeconomía del país. Las consecuencias directas a nivel agronómico serían pérdidas en el rendimiento y estabilidad de la producción, ya que este patógeno tiene el potencial de reducirla hasta en un 75%, en regiones severamente afectadas, provoca disminución del peso del grano, esterilidad de las flores e inhibición de la germinación de la semilla. El objetivo de este trabajo fue cuantificar la resistencia a la infección por *B. glumae* de siete variedades distintas de arroz comerciales cultivadas en Panamá. Se evaluaron las variedades frente a seis concentraciones de cultivo fresco bacteriano, incubadas a tres temperaturas diferentes (25 °C, 30 °C y 34 °C). Se observaron diferencias significativas entre temperatura y nivel de infección predominantes por variedad de arroz, sin embargo, el análisis reveló que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de inóculo bacteriano y los niveles de infección de las distintas variedades de arroz estudiadas. Se observó que a 25 °C todas las variedades de arroz presentaron un menor grado de susceptibilidad con respecto a las variedades incubadas a 30 °C y 34 °C. De igual forma, la variedad más susceptible a la infección por *B. glumae* fue la GAB-11 y las menos susceptibles fueron la I-145-05, I-54-05 y la I-FL-106-11 a 30 °C y 34 °C.

**Palabras clave:** Añublo bacterial, temperatura, dilución, inóculo bacterial, semilla.

<sup>1</sup> Recepción: 30 de septiembre de 2020. Aceptación: 24 de abril de 2021. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).

<sup>2</sup> IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria en Recursos Genéticos. Ph.D. Microbiología. e-mail: [rhv76@yahoo.es](mailto:rhv76@yahoo.es)

<sup>3</sup> Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Coclé. M.Sc. Fitopatología.

<sup>4</sup> IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria Oriental. M.Sc. Fitopatología.

<sup>5</sup> IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria en Recursos Genéticos. Ing. Agr.

<sup>6</sup> IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria en Recursos Genéticos. Ph.D. Agricultura Protegida.

<sup>7</sup> Universidad Especializada de las Américas. M.Sc. Microbiología Aplicada.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## PHYTOPATHOLOGICAL CAPACITY OF *Burkholderia glumae* IN SEVEN COMMERCIAL RICE VARIETIES FROM PANAMA

### ABSTRACT

*Burkholderia glumae* is the causal agent of bacterial blight of the rice panicle, a disease that causes considerable losses in crop production in Panama and in many Latin American countries. This disease was first described in Panama in 2002 and 2005. Because rice is one of the most important crops in Panama, it is clear that a wide distribution of the bacterial blight of the panicle would become a great disadvantage for the agricultural economy of the country. The direct consequences at the agronomic level would be losses in yield and production stability, due to this pathogen has the potential to reduce it up to 75%, in severely affected regions, causes decrease in grain weight, flowers sterility and inhibition of seed germination. The objective of this work was to quantify the resistance to infection by *B. glumae* of seven different varieties of commercial rice grown in Panama. Varieties were evaluated against 6 concentrations of fresh bacterial culture, incubated at three different temperatures (25 °C, 30 °C and 34 °C). Significant differences were observed between temperature and predominant level of infection by variety of rice, nevertheless the analysis revealed that there were no significant differences between the concentrations of bacterial inoculum and the levels of infection of the different studied rice varieties. It was observed that at 25 °C all varieties of rice showed a lower degree of susceptibility with respect to the varieties incubated at 30 °C and 34 °C. Similarly, the most susceptible variety to infection by *B. glumae* was GAB-11 and the least susceptible were I-145-05, I-54-05 and I-FL-106-11 at 30 °C and 34 °C.

**Key words:** Bacterial blight, temperature, dilution, bacterial inoculum, seed.

### INTRODUCCIÓN

El arroz es un cereal de gran importancia en Asia, Latinoamérica y África. Ocupa el segundo lugar después del maíz en producción a nivel mundial y se estima que siga creciendo en los años siguientes debido a que se ha expandido en 1,8% por año, arriba del rango de crecimiento poblacional. Sin embargo, este incremento puede verse reducido en un futuro por enfermedades que se han venido desarrollando en los últimos años como añublo bacterial de la panícula causado por *Burkholderia glumae*. Esta fitopatología fue reportada en Panamá en 2002 (Calpe, 2002).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

El género *Burkholderia* fue establecido en 1992 (Yabuuchi et al., 1992) y está conformado por especies previamente incluidas en el género *Pseudomonas*. Para el año 2009 habían sido reportadas 59 especies las cuales se caracterizan por ser bacterias Gram-negativas, pertenecientes al phylum  $\beta$ -Proteobacteria, tener forma de bacilo, un metabolismo oxidativo y ser móviles (Coenye, 2009). A nivel agronómico son importantes las especies *B. cepacia* asociada a cebolla, *B. andropogonis* que infecta entre otros el sorgo y el maíz, *B. caryophylli* que se encuentra en clavel y *B. gladioli* que se encuentra asociado a gladiola y arroz, causando pudrición suave y necrosis severa en tejidos (Viallard et al., 1998).

*Burkholderia glumae* (Urakami et al., 1994) se asocia al suelo, a la rizósfera y a la superficie de diversas plantas donde se considera epífita, sin provocar daño al hospedero, pero constituyendo un importante reservorio que puede dar origen a patologías bajo ciertas condiciones en numerosos cultivos (Compant et al., 2008).

La pudrición bacteriana de la panícula ha sido atribuida a diferentes factores abióticos incluyendo altas temperaturas, estrés hídrico y fitotoxicidad cerca de la zona radicular. La temperatura óptima para el crecimiento de *Burkholderia glumae* está en un rango de 30° a 35° C y un punto de muerte térmica de 70° C (Kurita y Tabei, 1964). El patógeno se transmite por la semilla, flores, hojas y residuos de cosecha. Puede vivir en las raíces del arroz sin mostrar síntomas y durante el hinchamiento de la panícula crece en los tallos y hojas. El período crítico de la infección es durante la emergencia de la panícula y la floración. Se multiplica rápido en las panículas e infecta las espiguillas una vez que estas emergen. El daño lo causa el taponamiento de los haces vasculares de la planta causado por la producción de la toxoflavina, una toxina que es sintetizada por la bacteria a temperaturas de 30° a 37° C (Degrassi et al., 2008). La toxoflavina actúa como un transportador de electrones entre NADH y el oxígeno sin la intermediación de los citocromos, generando peróxido de hidrógeno (Latusan y Berends, 1961). Este último es altamente tóxico para diversos tipos de células, provocando daño tisular y un efecto antimicrobiano. Este mecanismo de acción explica la ausencia de toxicidad de la toxoflavina bajo condiciones anaeróbicas (Suzuki et al., 2004).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

La producción de la toxina depende de la temperatura y ocurre entre 30 °C y 37 °C (Matsuda y Sato, 1988). A temperaturas inferiores a ese rango puede suceder la multiplicación bacteriana, pero sin darse la síntesis de la toxina. Por otro lado, la síntesis de la toxoflavina depende de la densidad de la población bacteriana y es regulada mediante un mecanismo conocido como *quorum sensing* (Kim et al., 2004). Este fenómeno implica la síntesis de moléculas de señalización intercelular que, en el caso de bacterias Gram-negativas como *B. glumae*, son N-acil-homoserina-lactonas (Fuqua y Greenberg, 2002).

Las variedades de arroz generadas en Panamá, son el resultado de evaluaciones y selección durante varios ciclos, dentro del sistema de evaluación de cultivares del IDIAP (Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá) que comprende las siguientes etapas: el vivero de observación, ensayos de rendimiento y las pruebas regionales para determinar su valor agronómico, industrial y culinario, bajo los sistemas productivos de riego y secano favorecido. El objetivo de este trabajo fue cuantificar la resistencia a la infección por *B. glumae* de siete variedades distintas de arroz comerciales cultivadas en Panamá, esto es determinante para la selección de las mismas, tomando en cuenta algunos factores ambientales como la temperatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se utilizaron siete variedades de arroz provenientes de lotes comerciales certificados, las cuales fueron facilitadas por el IDIAP. Las variedades fueron las siguientes: I-52-05, I-38, I-FL-106-11, I-54-05, I-145-05, I-FL-137-11, GAB-11. Como bacteria patógena, se utilizó la cepa 075-I09-2 de *B. glumae*, facilitada por el Laboratorio de Fitopatología del IDIAP en Tanara, Chepo.

### Obtención del inóculo bacteriano

El inóculo bacteriano se preparó a partir de cultivos reactivados de la cepa 075-I09-2 de *B. glumae*. La bacteria se sembró en agar papa dextrosa (PDA) y posteriormente se incubó por 24 h a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación y verificada la pureza del aislamiento, una colonia de la bacteria se sembró en 30 mL de caldo tioglicolato, el cual se mantuvo en agitación constante (150 rpm) por 24 h - temperatura ambiente. Luego se



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

hicieron diluciones 1/10 de la solución de tioglicolato en agua destilada estéril, hasta obtener una suspensión acuosa de la bacteria con una concentración equivalente a una absorbancia de  $0,2 \pm 0,05$  a 600 nm (longitud de onda  $\lambda$  600 nm), la cual corresponde a aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (UFC) por mL, según determinaciones realizadas previamente.

### **Desinfección de las semillas de arroz**

Las semillas de arroz fueron previamente lavadas y desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 6% por 6 min, con agitación constante. Posteriormente, se descartó la solución desinfectante y se realizaron tres lavados de las semillas con agua destilada estéril. Adicionalmente, se hizo un segundo tratamiento de desinfección con etanol al 70% por 6 min y en agitación constante, seguido por tres lavados con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas, las semillas fueron embebidas en agua destilada estéril por 48 h, se lavaron una vez más con agua destilada estéril y se transfirieron a cajas de Petri.

### **Inoculación de las semillas de arroz**

Se inocularon las semillas de siete variedades de arroz partiendo de  $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> y diluciones sucesivas hasta  $1,0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>. Las semillas fueron sumergidas en las distintas suspensiones bacterianas por 30 min en agitación constante (150 rpm). Cumplido el tiempo se retiró el inóculo y las semillas de cada tratamiento se depositaron en cajas de Petri con papel absorbente húmedo estéril, luego se incubaron por siete días en oscuridad a tres temperaturas diferentes: 25 °C, 30 °C y 34 °C. Al tercer día de incubación se rehumedecieron las semillas con el fin de mantener constante la humedad. La severidad de la infección en las semillas se evaluó al día siete, después de la inoculación utilizando para ello un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió de 20 unidades experimentales (20 semillas). Como control, se utilizaron semillas sometidas al mismo tratamiento de desinfección, con la diferencia de que estas fueron sumergidas en agua destilada estéril en lugar de la suspensión bacteriana e igualmente se incubaron a las tres temperaturas utilizadas en las unidades experimentales.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

### Evaluación de la severidad de la infección:

La evaluación de la severidad de la infección se hizo en semillas individuales de cada tratamiento, según la escala de severidad propuesta por Devescovi et al. (2007) (Figura 1).

- a. Nivel de infección 1: plántulas completamente verdes e iguales de vigorosas a las del control no inoculado con *B. glumae*.
- b. Nivel de infección 2: plántulas completamente verdes, pero con un fenotipo menos vigoroso en comparación con el control no inoculado con *B. glumae*.
- c. Nivel de infección 3: plántulas con un desarrollo de la parte aérea de la planta, pero no mayor a 3,5 cm.
- d. Nivel de infección 4: plántulas con un desarrollo de la parte aérea de la planta, pero no mayor a 2 cm.
- e. Nivel de infección 5: plántulas con un desarrollo de la parte aérea de la planta, pero no mayor a 1 cm.
- f. Nivel de infección 6: coleóptilo y plúmula macerados, sin desarrollo de la planta.



**Figura 1. Escala de severidad de la infección de *Burkholderia glumae* en semillas de arroz.**

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las pruebas estadísticas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis ( $p=0,05$ ), no existen diferencias significativas entre las concentraciones de inóculo bacteriano y las distintas variedades de arroz estudiadas. Lo que indica que todas las variedades sometidas al ensayo presentaron algún grado de susceptibilidad frente a la infección por *B. glumae*,



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

ya sea a la concentración de inóculo bacteriano más baja utilizada ( $1 \times 10^3$  UFC) como en la más alta ( $1 \times 10^8$  UFC). Por otro lado, se encontró un efecto inóculo dependiente en los ensayos realizados a 25 °C y 30 °C, esto quiere decir que a mayor concentración de inóculo bacteriano mayor es la infección por *B. glumae*. Sin embargo, esto no se observó en el ensayo realizado a 34 °C, debido tal vez a que el estrés térmico al cual fueron sometidas las semillas tuvo un mayor efecto que el inóculo bacteriano en sí, de acuerdo a los controles.

Se observaron diferencias entre las temperaturas y los niveles de infección predominantes por variedad de arroz. La variedad I-FL-106-11, presentó a 25 °C un mayor número de semillas infectadas entre los niveles de infección 1 al 3. A 30 °C el mayor número de semillas infectadas se amplió al nivel 4 y a 34 °C el nivel de infección 5 fue el que presentó mayor número de semillas infectadas.

A 25 °C la variedad GAB-11, presentó un mayor número de semillas infectadas en los niveles 4, 5 y 6; a 30 °C en los niveles 3, 4, 5 y 6; y a 34 °C el mayor número de semillas infectadas presentaron niveles de infección 2, 3, 4 y 5.

La variedad I-38 presentó un comportamiento uniforme para las tres temperaturas, presentándose así un mayor número de semillas infectadas en los niveles 1, 2 y 3 para 25 °C, 30 °C y 34 °C.

La variedad I-52-05 presentó mayor número de semillas infectadas en los niveles 3 y 4 a 25 °C; a 30 °C los niveles de infección predominantes fueron el 1,2,3,4 y 6; y a 34 °C no hubo predominancia de un nivel de infección sobre otro en las concentraciones de  $10^3$  a  $10^6$ , con excepción de las concentraciones  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  en donde los niveles 5 y 6 fueron predominantes.

Por otro lado, la variedad I-54-05 a 25 °C presentó un mayor número de semillas entre los niveles de infección 1 al 4; a 30 °C los niveles de infección predominantes estuvieron entre 1 y 5. A 34 °C se observó un mayor número de semillas infectadas con el nivel 5.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Para la variedad I-145-05 se observó que el nivel de infección 3 fue el dominante en las tres temperaturas a las que fueron evaluadas las semillas.

La variedad I-FL-137-11 a 25 °C presentó un mayor número de semillas infectadas con el nivel 4 de infección; a 30 °C los niveles de infección predominantes estuvieron entre 1 y 3. Se observó a 34 °C uniformidad en el número de semillas infectadas por nivel de infección con excepción de las concentraciones  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  en donde el nivel de infección 5 fue el predominante.

De acuerdo a la prueba estadística HSD de Tukey-Kramer el nivel de infección 3 fue el que mayormente se presentó en los ensayos realizados a 25 °C y 30 °C, mientras que el nivel de infección 5 fue el que mayormente se presentó en el ensayo realizado a 34 °C.

Existen diferencias significativas entre las temperaturas y la susceptibilidad de las variedades de arroz frente a la infección por *B. glumae*. Esto pudiera deberse en parte al estrés térmico al que fueron sometidas las semillas evaluadas a 30 °C y 34 °C.

De acuerdo a estudios realizados, en donde se evaluó el efecto del estrés térmico frente a plantas de arroz, se determinó que una variación de 5 °C por encima de la temperatura ambiental (26 – 27 °C) provoca que la germinación de las semillas disminuya entre 37% y 38% (Prasad et al., 2006).

Otro factor a considerar es la producción de una fitotoxina llamada toxoflavina (Ham et al., 2011). Esta fitotoxina cuya síntesis está ligada a la presencia de dos operones (*tox ABCDE* y *tox FGHI*) y a dos genes (*toxJ* y *toxR*) ubicados en el cromosoma 2 del genoma de la bacteria (Yoneyama et al., 1998), es un importante factor de virulencia ya que es, según varias investigaciones, responsable de la sintomatología característica de la enfermedad del añublo bacterial en los cultivos de arroz (Buckle y Kartadarma, 1990). Diversos estudios indican que cepas de *B. glumae* mutantes con deficiencia de toxoflavina son cepas avirulentas (Buckle y Kartadarma, 1990; Jeong et al., 2003; Yoneyama et al., 1998). Contrario a esto, estudios realizados por Zuzuki et al. (2004), indican que las cepas donde se ven interrumpidos los genes que sintetizan la toxoflavina, son tan virulentas como



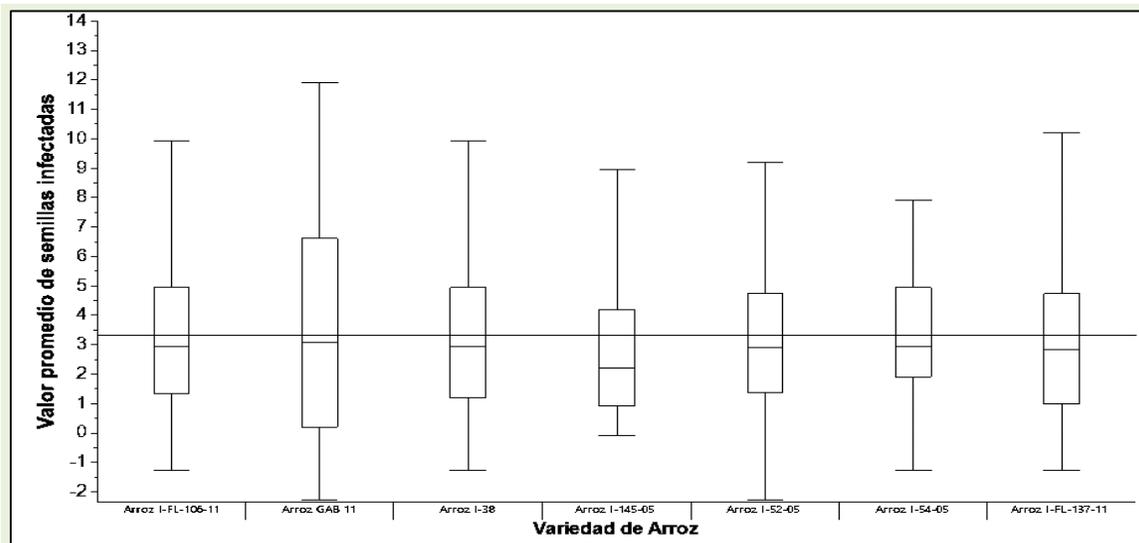
Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

las cepas comunes, lo que podría indicar que la toxoflavina no actúa sola, sino en conjunto con otros factores como la temperatura para generar el daño que ocasiona.

La biosíntesis de la toxoflavina en *B. glumae* depende de la temperatura y ocurre entre 30 °C y 37 °C, siendo 32,4 °C la temperatura óptima de biosíntesis (Matsuda y Sato, 1988). A temperaturas inferiores a ese rango se presenta la multiplicación bacteriana, pero sin darse la síntesis de la toxina, lo cual pudiera explicar que a 25 °C todas las variedades presentaron una baja susceptibilidad frente a la infección por *B. glumae* (Figura 2).

A 30 °C la variedad que presentó menor susceptibilidad fue la I-145-05 y la variedad que presentó un mayor grado de susceptibilidad fue la GAB 11 (Figura 3). Según estudios realizados en el Instituto de Innovación Agropecuarias de Panamá (IDIAP) la variedad I-145-05 es una de las variedades más dinámicas presentes en Panamá, ya que presenta un mayor grado de competitividad ante suelos arenosos y a estrés hídrico.

Desde el punto de vista genético, la variedad I-145-05 fue producto de un mejoramiento con fines comerciales, apta para la siembra a gran escala y con una buena calidad molinera.



(La línea representa el valor promedio de semillas infectadas).

**Figura 3. Análisis univariante de valor promedio de semillas infectadas por tratamiento con respecto a variedad de arroz a 30 °C.**



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

La variedad GAB-11 es producto de un cruce interespecífico de parentales genéticamente alejados y fue modificada para crear cultivares ricos en Fe y Zn. Lo que pudiese explicar su alta sensibilidad a *B. glumae*, es decir al aumentar sus valores nutritivos, su competitividad frente a agentes patógenos pudiese haber quedado comprometida. Por otro lado, a 34 °C las variedades GAB-11 e I-FL-137-11 fueron las más afectadas por la infección mientras que presentaron menor grado de susceptibilidad las variedades I-54-05 e I-FL-106-11 (Figura 4).

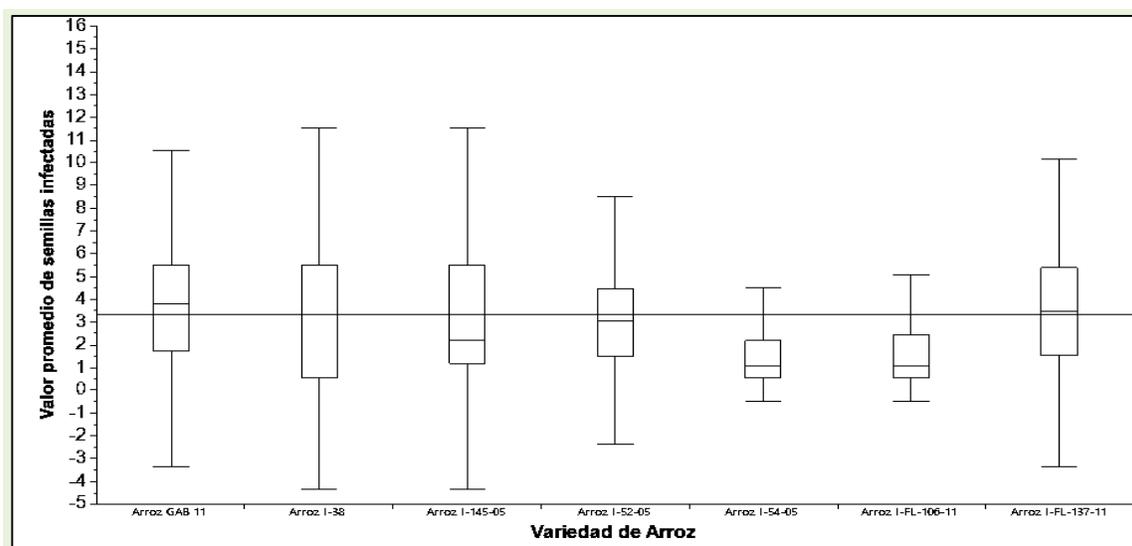
Las variedades I-54-05 e I-FL-106-11 fueron evaluadas y seleccionadas durante varios ciclos, dentro del sistema de evaluación de cultivares del IDIAP a nivel nacional, pasando por diferentes ensayos que mostraron, que ambas variedades presentan tolerancia moderada a algunos patógenos de importancia en cultivo de arroz en Panamá (*Pyricularia oryzae*, *Sarocladium oryzae* y *Rhizoctonia solani*).

Es importante señalar que los controles de los ensayos realizados a 34 °C mostraron plántulas con bajo crecimiento, asemejando a los niveles de infección 3 y 4. Esto apoya los resultados obtenidos en los ensayos, ya que las semillas incubadas a 34 °C fueron mayormente afectadas por la infección a *B. glumae*, sugiriendo un efecto combinado temperatura-infección.

Además, las plántulas presentaron crecimiento abundante de su sistema radical. Al respecto, Menzel (1983) al trabajar con papa y otros cultivos en condiciones *in vitro*, se encontró que, a temperaturas superiores a los 34 °C, se provocó un incremento en la producción endógena y en la actividad de las giberelinas, fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetativo en hojas, yemas y raíces. El efecto más característico de las giberelinas es el provocar una elongación extrema de los internodos sin aumentar su número, en este caso el alargamiento es producido por la cantidad y tamaño de las células de las raíces, lo que coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



(La línea representa el valor promedio de semillas infectadas).

**Figura 4. Análisis univariante de valor promedio de semillas infectadas por tratamiento con respecto a variedad de arroz a 34 °C**

## CONCLUSIONES

- Las siete variedades de arroz sometidas al estudio fueron susceptibles a la infección por *B. glumae*. La variable temperatura fue un factor influyente en la susceptibilidad, a 25 °C las siete variedades revelaron un menor grado de infección frente a *B. glumae*; a 30 °C la variedad I-145-05 presentó un menor grado de infección y la variedad GAB-11 fue la que se vio mayormente afectada por el patógeno y a 34 °C las variedades menos afectadas fueron la I-54-05 e I-FL-106-11, las más afectadas fueron nuevamente la variedad GAB-11 y la I-FL-137-11.
- Las concentraciones de inóculo bacteriano ( $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a  $1,0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>) no fueron una variable determinante, las siete variedades de arroz fueron susceptibles a la infección independientemente de la concentración a las que fueron sometidas.
- Estos datos son valiosos para la selección de las variedades de arroz a cultivar en la actualidad, pues toma la relación patógeno-temperatura y sus efectos en los niveles de producción.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## REFERENCIAS

- Buckle, K., y Kartadarma, E. (1990). Inhibition of bongkrek acid and toxoflavin production in tempe bongkrek containing *Pseudomonas cocovenenans*. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 571-576.
- Calpe, C. (2002). Rice in world trade. Status of the world rice market in 2002. 35-40.
- Coenye, T. (2009). Modern bacterial systematics in practice: Polyphasic taxonomy of the *Burkholderia cepacia* complex. Laboratory for Pharmaceutical Microbiology Ghent University, Belgium.
- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C., y Ait Barka, E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 607-626.
- Degrassi, G., Devescovi, G., Kim, J., Hwang, I., y Venturi V. (2008). Identification, characterization and regulation of two secreted polygalacturonases of the emerging rice pathogen *Burkholderia glumae*. *FEMS Microbiology Ecology*; 65(2), 251-262.
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J., Kim, J., Hwang, I., y Venturi, V. (2007). Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and Environmental Microbiology*; 73(15), 4950- 4958.
- Fuqua, C., y Greenberg, E. (2002). Listening in on bacteria: acyl homo serine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 685-695.
- Ham, J., Melanson, R., y Rush, M. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice. *Molecular Plant Pathology*; 12(4), 329-39.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., y Kang, Y. (2003). Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in may field crops. *Plant Disease* 87(8), 890-895.
- Kim, J., Kim, J.G., Kang, Y., Jang, J., Jog, G., Lim, J., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T., y Hwang, I. (2004). Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Molecular Microbiol.* 54(4), 921-934.
- Kurita, T., y Tabei, H. (1964). On the casual agent of bacterial grain rot of rice. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 33, 111.
- Latuasan, H., y Berends, W. (1961). On the origin of toxicity of toxoflavin. *Biochim Biophys Acta* 52, 502-508.
- Matsuda, I., y Sato, Z. (1988). Relation between pathogenicity and pigment productivity in the causal agent of bacterial grain rot of rice. *Ann. Pytopathol. Soc. Jpn.* 54:478. *Microbiol.* 38 (3), 1042-1047.
- Menzel, C. (1983). Tuberization in Potato at High Temperatures: Gibberellin Content and Transport from Buds. *Annals of Botany* 52 (1), 697-702.
- Prasad, A., Iverson, L., y Liaw, A. (2006). Newer Classification and Regression Tree Techniques: Bagging and Random Forests for Ecological Prediction. *Ecosystems* 9 (2), 181-199.
- Suzuki, F., Sawada, H., Azegami, K., y Tsuchiya, K. (2004). Molecular characterization of the tox operon involved in toxoflavin biosynthesis of *B. glumae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 70, 97-107.
- Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K., y Komagata, K. (1994). Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

*Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 235-245.

Viallard, V., Poirier, I., Cournoyer, B., Haurat, J., Wiebkin, S., Phhel-Keller, K., y Balandreau, J. (1998). *Burkholderia graminis* a novel species of rhizospheric *Burkholderia* and reassessment of *Pseudomonas phenazinium* pyrrocinia and *Pseudomonas glathei* into *Burkholderia*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 549-563.

Yabuuchi, E., Kosako, Y. Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., y Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. Microbiol. Immun. 36, 1251-1275.

Yoneyama, K., Kono, Y., Yamaguchi, I., Horikoshi, M., y Hirooka, T. (1998). Toxoflavin is an essential factor for virulence of *Burkholderia glumae* causing rice seedling rot disease. Annals of the Phytopath. Soc. of Jap. 64 (2), 91-96.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## NIDOS DE TERMITAS ARBÓREAS ASOCIADAS AL MARAÑÓN (*Anacardium occidentale*) EN RÍO HATO, COCLÉ, PANAMÁ<sup>1</sup>

**Randy Atencio<sup>2</sup>; Melvin Jaén<sup>3</sup>; Vidal Aguilera<sup>4</sup>**

El cultivo de marañón o anacardo (*Anacardium occidentale*), constituye uno de los frutales con mayor potencial de desarrollo en Panamá, siendo empleado con frecuencia en proyectos de reforestación, además de generar divisas por la comercialización de sus productos. Los objetivos de este estudio fueron identificar la especie de termita y evaluar variables relacionadas con los termiteros arbóreos asociados al marañón en Panamá. El estudio se desarrolló en una plantación de marañón ubicada en el corregimiento de Río Hato, provincia de Coclé, Panamá, donde fueron muestreados 10 de un total de 88 árboles. Las variables evaluadas incluyeron medidas asociadas a los árboles de marañón y medidas asociadas a los termiteros, analizadas incluyendo una matriz de correlación y un análisis de componentes principales. Los especímenes de termitas fueron muestreados y llevados a condiciones de laboratorio para la identificación de la especie. Se identificó a la termita presente que resultó ser *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae). Los resultados de este estudio indican que existen dos grupos de variables definidas, las asociadas al termitero o nido y las asociadas al árbol de marañón. Dichos elementos constituyen bases para programas de manejo integrado de los termiteros en marañón.

**Palabras clave:** Anacardo, Isoptera, Termitidae.

<sup>1</sup> Recepción: 6 de noviembre de 2020. Aceptación: 11 de marzo de 2021. Estudio realizado dentro del Proyecto de identificación y manejo de agentes bióticos causantes de problemas sanitarios en el marañón.

<sup>2</sup> Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Centro de Innovación Agropecuaria de Divisa (CIA Divisa). Entomólogo. e-mail: [randy.atencio@gmail.com](mailto:randy.atencio@gmail.com)

<sup>3</sup> IDIAP, Campo Experimental Río Hato Sur. M.Sc. Gerente de Proyecto de identificación y manejo de agentes bióticos causantes de problemas sanitarios emergentes en el marañón. e-mail: [mjaen\\_31@yahoo.es](mailto:mjaen_31@yahoo.es)

<sup>4</sup> IDIAP, CIA Divisa. Laboratorio de Protección Vegetal. Micología. e-mail: [vidalaguilera@gmail.com](mailto:vidalaguilera@gmail.com)



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## ARBOREAL TERMITE NESTS ASSOCIATED WITH CASHEW (*Anacardium occidentale*) IN RÍO HATO, COCLÉ, PANAMA

### ABSTRACT

The cashew (*Anacardium occidentale*) constitutes one of the fruit trees with the greatest potential for development in Panama, being frequently used in reforestation projects, in addition to generating foreign exchange for the commercialization of its double product. The objectives of this study were to identify the termite species and to evaluate variables related to arboreal termite nest associated with cashew tree in Panama. The study was developed in a cashew plantation in Río Hato, Coclé, Panama, where 10 out of 88 trees were sampled. The evaluated variables included measures associated with cashew trees and measures associated with termite nests, including a correlation matrix and a principal component analysis. Termite specimens were sampled and brought to laboratory conditions for specie identification. The termites present were identified as *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae). The results of this study indicated that there are two groups of defined variables, those associated with the termite nest and those associated with the cashew tree. These elements constitute the basis for integrated management programs for termite nest in cashew.

**Key words:** Anacardo, Isoptera, Termitidae.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo del marañón (*Anacardium occidentale* L.) (Sapindales: Anacardiaceae), representa uno de los frutales con mayor potencial de desarrollo para Panamá, considerando la adaptabilidad de este en diferentes regiones del país y los hábitos de consumo de los productos asociados al mismo (INEC, 2021).

En el cierre agrícola 2018-2019, se reportaron 380 hectáreas de superficie de marañón en Panamá (MIDA, 2019). Sin embargo, aunque el área de producción del marañón es relativamente menor con respecto a otros frutales, la cantidad de árboles de traspatio en las residencias del país lo colocan entre las frutas de mayor predilección (INEC, 2021).

Con un importante mercado internacional en Estados Unidos y la Unión Europea, se demanda su nuez descascarada o semilla, rica en micronutrientes; pero igualmente su



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

falso fruto jugoso con propiedades nutricionales significativas, principalmente por su contenido de carbohidratos (CENTA, 2003).

El marañón es una planta perenne de madera quebradiza, que puede sobrepasar los 10 m de altura, con hojas de color café rojizo cuando están tiernas, se tornan de color verde intenso a medida que se desarrollan, con flores (femeninas, masculinas, hermafroditas y anómalas), cuya unidad de racimo puede tener hasta 1600 unidades de flores y un fruto que consta de dos partes: un pseudofruto y la nuez o semilla (CENTA, 2003).

Al igual que otras plantas cultivadas tiene asociado un complejo de malezas, enfermedades y plagas artrópodos, incluyendo dentro de éstas últimas diversos estudios en artrópodos del marañón de los órdenes de insectos Hemiptera, Coleoptera, Diptera e Isoptera, distinguiendo plagas y benéficos a nivel regional obtenidos en Nicaragua (Jiménez-Martínez y Gómez-Martínez, 2012; Jiménez-Martínez et al., 2013) y en localidades de Ghana y Benín en África (Agboton et al., 2014; Dwomoh et al., 2008).

El orden Isoptera constituye un grupo de insectos polifórmicos, eusociales, exopterigotas que viven en unidades (termiteros), compuestas por un número limitado de individuos reproductores primarios (rey y reina, esclerotizados y macrópteros), ninfas, neoténicos (imago adicionales o sexuales de reemplazamiento), soldados y las obreras, que concentran su alimentación en madera, hierbas, hongos y otros materiales de origen vegetal (Nickle y Collins, 1992; Gaju Ricart et al., 2015).

Isoptera constituye un grupo de distribución cosmopolita, con aproximadamente 3102 especies distribuidas en nueve familias descritas (Mastotermitidae, Archotermopsidae, Stolotermitidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Stylotermitidae, Hodotermitidae, Serritermitidae y Termitidae), donde su importancia radica en los daños que pueden ocasionar en postes, árboles, cultivos, casas, obras de arte y muebles, con un impacto global estimado en 40 000 millones de dólares anuales (Gaju Ricart et al., 2015).

La fauna de termitas reportadas en Panamá es diversa, con especies endémicas (también encontradas en la región del caribe, centro, norte y sur de América) incluyendo



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

49 especies, dentro de las cuales la primera especie descrita fue *Nasutitermes nigriceps* (Haldeman) y posteriormente *Nasutitermes corniger* (Motschulsky), que construyen nidos arbóreos (Nickle y Collins, 1992; Cambra, 2002).

En Panamá, 13 especies son consideradas plagas, sobre todo de madera o productos derivados de la madera incluyendo las siguientes especies dentro de tres familias (Nickle y Collins, 1992; Cambra, 2002):

A-Familia Kalotermitidae: *Cryptotermes brevis* (Walker), *Cryptotermes domesticus* (Haviland), *Cryptotermes dudleyi* Banks y *Cryptotermes longicollis* Banks.

B-Familia Rhinotermitidae: *Heterotermes aureus convenxinotatus* (Snyder), *Heterotermes tenuis* (Hagen), *Coptotermes crassus* Snyder y *Coptotermes niger* Snyder.

C-Familia Termitidae: *Microcerotermes arboreus* Emerson, *Termes hispaniolae* (Banks), *Nasutitermes corniger* (Motschulsky), *Nasutitermes ephratae* (Holmgren) y *Nasutitermes nigriceps* (Haldeman).

En Benín en el Oeste de África, se han reportado a *Amitermes* sp., *Macrotermes bellicosus* Smeathmann y *Nasutitermes* sp. (Termitidae) asociadas al marañón en plantaciones tanto nuevas y viejas plantaciones (Agboton et al., 2014). En Nigeria los reportes de Isoptera en marañón incluyen daños en raíces y brotes por *Macrotermes natalensis* y *Nasutitermes* spp. (Asogwa et al., 2008). En Nicaragua, el grupo Isoptera había sido reportado como común en plantaciones de marañón, tanto en el suelo como en las ramas de los árboles, considerando una clasificación de comején subterráneo causando daños en el sistema radicular y comején aéreo afectando las ramas de los árboles (CIPRES, 2008; Jiménez-Martínez et al., 2014).

El estudio se orientó al grupo Isoptera, con el objetivo de identificar y evaluar la especie de termita presente y sus principales variables relacionadas a termiteros arbóreos asociados a marañón en Panamá.



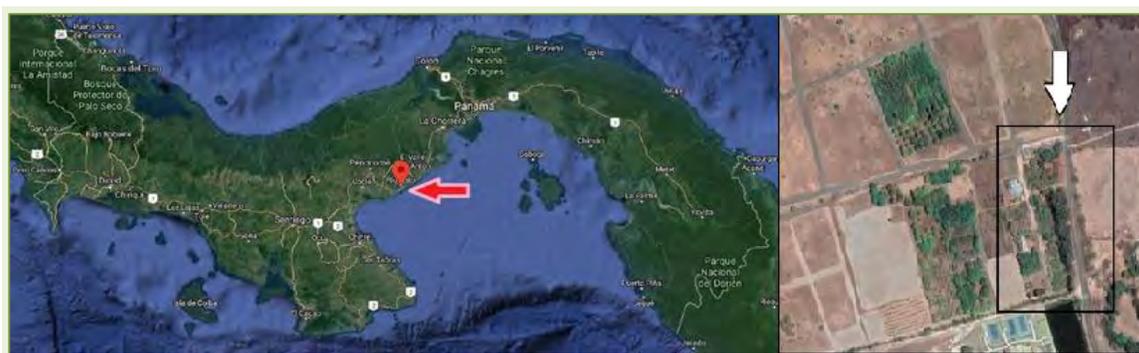
Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Zona de estudio

El estudio se desarrolló durante los meses de agosto a septiembre de 2020, en la finca experimental Río Hato Sur del Centro de Innovación Agropecuaria de Recursos Genéticos (CIARG), IDIAP, localizada en el corregimiento de Río Hato, distrito de Antón, provincia de Coclé, entre los 8° 21' 9,216" de latitud Norte y los -80° 9' 41,256" de longitud Oeste (Figura 1).

Según la clasificación climática de Köppen y Geiger, Río Hato presenta un clima tropical de Sabana (Aw) cálido durante todo el año, con una estación seca. Río Hato se encuentra a 37 m sobre el nivel del mar, con una temperatura media anual es 27,1 °C y la precipitación anual de 1253 mm (Climate-Data.org., 2020).



(Fuente: Google, 2020).

**Figura 1. Lado izquierdo: Ubicación de la finca experimental Río Hato Sur en mapa de Panamá. Lado derecho: Mapa de ubicación de árboles de marañón dentro de la finca experimental Río Hato Sur.**

### Área experimental

La toma de muestra incluyó la selección de 10 árboles al azar de una población total de 88 árboles de la plantación, considero la fórmula de Murray y Larry (2009), para determinar las características de los nidos de termiteros aéreos presentes adaptando la metodología de Gómez y Sánchez (2016). El estudio se realizó dentro de una plantación que tiene 36 años (1984) y los árboles son de variedad de origen Criollo propagada directamente de semilla gámica, por lo cual se presenta alta variabilidad.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

### **Identificación de especie de termita**

Se procedió a tomar muestras de los termiteros para determinar variables dentro de las utilizadas dentro de la metodología de Coles de Negret y Redford (1982):

- Especie presente en los termiteros.
- Peso promedio de soldados y obreros presentes en los termiteros (se estimó un promedio de 100 especímenes).
- Largo total y de capsula cefálica de los especímenes (se estimó un promedio de 100 especímenes).

Los especímenes capturados fueron introducidos y preservados en viales de vidrio con alcohol al 95% y transportados al Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Innovación Agropecuaria de Divisa (CIA Divisa) del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). Para la identificación y toma de medidas de los especímenes las observaciones se realizaron con ayuda de un estereomicroscopio Leica DM 1000 LED, con aumento de 40 a 100 X mientras que su procesamiento se realizó con la ayuda del software Leica Application Suite (LAS).

Para clasificar las termitas, se utilizó la clave taxonómica de referencia (Nickle y Collins, 1992) para los grupos de insectos de Isoptera presentes en Panamá.

### **Toma de muestra de variable asociadas a termiteros**

Una vez seleccionados los árboles, se procedió con ayuda de cinta métrica suave de 150 cm de longitud, cinta suave de fibra de vidrio de 50 m, balanza portátil de 12 kg y clinómetro; a medir las siguientes variables:

- Medida del diámetro a la altura del pecho (D.A.P.).
- Altura del termitero en metros.
- Largo del termitero en centímetros.
- Ancho del termitero en centímetros.
- Peso del termitero en kilogramo.
- El número de horqueta donde se ubica el termitero considerando la primera horqueta a partir de la base del suelo y posteriores bifurcaciones.
- Altura del árbol en metros.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## **Análisis estadístico de variables asociadas al termitero**

La tabulación de datos, el cálculo de porcentajes y las tablas fueron realizados con el programa Microsoft Excel 2016. Se procedió con los datos de las variables asociadas al árbol y al termitero, para calcular una matriz de correlación, indicando los valores de correlación de Pearson, midiendo el grado de relación lineal entre cada par de variables, de las siete seleccionadas para este experimento.

Con esta información se procedió a la ejecución de un Análisis de Componentes Principales (ACP), utilizando para ello el Programa Estadístico R con el interfaz gráfica R Commander con el paquete FactoMineR (R Project, 2020) a través de esta prueba se procuró condensar la información aportada por las múltiples variables estudiadas en solo unos pocos componentes (Lugo et al., 2013), para simplificar la complejidad de espacios muestrales, a la vez que se conservaba la información sobre los parámetros del árbol seleccionado y del termitero.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Identificación de especie de termiteros en marañón**

Dentro de los 10 árboles muestreados se determinó que, los nidos arbóreos en la plantación estudiada pertenecen a la especie *Nasutitermes corniger* (Motschulsky, 1855) (Isoptera: Termitidae), considerando los caracteres observados en los soldados.

Esta especie ha sido reportada para Panamá por Nickle y Collins (1992), pero no con estudios sobre marañón, al menos inicialmente. Reportes de Dietz (1923) indicaban que la especie se concentraban en la zona aledaña al Canal de Panamá, donde es común encontrarla en postes, diversos árboles vivos y muertos. La presencia del género en marañón concuerda con reportes del género en Nicaragua (Maes, 1990), Nigeria (Asogwa et al., 2008) y Benín (Agboton et al., 2014).

El largo promedio de obreras capturadas fue de  $3,581 \pm 0,104$  mm con un peso de  $0,0035 \pm 0,00006$  g y los soldados presentaron un largo promedio de  $4,109 \pm 0,016$  mm con un peso promedio de  $0,0042 \pm 0,00006$  g (Cuadro 1 y Figura 2).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Los soldados de la especie son utilizados con claves taxonómicas para su clasificación (Nickle y Collins, 1992), indicando entre los caracteres determinantes que los soldados son nasutiformes o con cabeza de menos de 1,65 mm con una forma prolongada conocida como naso cónico bien desarrollado, mucho más ancho en la base, con mandíbulas reducidas, con antenas de 11 segmentos; con una cabeza con cuatro a seis setas largas dorsalmente detrás del nasus y dos setas sobre el occipucio, con tergitos abdominales con una línea de cuatro largas setas y dispersas setas cortas (Figura 2).

**Cuadro 1. Medidas de especímenes de termitas obreras y soldados dentro de nidos de termitas *Nasutitermes corniger* en Panamá.**

Termita	Largo cabeza (mm)	Largo tórax + abdomen (mm)	Largo total (mm)	Peso (g)
<b>Obrera</b>	1,009±0,005	2,576±0,104	3,581±0,104	0,0035±0,00006
<b>Soldado</b>	1,076±0,006	3,033±0,012	4,109±0,016	0,0042±0,00006



**Figura 2. Soldado (A) y obrera (B) de *Nasutitermes corniger*.**



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## Análisis de variable asociadas a termiteros en árboles de marañón

Los 10 árboles utilizados para el estudio presentaron termiteros. Sus termiteros o nidos son característicos por encontrarse en los árboles, extendiéndose a través de los troncos de los árboles. Los nidos presentan una forma ovalada o elipsoide muy bien definida. Mucho más largos que anchos en promedio de 1,26 veces (Cuadro 2).

Los nidos de *Nasutitermes corniger* evaluados en marañón en Río Hato presentaban una coloración externa color marrón oscura de forma elipsoidal entre 46,10 cm de ancho y 58,30 cm de largo, donde el peso de estos se sitúa en promedio  $4,45 \pm 2,54$  kg, en hábitats de tierras bajas, que puede ser diferenciada de otras especies por patrones de forma (esférica) y coloración diferente (marrón claro) (Thorne, 1980) (Cuadro 2 y Figura 3).

Los nidos de esta especie son construidos de una mezcla maleable de papel y pegamento que se endurece cuando se seca, proveniente de madera, tierra y otras sustancias finamente digeridas que pasan a través del tracto digestivo de las obreras y que son unidas en su posición cuando ellas son excretadas; haciendo de estos nidos impermeables al agua (Dietz, 1923).

Los nidos observados durante el estudio se ubican estratégicamente sobre la horqueta principal de los árboles de marañón a una altura de 1,88 m del suelo (Cuadro 2), encontrando referencias de investigaciones en México de nidos de la especie *Nasutitermes* spp. sobre las horquetas de árboles de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una altura promedio de 2,2 m sobre el suelo (Gómez y Sánchez, 2016) y en horquetas de 10 especies de árboles, incluyendo tintal (*Haemotaxylum campechianum* L.), *Swietenia macrophylla* King y *Guazuma ulmifolia* Lam., a una altura promedio de 2,51 m (Moreno-Jiménez et al., 2017).

**Cuadro 2. Variables evaluadas de termiteros en árboles de marañón en Río Hato, Coclé, Panamá.**

Diámetro a la altura del pecho (D.A.P.) (m)	Altura del termitero (m)	Largo termitero (cm)	Ancho termitero (cm)	Peso termitero (Kg)	Horqueta (No.)	Altura árbol (m)
0,94±0,2884	1,88±0,66	58,30±6,17	46,10±5,49	4,45±2,54	1,30±0,48	5,82±1,99



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**Figura 3. Marañón con termitero (A), horqueta con termitero (B), termitero, sección externa (C) v termitero sección interna (D).**

A partir de los datos se analizó una matriz de correlación con siete variables seleccionadas que dio como resultado que existe una alta correlación positiva ( $>0,7$ ) entre el peso del termitero (kg) y el ancho del termitero (cm) (0,8045945), considerando igualmente una relación moderada positiva entre altura del termitero (m) y altura del árbol (m) (0,51810071); largo del termitero (cm) y ancho del termitero (cm) (0,57715269); D.A.P. (m) y Horqueta (No.) (0,52797314); peso del termitero (cm) y largo del termitero (cm) (0,4864176) (Cuadro 3).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

**Cuadro 3. Matriz de correlación entre las variables de estudio en marañón en Panamá.**

	Altura árbol (m)	Altura del termitero (m)	Ancho termitero (cm)	D.A.P. (m)	Largo termitero (cm)	Horqueta (No.)	Peso termitero (kg)
<b>Altura árbol (m)</b>	1,00000000	0,51810071	-0,08560048	0,44649684	0,10078067	0,29328690	0,1690706
<b>Altura del termitero (m)</b>	0,51810071	1,00000000	0,02910893	0,31735962	-0,41126898	0,41046561	0,1994048
<b>Ancho termitero (cm)</b>	-0,08560048	0,02910893	1,00000000	-0,01586965	0,57715269	0,02934836	0,8045945*
<b>D.A.P. (m)</b>	0,44649684	0,31735962	-0,01586965	1,00000000	0,06011212	0,52797314	0,2094744
<b>Largo termitero (cm)</b>	0,10078067	-0,41126898	0,57715269	0,06011212	1,00000000	0,26489403	0,4864176
<b>Horqueta (No.)</b>	0,29328690	0,41046561	0,02934836	0,52797314	0,26489403	1,00000000	0,3300870
<b>Peso termitero (kg)</b>	0,16907065	0,19940484	0,8045945*	0,20947438	0,48641757	0,33008704	1,0000000

\* Los valores dentro son significativos ( $p < 0,05$ ).

Utilizando las dos variables con alta asociación durante esta evaluación, ancho del termitero (Y) y peso del termitero (X) se ejecutó un análisis de regresión lineal donde se determinó que existe un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,6474$ , que indicó que el ancho del termitero explica el 64,74% de la variabilidad del peso ( $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos del análisis de componentes principales que incluyen la matriz de vectores propios (Cuadro 4) y los grupos de individuos dentro de la nube de individuos (Figura 4), sustentan la gráfica de variables del análisis de componentes principales (Figura 5) donde en la primera dimensión sobre el círculo de centro 0 y radio 1, hay un grupo de variables, formado por todas las variables evaluadas próximas a 1.

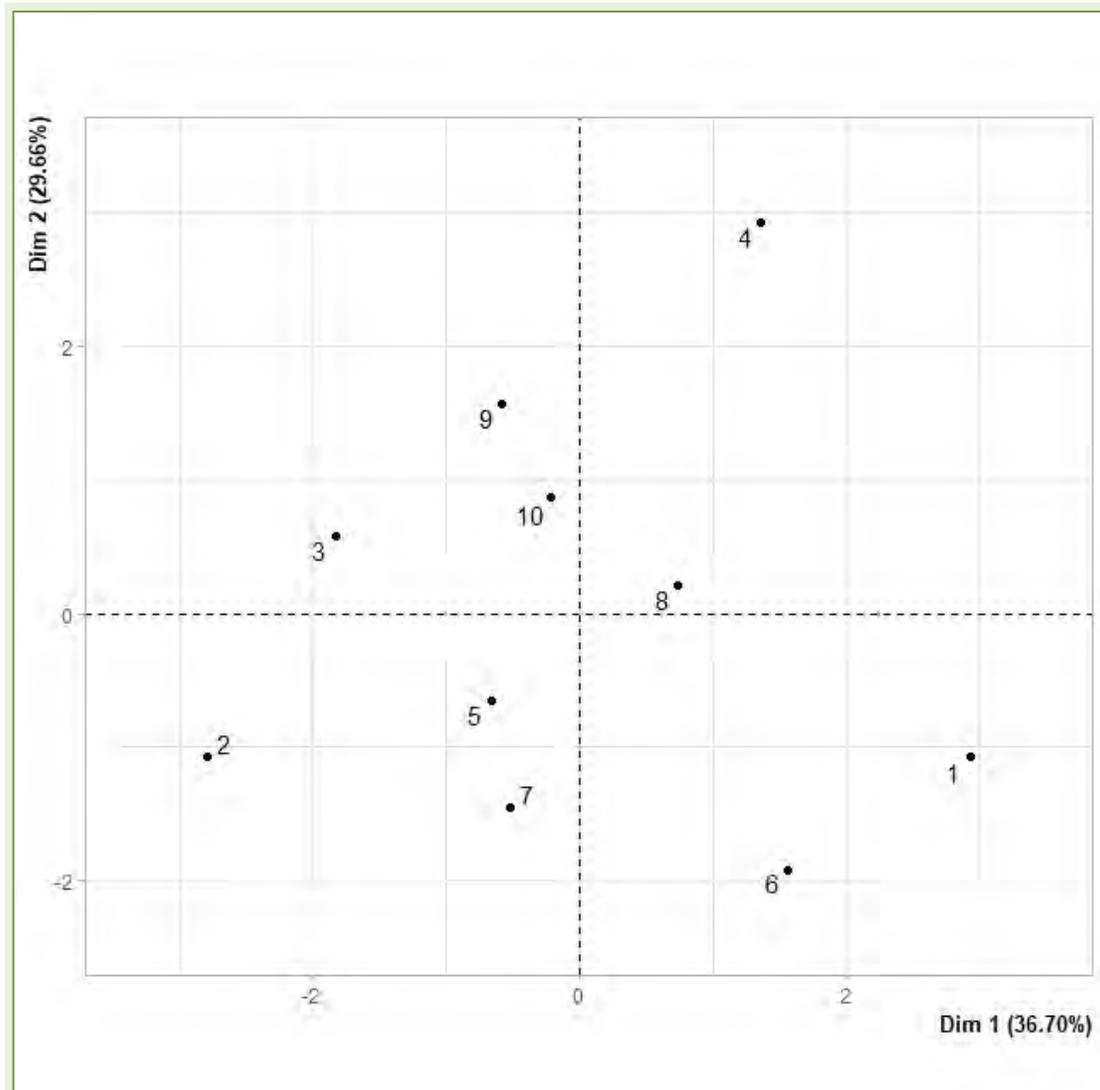
En la segunda dimensión, se separan dos grupos de variables, un primer grupo cercano relacionado a las variables del árbol incluyendo la potencial altura del termitero próximos a 1 y un segundo grupo de variables cercanas relacionadas a caracteres del termitero incluyendo peso, ancho y largo del nido próximos a -1, que indica que entre los dos grupos de variables existe una correlación cercana a -1, que significa que si uno de los grupos aumentan, como el de las variables del árbol, es probable que el de caracteres del termitero disminuyan, considerando los valores presentados en el estudio (Figura 4 y 5).



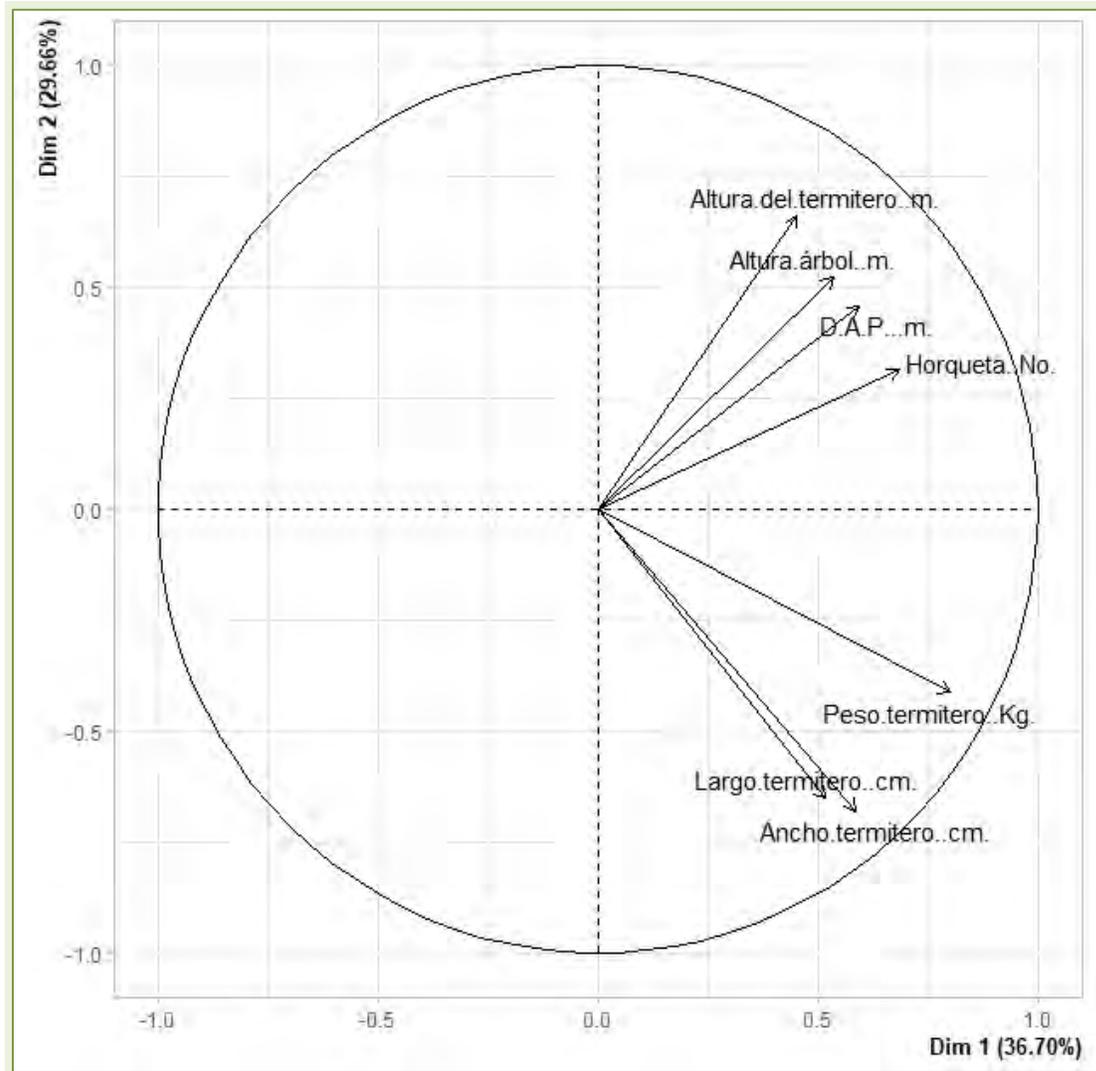
Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

**Cuadro 4. Matriz de vectores propios en análisis de componentes principales.**

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5	Dim.6	Dim.7
Varianza	2,569	2,076	0,971	0,687	0,496	0,182	0,019
% de Var.	36,702	29,660	13,867	9,811	7,086	2,604	0,270
% de Var. Acumulativo	36,702	66,363	80,230	90,041	97,126	99,730	100,000



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**Figura 5. Variables del análisis de componentes principales.**

### CONCLUSIONES

- La identificación de la especie de termita asociada a árboles de marañón en Río Hato correspondió a *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae); de acuerdo con los caracteres morfológicos observados en la casta soldado, en complemento con la caracterización de los termiteros o nidos.
- Existen dos grupos de variables definidos, los asociados al termitero y los asociados al árbol de marañón.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- Sirve de línea base, para el desarrollo de futuros estudios en las especies de termitas que podrían ser problema para los cultivos frutícolas; los cuales representan un potencial de desarrollo sostenible para el sector agrícola y para el país. Finalmente, es meritorio considerar el desarrollo de estrategias actualizadas de manejo integrado del agroecosistema a intervenir, a corto, mediano y largo plazo; a fin de mitigar los posibles impactos de dichas plagas en frutales como el marañón.

## REFERENCIAS

- Agboton, C., Onzo, A., Ouessou, F., Goergen, G., Vidal, S., y Tamo, M. (2014). Insect Fauna Associated with *Anacardium occidentale* (Sapindales: Anacardiaceae) in Benin, West Africa. *Research. Journal of Insect Science*, 14(229), 1-11. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu091>
- Asogwa, E.A., Hammed, L.A., y Ndubuaku, T.C.N. (2008). Integrated production and protection practices of cashew (*Anacardium occidentale*) in Nigeria. Review. *African Journal of Biotechnology*, 7(25), 4868-4873. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59681>
- Cambra, R. (2002). Primer registro para Panamá del “Comején Gigante” del género *Syntermes* Holmgren (Isoptera: Termitidae, Nasutitermitinae) y de la especie *Syntermes aculeosus* para Perú. *Tecnociencia*, 4(1), 109-116. <http://up-rid.up.ac.pa/882/>
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). (2003). Cultivo del Marañón. Guía Técnica No. 11. <http://centa.gob.sv/docs/guias/frutales/Guia%20maranon%202003.pdf>
- CIPRES (Centro Para la Promoción, la Investigación y el Desarrollo Rural y Social). (2008). Guía para el manejo de las principales plagas de marañón orgánico en Nicaragua. 39 p. <https://cenida.una.edu.ni/textos/NH10J61ia.pdf>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Climate-Data.org. (2020). Río Hato Clima. Panamá. <https://es.climate-data.org/america-del-norte/panama/rio-hato/rio-hato-700679/>

Coles de Negret, H.R., y Redford, K.H. (1982). The biology of nine termites species (Isoptera: Termitidae) from the Cerrado of Central Brazil. *Psyche*, 89, 81-106.

Dietz, H.F. (1923). Biological Notes on The Termites of the Canal Zone and Adjoining Parts of the Republic of Panama. *Journal of Agricultural Research*, 26(7), 279-302. <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43966669/PDF>

Dwomoh, E., Ackonor, J., y Afun, J. (2008). Survey of insect species associated with cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) and their distribution in Ghana. *African Journal of Agriculture Research*, 3(3), 205-214. <https://doi.org/10.5897/AJAR.9000663>

Gaju Ricart, M., Bach de Roca, C., y Molero Baltanás, R. (2015). Clase Insecta: Orden Isoptera. *Revista Ibero Diversidad Entomológica @ccesible*, 49, 1-17. [http://sea-entomologia.org/IDE@/revista\\_49.pdf](http://sea-entomologia.org/IDE@/revista_49.pdf)

Gómez Gómez, M.A., y Sánchez Soto, S. (2016). Aspectos cuantitativos sobre la presencia de nidos de *Nasutitermes* spp. (Isoptera: Termitidae) en cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco, México. *Revista Nicaragüense de Entomología*, 111, 9 p. <http://www.bio-nica.info/RevNicaEntomo/111-Sanchez-Nasutitermes.pdf>

Google. (2020). Mapa de Río Hato. [Río Hato - Google Maps](#)

INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo). 2021. Explotaciones y número de plantas de guayaba y marañón en la República, según provincia, comarca indígena, distrito y corregimiento año agrícola 2010/2011. [https://www.inec.gob.pa/publicaciones/Default3.aspx?ID\\_PUBLICACION=481&ID\\_CATEGORIA=15&ID\\_SUBCATEGORIA=60](https://www.inec.gob.pa/publicaciones/Default3.aspx?ID_PUBLICACION=481&ID_CATEGORIA=15&ID_SUBCATEGORIA=60)



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](#).

- Jiménez-Martínez, E., Rugama-Lovo, I., López-Vilchez, M., y Martínez-Jorge, G. (2013). Dinámica poblacional de insectos coleópteros rastros asociados al marañón (*Anacardium occidentale* L.) en León, Nicaragua. Protección de Plantas. La Calera. *Revista Científica*, 13(21), 68-75. <https://doi.org/10.5377/calera.v13i21.1636>
- Jiménez-Martínez, E., y Gómez-Martínez, J. (2012). Insectos plagas y benéficos asociados al marañón (*Anacardium occidentale* L.) orgánico y convencional, En León, Nicaragua. Protección de Plantas. La Calera. *Revista Científica*, 12(18), 9-17. <https://doi.org/10.5377/calera.v12i18.1120>
- Jiménez-Martínez, E., Sandino-Díaz, V., y Gómez-Martínez, J. (2014). Insectos asociados al cultivo del marañón en Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. 93 p. <https://repositorio.una.edu.ni/2742/>
- Lugo González, D.A., Hugo Aguilar, V., Casotto, M., Laurentin, A., y Gómez, A. (2013). Aplicabilidad de estadística multivariada para estudios nutricionales: bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63, 231-239.
- Maes, J.M. (1990). Catálogo de los Isoptera de Nicaragua. *Revista Nicaragüense de Entomología*, 13, 13-20. <http://www.bio-nica.info/RevNicaEntomo/13-Isoptera.pdf>
- MIDA (Ministerio de Desarrollo Agropecuario). (2019). Cierre Agrícola 2018-2019. 46 p. [https://www.mida.gob.pa/upload/documentos/cierre\\_2018-2019\\_ok.pdf](https://www.mida.gob.pa/upload/documentos/cierre_2018-2019_ok.pdf)
- Moreno-Jiménez, V., Jiménez-Trinidad, A., Hernández-Sánchez, F.J., Flores-Escalona, C., y Pérez-De la Cruz, M. (2017). Distribución de termiteros de *Nasutitermes* spp. (Insecta: Isoptera) en una selva baja inundable de tintal (*Haematoxyum campechianum* L.), en Tabasco, México. *Revista Nicaragüense de Entomología*, 121, 14 p. <http://www.bio-nica.info/RevNicaEntomo/121-MorenoTermitesMexico.pdf>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Murray R, S., y Larry J., S. (2009). Estadística. (4ta ed.). [https://eduvirtual.cuc.edu.co/moodle/pluginfile.php/523771/mod\\_resource/content/1/Estadistica%20de%20Schaum.pdf](https://eduvirtual.cuc.edu.co/moodle/pluginfile.php/523771/mod_resource/content/1/Estadistica%20de%20Schaum.pdf)

Nickle, D., y Collins, M. (1992). The Termites of Panama (Isoptera). En D. Quintero, y A. Aiello (Eds.), *Insects of Panama and Mesoamérica: Selected Studies* (pp. 208-241). Oxford, England. Oxford University Press.

R Project. (2020). The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>

Thorne, B. (1980). Differences in nest architecture between the neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *Nasutitermes ephratae* (Isoptera: Termitidae). *Psyche*, 87, 235-243. <https://doi.org/10.1155/1980/12305>

### AGRADECIMIENTO

Al Dr. Anovel Barba por su colaboración en la toma de fotografías con el Microscopio Multifocal Leica M125 producto del Proyecto 2017-4-ITE16-R2-014 SENACYT en el laboratorio Protección Vegetal del Centro de Innovación Agropecuaria de Divisa.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## POLIMORFISMOS DE MARCADORES ASOCIADOS A LA CALIDAD DE LECHE EN POBLACIONES CRIOLLAS Y TRANSFRONTERIZAS<sup>1</sup>

**Axel Villalobos-Cortés<sup>2</sup>; Hilda Castillo<sup>3</sup>; Manuel Murillo<sup>4</sup>; Rita González-Herrera<sup>5</sup>**

### RESUMEN

Los programas de mejoramiento genético de ganado han cambiado gradualmente de métodos tradicionales de selección fenotípica a la selección cuantitativa y genotípica mediante la utilización de marcadores moleculares y la identificación de genes relacionados a rasgos económicamente importantes. El objetivo de este trabajo fue identificar seis polimorfismos de nucleótido simple asociados (SNP) a genes de calidad de leche, DGAT1, CSN1S1, CSN1S2, LALBA, GH1 y ABCG2 en algunas poblaciones criollas y transfronterizas mediante secuenciación NGS. Se tomaron muestras aleatorias de 73 animales de diversos genotipos puros, Criollos (Guaymí, GUY y Guabalá, GUA) transfronterizos (Brahman, BRAH; Holstein, HO y Senepol, SEN) y cruzados (europeo x cebú, EXC e Indefinidos, SRD). El análisis de los SNP se realizó mediante el panel de secuenciación *Truseq Bovine Parentage*. Para calcular la variabilidad genética dentro de cada población, se calcularon los siguientes parámetros: Equilibrio Hardy-Weinberg, Frecuencia alélica y genotípica, heterocigosis observada (Hob) y esperada (He) e Índice de Shannon. Los marcadores GH1, LALBA y ABCG2 resultaron monomórficos. Los marcadores más informativos fueron DGAT1, CSN1S1 y CSN1S2, siendo el marcador DGAT1 el que presentó mayores valores de Hob y He con valores de 0,424 y 0,430, respectivamente, y los valores más bajos para Hob y He se observaron en CSN1S2 con 0,247 y 0,276, respectivamente. Estos resultados apuntan que los marcadores polimórficos encontrados pueden ser de utilidad en los programas de mejoramiento sumando a la selección cuantitativa, sin embargo, se requiere un mayor análisis, incrementando el número de animales y razas. Se logró determinar polimorfismos en los marcadores DGAT1, CSN1S1 y CSN1S2, en los genotipos sometidos al presente estudio, sin embargo, no se observaron alelos fijados en las razas Holstein y Guabalá. La raza Guabalá mostró una fijación del alelo A en ABCG2, situación totalmente contraria en el resto de los genotipos estudiados.

**Palabras clave:** Bioinformática, biotecnología, marcadores moleculares, lechería.

<sup>1</sup> Recepción: 18 de junio de 2020. Aceptación: 29 de abril de 2021. Trabajo realizado en el Proyecto: Conservación y Uso de Bovino Criollo Panameño. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).

<sup>2</sup> IDIAP. LABMA, Ciudad del Saber. Ph.D. Conservación y Mejora Animal. e-mail: [villalobos.axel@gmail.com](mailto:villalobos.axel@gmail.com)

<sup>3</sup> IDIAP. LABMA, Ciudad del Saber. M.Sc. Fitomejoramiento.

<sup>4</sup> Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses (IMELCF), Ciudad del Saber. Lic. en Biotecnología Laboratorio Biomolecular.

<sup>5</sup> IDIAP. LABMA, Ciudad del Saber. Lic. en Biotecnología.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## POLYMORPHISMS OF MARKERS ASSOCIATED WITH MILK QUALITY IN CREOLE AND CROSS-BORDER POPULATIONS

### ABSTRACT

Genetic breeding programs have gradually changed from traditional phenotypic selection methods to quantitative and genotypic selection using molecular markers and the identification of genes related to economically important traits. The objective of this work was to identify six single nucleotide polymorphisms associated (SNP) with milk quality genes, DGAT1, CSN1S1, CSN1S2, LALBA, GH1 and ABCG2 in some creole and cross-border populations breeds by sequencing (NGS). Random samples were taken from 73 animals of various pure genotypes, Creoles (Guaymi, GUY and Guabala, GUA), Cross-border breeds (Brahman, BRAH; Holstein, HO; Senepol, SEN; Guaymi, GUY and Guabala, GUA) and cross genotypes (European x Zebu, EXC and Indefinite, SRD). SNP analysis was performed using the Truseq Bovine Parentage sequencing panel. To calculate the genetic variability within population, the following parameters were calculated: Hardy-Weinberg equilibrium, Allelic and genotypic frequency, observed heterozygosity (Hob) and expected (He) and Shannon Index. The markers GH1, LALBA and ABCG2 were monomorphic. The most informative markers were DGAT1, CSN1S1 and CSN1S2, with the DGAT1 marker having the highest Hob and He values with values of 0,424 and 0,430, respectively, and the lowest values for Hob and He were observed in CSN1S2 with 0,247 and 0,276, respectively. These results suggest that the polymorphic markers found may be useful in breeding programs, adding to the quantitative selection, however, further analysis is required, increasing the number of animals and breeds. It was possible to determine polymorphisms in the markers DGAT1, CSN1S1 and CSN1S2, in the genotypes submitted to the present study, however, no alleles fixed in the Holstein and Guabala breeds were observed. The Guabala breed showed a fixation of the A allele in ABCG2, a completely opposite situation in the rest of the genotypes studied.

**Key words:** Bioinformatics, biotechnology, molecular markers, milk production.

### INTRODUCCIÓN

El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base nucleotídica del genoma (Brookes, 1999; Vignal et al., 2002). Los avances en la secuenciación de ADN de alto rendimiento y la bioinformática ha hecho que el uso de SNP sea más populares (Heaton et al., 2002). Estos se encuentran distribuidos por todo el ADN y pueden localizarse tanto en regiones codificantes como no codificantes (Sachidanandam et al., 2001). En varias especies domésticas, incluido el



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

bovino, están disponibles decenas de miles de marcadores SNP (Matukumalli et al., 2009). La disponibilidad de genotipos de estos SNP permite estimar la composición de la raza de animales individuales utilizando datos genómicos (Frkonja et al., 2012; Hulsegge et al., 2013). Los programas de mejoramiento genético de ganado han cambiado gradualmente de métodos tradicionales de selección fenotípica a la selección genotípica mediante la utilización de marcadores moleculares. La identificación de genes relacionados a rasgos económicamente importantes es el enfoque principal de la genómica del ganado, y una gran cantidad de genes candidatos se han asociado potencialmente con el rendimiento y la calidad de la leche (Rychtářová et al., 2014). Los genes candidatos relacionados con los rasgos de producción de leche, que se heredan poligénicamente, se pueden encontrar en las vías de síntesis y metabolismo de las grasas. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) alfaS1-caseína (CSN1S1), alfaS2-caseína (CSN1S2) y diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) se ha demostrado que afectan la producción de leche bovina y los rasgos de composición en diferentes poblaciones de ganado (Kucerova et al., 2006; Khatib et al., 2007; Schennink et al., 2007). El gen DGAT1, K232A (rs109234250) genera dos variantes alélicas alelo A alanina en ubicación 232 del polipéptido y alelo K, lisina en la misma posición (Armstrong et al., 2011) Este gen se asocia con incremento en la concentración de ácidos grasos en leche y perfil de ácidos grasos insaturados en bovinos y en caprinos, así como el marmoleo en ganado de carne, principalmente en *Bos taurus* (Demeter et al., 2009; Armstrong et al., 2011). Igualmente, la hormona del crecimiento (GH) afecta directa o indirectamente numerosos aspectos de la lactancia animal, el crecimiento y la reproducción.

Un papel significativo de la GH durante la lactancia queda demostrado por el aumento de 10% a 15% en el rendimiento de la leche que ocurre en las vacas lecheras tratadas con GH recombinante bovina (Bauman, 1999). El polimorfismo más conocido de GH1 es la sustitución de leucina a valina en la posición 127 en el exón 5. Además, Lucy et al. (1993) reportaron las diferentes frecuencias de alelos GH1L y GH1V en las principales razas lecheras, y la correlación de las variantes genéticas con las estimaciones de la producción de leche en las vacas. Por otro lado, muchos estudios individuales en diferentes poblaciones de ganado lechero han propuesto el ABCG2 (ATP-binding cassette G2, por sus siglas en inglés) como el gen candidato para la producción de leche, adyacente al



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Locus de Rasgos Cuantitativos (Quantitative Traits Loci) en el cromosoma 6 bovino, y es un gen candidato por su supuesto papel fisiológico en este rasgo de interés (Wayne y McIntyre, 2002; Khatkar et al., 2004; Yue et al., 2010). Se han identificado varios SNP en el gen ABCG2, de los cuales el más importante es una sustitución de A a C en el exón 14, causando un cambio de aminoácido no conservador (Y581S) de tirosina a serina que puede afectar la función transportadora de este gen (Cohen-Zinder et al., 2005; Olsen et al., 2005). Basado en datos de mapeo previos en ganado rojo noruego, este SNP del ABCG2, fue reportado por primera vez por Olsen et al. (2005). La fracción proteica del suero de la leche bovina se compone principalmente de  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA, codificada por LALBA) y b-lactoglobulina (b-LG, codificada por LGB) que representan el 20% y el 50% de las proteínas de suero respectivamente. La  $\alpha$ -LA juega un papel importante como componente regulador del complejo de lactosa sintasa al modular la actividad de la 1,4-galactosiltransferasa (Ramakrishnan y Qasba, 2001). Hace varios años que se conocen tres variantes (A, B y C) de la proteína  $\alpha$ -LA (Bhattacharya et al., 1963; Bell et al., 1981), pero solo dos, LAA \* A y LAA \* B, tienen sus secuencias codificantes confirmadas a nivel de ADN. Se ha reportado que el gen LALBA bovino, mapeado en el cromosoma 5 también es un gen relacionado a la producción y composición de leche (Penagaricano y Khatib, 2012). El objetivo de este trabajo fue evaluar seis polimorfismos de nucleótido simple asociados a la calidad de leche, DGAT1, CSN1S1, CSN1S2, LALBA, GH1 y ABCG2 en algunos genotipos criollos y transfronterizos mediante secuenciación NGS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinó el polimorfismo y la variabilidad genética de seis marcadores SNP asociados a calidad de leche DGAT1, CSN1S1, CSN1S2, LALBA, GH1 y ABCG2 mediante secuenciación NGS. El polimorfismo del diacilglicerol aciltransferasa 1, DGAT1, (g.1802265A>G) se encuentra ubicado en el cromosoma 14 del genoma bovino, el de las caseínas,  $\alpha$ S1-caseína CSN1S1 (g. 87157909A>G) y  $\alpha$ S2-caseína CSN1S2 (g.87266177T>C) en el cromosoma 6, la  $\alpha$ -lactalbúmina, LALBA (g.31348380A>C) en el cromosoma 5, la GH1 (g.48768774A>G) en el cromosoma 19 y la ATP-binding cassette G2, ABCG2 (g. 38027010C>A) en el cromosoma 6 (Genome Data Viewer versión 4.7.1).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Se tomaron muestras aleatorias de 73 animales de diversos genotipos puros, Criollos (Guaymí, GUY y Guabalá, GUA) transfronterizos (Brahman, BRAH; Holstein, HO y Senepol, SEN) y cruzados (europeo x cebú, EXC e Indefinidos, SRD). Se obtuvieron muestras de sangre en finca de productores colaboradores y en fincas ganaderas del IDIAP, utilizando tubos con EDTA de 5ml. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante mini columnas por centrifugación utilizando un kit comercial; el rendimiento de ADN obtenido fue no menor a 50 ng, medido a través de un cuantificador fluorométrico. El análisis de los SNP se realizó mediante el panel reducido de secuenciación *Truseq Bovine Parentage*, obtenido a partir de un chip de ADN, BovineSNP50 (Matukumalli et al., 2009). La preparación de librerías se realizó siguiendo el flujo de trabajo del fabricante. Una vez amplificadas y normalizadas las librerías, se verificó la calidad mediante un analizador de fragmentos, resultando en un tamaño esperado entre 200 y 300 bp. Luego se procedió a secuenciarlas utilizando la metodología de amplificación en puente y secuenciación por síntesis en un equipo MISEQ™. Los datos fueron exportados al programa Sequence Genotyper para su procesamiento y análisis. Para evaluar la variabilidad genética dentro de cada población, se calcularon los siguientes parámetros: Equilibrio Hardy-Weinberg, Frecuencia alélica y genotípica, heterocigosis observada (Hob) y esperada (He) e Índice de Shannon mediante el programa Genetix v. 4.02 y Genalex 6.5 (Belkhir et al., 2003; Peakall y Smouse, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media de variabilidad genética para los marcadores relacionados a producción de leche se puede observar en el Cuadro 1. Los marcadores GH1, LALBA y ABCG2 resultaron monomórficos dentro de este estudio. Los marcadores que mostraron ser más informativos fueron DGAT1, CSN1S1 y CSN1S2, siendo el marcador DGAT1 el que presentó mayores valores de Hob y He con valores de 0,424 y 0,430 respectivamente y los valores más bajos para Hob y He se observaron en CSN1S2 con 0,247 y 0,276 respectivamente, estos valores son ligeramente distintos a los reportados por Edea et al. (2013) en ganado localmente adaptado en Etiopía quienes reportan valores de Hob mínimos y máximos de 0,363 y 0,415 y He mínimos y máximos de 0,370 y 0,410 respectivamente. Estos valores de diversidad son importantes debido a que permite una estimación de la capacidad de adaptación a las variaciones climáticas (Notter, 1999). En



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

el cuanto a la raza Guaymí, tres marcadores presentaron valores de diversidad altos DGAT1 (Hob =0,412; He=0,438), CSN1S1 (Hob=0,647; He=0,500) y CSN1S2 (Hob =0,412; He=0,327). La Guabalá presentó dos marcadores, DGAT1 (Hob =0,600; He=0,480) y CSN1S1 (Hob =0,300; He=0,255) al igual que la raza Senepol, DGAT1 (Hob =0,600; He=0,420), CSN1S1 (Hob =0,600; He=0,420) lo que permitiría desarrollar programas de mejoramiento en estas poblaciones.

La media general del índice de Shannon en todos los marcadores fue (I=0,237), mayor a lo reportado por Pashaei et al. (2009) en la raza Holstein (I=0,110) y la raza nativa Mazarandanian de Pakistan (0,210). Según la prueba de Chi-cuadrado, las frecuencias genotípicas de DGAT1 y CSN1S1 están fuera del desequilibrio de Hardy Weinberg (HWE)  $p>0,05$ , indicando que la presión de selección en ambos marcadores es baja, El marcador CSN1S2 mostró no ser consistente con HWE ( $p<0,05$ ).

**Cuadro 1. Media de Índice de Shannon (I), Heterocigosis observada (Hob) y Heterocigosis esperada (He) y HWE de marcadores asociados a producción de leche.**

Marcador	I	Hob	He	HWE
DGAT1	0,586	0,424	0,430	ns
GH1	0,022	0,010	0,010	...
LALBA	0,000	0,000	0,000	...
ABCG2	0,000	0,000	0,000	...
CSN1S1	0,424	0,342	0,293	ns
CSN1S2	0,390	0,247	0,276	*
Media	0,237	0,171	0,158	*

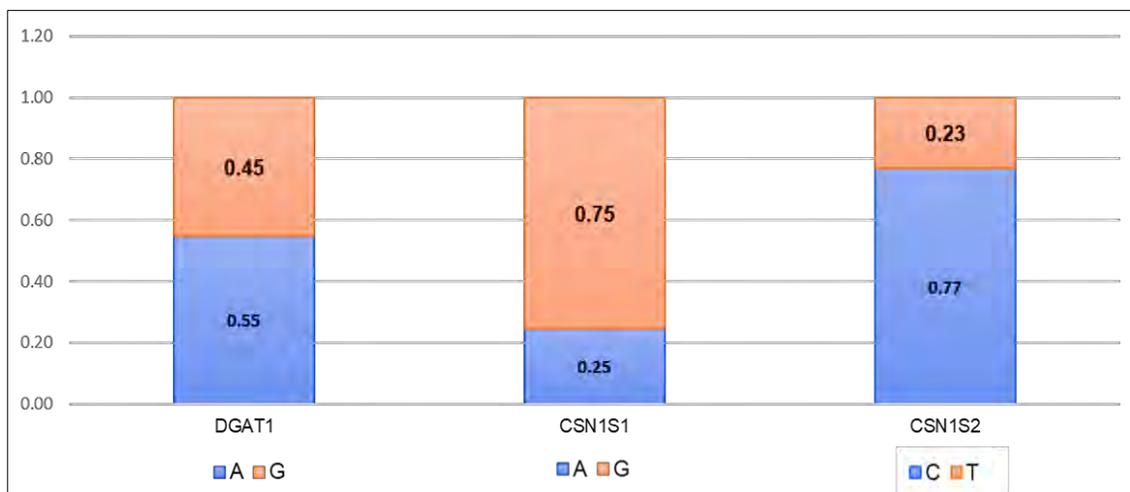
\*: significativa; ns: no significativa

En ninguno de los genotipos se observó polimorfismo, para el LALBA con 100% de presencia del SNP de referencia C. Tampoco se observó en GH1, a excepción de los genotipos SRD, con una frecuencia alélica de A = 0,036 y G = 0,964 y frecuencia genotípica de AA=0,001, AG=0,0694 y GG= 0,929. No se observó polimorfismo para ABCG2 con 100%, de presencia del alelo C en todos los genotipos a excepción de GUA con 100% de alelo A. La raza HO presentó 100% de presencia de alelo G para los marcadores de CSN1S1 y CSN1S2 y la raza GUA con 100% de alelo C en CSN1S2. La Figura 1 muestra las frecuencias génicas globales para los tres marcadores polimórficos DGTA1, CSN1S1 y



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

CSN1S2. En este resultado se observa que las frecuencias más altas son la de los alelos C de CSN1S2, con 0,77 y G de CSN1S1 con 0,75. Para el marcador del DGAT1 el alelo predominante fue A= 0,55.



**Figura 1. Frecuencias génicas globales para los marcadores polimórficos DGAT1, CSN1S1 y CSN1S2.**

Las frecuencias genotípicas globales por marcador fueron, para DGAT1, AA=0,300, AG=0,495 y GG=0,204; CSN1S1, AA=0,061, AG=0,372 y GG=0,568 y CSN1S2, CC=0,588, CT=0,357 y TT=0,054. En cuanto a la frecuencia génica por marcador y población, en el Cuadro 2 se presentan los valores de las frecuencias por genotipo.

**Cuadro 2. Frecuencia alélica y genotípica del SNP DGAT1, CSN1S1 y CSN1S2 de seis distintos genotipos.**

Marcador	DGAT1		CSN1S1		CSN1S2	
	A	G	A	G	C	T
<b>BRAH</b>	<b>0,900</b>	0,100	0,300	0,700	0,567	<b>0,433</b>
<b>HO</b>	0,300	<b>0,700</b>	0,000	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	0,000
<b>SEN</b>	0,300	<b>0,700</b>	0,300	0,700	0,900	0,100
<b>GUY</b>	0,324	0,676	<b>0,500</b>	0,500	0,794	0,206
<b>GUA</b>	0,400	0,600	0,150	0,850	<b>1,000</b>	0,000
<b>E X C</b>	0,500	0,500	0,083	0,917	0,750	0,250
<b>SRD</b>	0,750	0,250	0,107	0,893	0,643	0,357



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

El genotipo con mayor frecuencia de alelo A en DGTA1 fue BRAH A = 0,900 y para G las mayores fueron la HO y SEN con G = 0,700 y de manera recíproca fueron los valores más bajos para los alelos correspondientes. Para el CSN1S1 el genotipo con mayor frecuencia para el alelo A, fue GUY A = 0,500 y para G la mayor fue HO G = 1,000. En el caso de la caseína CSN1S2, HO y GUA fueron las poblaciones con mayores valores de C = 1,000 y BRAH mostró los mayores valores para el alelo T=0,433. Las frecuencias de alelos del gen DGAT1 observados en BRAH son similares a los reportados por Casas et al. (2005) quienes observaron una baja frecuencia del alelo G =0,100, relacionado a incremento de producción de leche, grasa, proteína, contenido de grasa y proteína (Grisart et al. (2004). Contrariamente a lo observado en razas HO, SEN, GUY, GUA (*Bos taurus*) dentro de este estudio, la frecuencia de alelos de G fue alta (0,600 a 0,700) y similar a los valores reportados por Hradecka et al. (2008) y Armstrong et al. (2011) en raza Holstein Alemana y Razas criollas de Uruguay. Las caseínas CSN1S1 y CSN1S2 se encuentran ubicadas en el cromosoma 6 (BTA6) que está relacionado al mayor QTL para la producción de leche en bovino (Olsen et al., 2007). Además, forma parte del 95% de los genes que codifican las proteínas de la leche (Penagaricano y Khatib, 2012). Los valores de frecuencia alélica de CSN1S1 analizados fueron distintos a los reportados por Ardicli et al. (2019) en seis razas bovinas (Borgou, Brown Swiss, Carora, Holstein-Friesian, Reggiana, Somba, y Sudanese Zebu Peucon) con valores de A=0,95 y G=0,05. Igualmente, los valores de frecuencia alélica de CSN1S2 fueron distintos a los reportados en este trabajo con C=0,99 y T=0,01, considerados de bajo polimorfismo. Meier et al. (2019) reportan fijación de alelos con valores de CSN1S1 de A=1,000 y CSN1S2 C=1,000 en la raza "German Black Pied Cattle". Los valores de C para la CSN1S2 se encuentran fijos al igual que la HO y la GUA, seguidos por la SEN C=0,900 y GUY C=0,794. En BRAH resultaron mucho menor C=0,567. Estos resultados apuntan que los marcadores polimórficos encontrados pueden ser de utilidad en los programas de mejoramiento sumando a la selección cuantitativa, sin embargo, se requiere un mayor análisis, incrementando el número de animales y razas.

## CONCLUSIONES

- Se determinó el polimorfismo en los marcadores DGAT1, CSN1S1 y CSN1S2, en los genotipos sometidos al presente estudio, sin embargo, se observó fijación de alelos en las razas Holstein y Guabalá. No se observó polimorfismo en los marcadores GH1,



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

LALBA y ABCG2 en ninguno de los genotipos puros ni cruzados. La raza Guabalá mostró una fijación del alelo A en ABCG2, situación totalmente contraria en el resto de los genotipos estudiados.

### REFERENCIAS

- Armstrong, E.F., Peñagaricano, R., Artigas, L., De Soto, C., Corbi, S., Llambí, G., Rincón, G., y Postiglioni, A. (2011). Marcadores moleculares asociados al veteado de la carne en bovinos Criollos uruguayos. *Arch. Zootec.* 60(231), 707–716.
- Bauman, D.E. (1999). Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17, 101–116.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., y Bonhomme, F. (2003). Genetix: 4.05 Logiciel sous Windows™ pour la genetique des populations., In U. d. Montpellier, (ed.), 4.05 ed. Laboratoire Genoma Populations, Interactions, Adaptations, Montpellier, France.
- Bell, K., Hopper, K.E., y McKenzie, H.A. (1981). Bovine alphas<sub>1</sub>-casein and alpha<sub>2</sub>-caseins, beta-caseins and kappa-caseins of Bali (Banteng) cattle, *Bos (Bubalus) javanicus*. *Australian Journal of Biological Sciences* 34, 149–59.
- Bhattacharya, S.D., Sen, A., Roychoudhury, A.K., y Sinha, N.K. (1963). Inherited alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin polymorphism in Indian zebu cattle - comparison of zebu and buffalo alphas<sub>1</sub>-albumins. *Nature* 197, 797–9.
- Brookes, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234(2), 177-186.
- Cohen-Zinder, M., Seroussi, E., Larkin, D.M., Lior, J.J., Everts-van der Wind, A., Lee, J.H., Drackley, J.K., Band, M.R., Hernandez, A.G., Shani, M., Lewin, H.A., Weller, J.I., y Ron, M. (2005). Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res.* 15 (7), 936-944.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- Demeter, R.M., Schopen, G.C.B., Oude Lansink, A.G.J.M., Meuwissen, M.P.M., y van Arendonk, J.A.M. (2009). Effects of milk fat composition, DGAT1, and SCD1 on fertility traits in Dutch Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 92(11), 5720–5729.
- Edea, Z., Dadi, H., Kim S.W., Dessie, T., Lee, T., Kim, H., Kim, J.J., y Kim, K.S. (2013). Genetic diversity, population structure and relationships in indigenous cattle populations of Ethiopia and Korean Hanwoo breeds using SNP markers. *Front. Genet.* 4, 35. doi:10.3389/fgene.2013.00035.
- Frkonja, A., Gredler, B., Schnyder, U., Curik, I., y Sölkner, J. (2012). Prediction of breed composition in an admixed cattle population. *Animal Genet.* 43, 696–703.
- Heaton, M.P., Harhay, G.P., Bennett, G.L., Stone, R.T., Grosse, W.M., Casas, E., Keele, J.W., Smith, T.P., Chitko-McKown, C.G., y Laegreid, W.W. (2002). Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mamm Genome* 13, 272-281.
- Hulsegge, B., Calus, M.P.L., Windig, J.J., Hoving-Bolink, A.H., Maurice-van Eijndhoven, M.H.T., y Hiemstra, S.J. (2013). Selection of SNP from 50 K and 777 K arrays to predict breed of origin in cattle. *J. Animal Sci.* 91, 5128–5134.
- Khatkar, M.S., Thomson, P.C., Tammen, I., y Raadsma, H.W. (2004). Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet. Sel. Evol.* 36, 163-190.
- Khatib, H., Rosa, G., Weigel, K., Schiavini, F., Santus, E., y Bagnato, A. (2007). Additional support for an association between OLR1 and milk fat traits in cattle. *Animal Genetics* 38, 308-310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01584.x>
- Kucerova, J., Matejicek, A., Jandurova, O., Sorensen, P., Nemcova, E., Stipkova, M., Kott, T., Bouska, J., y Frelich, J. (2006). Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science* 51, 241-247. <https://doi.org/10.17221/3935-CJAS>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- Lucy, M.C., Hauser, S.D., Eppard, P.J., Krivi, G.G., Clark, J.H., Bauman, D.E., y Collier, R.J. (1993). Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domest. Anim. Endocrinol.* 10, 325–333.
- Matukumalli, L.K., Lawley, C.T., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., Allan, M.F., Heaton, M.P., O'Connell, J., Moore, S.S., Smith, T.P.L., Sonstegard, T.S., y Van Tassell, C.P. (2009). Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS ONE* 4 (4), e5350.
- Notter, D.R. (1999). The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J. Anim.Sci.* 80,1776–1785
- Olsen, H.G., Lien, S., Gautier, M., Nilsen, H., Roseth, A., Berg, P.R., Sundsaasen, K.K., Svendsen, M., y Meuwissen, T.H.E. (2005). Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genetics.* 169, 275.
- Olsen, H.G., Nilsen, H., Hayes, B., Berg, P.R., Svendsen, M., Lien, S., y Meuwissen, T. (2007). Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the ABCG2 gene affecting milk composition of dairy cattle. *BMC Genet.* 8, 32-40.
- Pashaei, S., Azari, M.A., Hasani, S., Khanahmadi, A., y Rostamzadeh, J. (2009). Genetic diversity in Mazandaranian native cattle: A comparison with Holstein cattle, using ISSR marker. *Pakistan Journal of Biological Science.* 12(9), 717-721.
- Peakall, R., y Smouse, P.E. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Penagaricano, F., y Khatib, H. (2012). Association of milk protein genes with fertilization rate and early embryonic development in Holstein dairy cattle. *J. Dairy Res.* 79, 47-52.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- Ramakrishnan, B., y Qasba, P.K. (2001). Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the b1,4-galactosyltransferase-I. *Journal of Molecular Biology* 310, 205–18.
- Rychtářová, J., Sztankóová, Z., Kyselová, J., Zink, V., Štípková, M., Vacek, M., y Štolc, L. (2014). Effect of DGAT1, BTN1A1, OLR1, and STAT1 genes on milk production and reproduction traits in the Czech Fleckvieh breed. *Czech Journal of Animal Science* 59, 45-53. <https://doi.org/10.17221/7228-CJAS>
- Sachidanandam, R.D., Weissman, S.C., Schmidt, J.M., Kakol, L.D., Stein, G., Marth, S., Sherry, J.C., Mullikin, B.J., y Mortimore Willey, D.L. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409(6822), 928-933.
- Schennink, A., Stoop, W.M., Visker, M.W., Heck, J.M., Bovenhuis, H., Poel, J.J., Van Valenberg, H.J., y Van Arendonk, J.A. (2007). DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Animal Genetics* 38, 467-473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01635.x>
- Vignal, A., Milan, D., San Cristobal, M., y Eggen, A. (2002). A review on SNP and other molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 43, 275-305.
- Wayne, M.L., y McIntyre, L.M. (2002). Combining mapping and arraying: an approach to candidate gene identification. *Proc Nat Acad Sci.* 99, 14903.
- Yue, W., Fang, X., Zhang, C., Pang, Y., Xu, H., Gu, C., Shao, R., Lei, C., y Chen, H. (2010). Two novel SNPs of the ABCG2 gene and its associations with milk traits in Chinese Holsteins. *Mol Biol Rep.* 38, 2927-2932.

### AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), al igual que al Sistema Nacional de Investigación (SNI), por el financiamiento del presente trabajo.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## MODELOS MIXTOS PARA ANALIZAR EXPERIMENTOS AGROPECUARIOS DE TRES FACTORES CON UN PROGRAMA ESTADÍSTICO<sup>1</sup>

*Pedro Guerra-Martínez<sup>2</sup>*

### RESUMEN

El PROC GLM de SAS® es el procedimiento más utilizado en el análisis de varianza en la investigación agropecuaria, pero fue diseñado para modelos fijos. El objetivo fue capacitar a los usuarios de SAS® en el uso de modelos mixtos en el análisis de experimentos agropecuarios de tres factores. Se tomaron datos de la literatura y se analizaron por el PROC GLM (modelo fijo y mixto) y PROC MIXED. Tres factores y sus interacciones fueron: Leguminosa (V), Fósforo (P) y Control de Malezas (W). El diseño fue de Bloques Completos al Azar (BCA de tres bloques, BLK) y la variable de respuesta fue rendimiento de semilla (kg/parcela). Se presentan las rutinas de PROC GLM para modelos fijos y mixtos y PROC MIXED. Bajo los modelos mixtos, V y P fueron efectos fijos y W aleatorio. Los grados de libertad fueron ajustados por Satterthwaite. Con PROC GLM modelo fijo, BLK, V\*W y P\*W fueron  $p < 0,01$  y con el modelo mixto solo BLK, pero los Valores-F fueron menores. Las varianzas de W y V\*P\*W fueron -0,59 y -0,22, respectivamente. Con PROC MIXED ninguna fuente de variación resultó  $p < 0,05$  (pruebas F y Z de Wald). La varianza de W fue cero y de V\*W y P\*W resultaron menores. Los errores estándares (EE) de V y V\*P fueron mayores con PROC MIXED y de los efectos aleatorios fueron iguales en todos los procedimientos. Se concluye que el PROC MIXED proporciona adecuada prueba de hipótesis y EE de medias, por lo que se recomienda su utilización.

**Palabras clave:** Análisis de varianza, efectos fijos y mixtos, errores estándares, bloques completos al azar, experimento factorial.

<sup>1</sup> Recepción: 21 de diciembre de 2020. Aceptación: 7 de mayo de 2021. Dirección Nacional de Recursos Genéticos y Biodiversidad. Proyecto de Investigación-Innovación en Mejoramiento Genético Aplicado en Hatos de los Sistemas Ganaderos Familiares Bovinos de Panamá. Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).

<sup>2</sup> IDIAP, Centro de Innovación Agropecuaria de Chiriquí, Estación Experimental de Gualaca "Carlos M. Ortega". M.Sc. Mejoramiento Genético Animal. e-mail: [pedroguerram16@gmail.com](mailto:pedroguerram16@gmail.com)



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## MIXED MODELS FOR ANALIZING THREE FACTORS AGRICULTURAL EXPERIMENTS WITH A STATISTICAL SOFTWARE

### ABSTRACT

PROC GLM of SAS® is the most used procedure for the analysis of variance in agricultural research, but it was designed for fixed models. The objective of this work was to capacitate SAS®'s users on the use of mixed models for the analysis of three factors agricultural experiments. Data came from literature and were analyzed by PROC GLM (fixed and random models) and PROC MIXED. Three factors and their interactions were: Legume (V), Phosphorus (P) and Weed Control (W). The design was CRB (three blocks, BLK) and the response variable was seed-yield (kg/plot). Routines of PROC GLM for fixed and mixed models and PROC MIXED were presented. Under mixed models, V and P were fixed and W was random effect. Degree of freedoms were adjusted by Satterthwaite procedure. With PROC GLM fixed model, BLK, V\*W and P\*W were  $p < 0,01$  and with mixed model only was BLK, but F-Values were minors. W and V\*P\*W variances were -0,59 and -0,22, respectively. With PROC MIXED, no one source of variation was  $p < 0,05$  (F and Z Wald Test). W variance was zero while V\*W and P\*W variances were minors. V and V\*P standard errors (SE) were higher with PROC MIXED and were equal for random effects in all procedures. It was concluded that PROC MIXED gives adequate hypothesis test and SE of mean, so its utilization is recommended.

**Key words:** Analysis of variance, random and fixed effects, standard errors, completed random blocks.

### INTRODUCCIÓN

Frecuentemente en la experimentación agropecuaria se le presta poca importancia a determinar la presencia o no de factores fijos y aleatorios<sup>3</sup> en un experimento cruzado clasificado como el experimento factorial. Estos experimentos factoriales son analizados con PROC GLM de SAS® en la forma tradicional asumiendo un modelo de efectos fijos. Sin embargo, al tomar en cuenta la naturaleza de los factores, alguno de ellos resulta ser aleatorios y otros fijos cambiando el error experimental a ser usado en la prueba de hipótesis, lo que lleva al experimentador a expresar conclusiones erradas.

<sup>3</sup> Efectos aleatorios: aquellos efectos que supuestamente son tomados al azar de una población de posibles niveles. Efectos fijos: aquellos que son determinados a propósito y que no representan a otros sino a ellos mismos (Correa-Morales y Salazar-Urbe, 2016).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Generalmente, los experimentos factoriales son analizados con el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS® asumiendo un modelo de efectos fijos para facilitar el análisis. Sin embargo, Yang (2008) y Yang (2010) indica que al no tomar en cuenta esta situación, el PROC GLM brinda incorrecto denominador para la prueba-F, error estándar de los tratamientos y asume que todos los tratamientos tienen error idéntico y tales errores no están correlacionados. Sin embargo, autores como Gil (2001), Yang (2008) y Yang (2010) han reportados la situación antes mencionada y toman como ejemplo el diseño de parcelas divididas y comparan los análisis utilizando el PROC GLM *versus* PROC MIXED del paquete estadístico SAS®. Ambos autores, para modelos mixtos, recomiendan el PROC MIXED junto con técnicas que toman en cuenta el desbalance de datos y ajustes de los grados de libertad. El procedimiento recomendado proporciona los errores estándares adecuados a cada nivel de análisis, realizando las comparaciones de media en la forma correcta. Por otra parte, Yang (2008) señala que, si los efectos aleatorios verdaderos son pequeños y/o el tamaño de muestras es pequeño, los estimados de varianza negativos pueden ser obtenidos usando PROC GLM. Sin embargo, cualquier varianza por definición no debe ser menor a cero y que los estimados negativos no tienen significado. Con el REML (máxima verosimilitud restringida), el defecto de PROC MIXED establece el estimado negativo de varianza a cero independiente si los datos son balanceados o no. Esto guía a diferentes pruebas-F de los mismos efectos fijos. Agrega que dada (i) la dificultad de reportar varianzas negativas y (ii) errores estándares de la media y comparaciones de media obtenidas de PROC GLM, el uso de PROC MIXED es verdaderamente el preferido. Además, con PROC MIXED solamente se llevarían a cabo las pruebas-F para los efectos fijos para evaluar si las medias de tratamientos son diferentes, mientras que para los efectos aleatorios se utilizaría la prueba Z de Wald o la prueba Chi-Cuadrado de la Razón de Verosimilitud (Likelihood Ratio). Así con el PROC MIXED provee inferencias correctas acerca de efectos fijos y aleatorios, pero el uso de PROC GLM no (Yang, 2008; Yang, 2010).

Por otra parte, para la estimación de parámetros genéticos, Lowry (1983) ha propuesto una serie de reglas para escribir los parámetros estimados en el análisis de varianza tomando en cuenta un modelo mixto. Para este caso, Lowry (1983) indica tres reglas básicas en la estimación de los parámetros de los efectos: (1) la interacción de un



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

efecto fijo con otro efecto fijo no debe aparecer en la estimación del parámetro del efecto principal fijo (Modelo I Efectos Fijos), (2) la interacción de efectos aleatorios deben aparecer en la estimación de parámetros de cada efecto aleatorio (Modelo II Efectos Aleatorios), y (3) la interacción de un efecto fijo con un efecto aleatorio debe aparecer en la estimación del parámetro del efecto fijo, pero no debe aparecer en la estimación del parámetro del efecto aleatorio (Modelo Mixto).

Para los usuarios del SAS®, el presente trabajo tuvo como objetivo capacitar al usuario de SAS® en el uso de modelos mixtos en el análisis de experimentos factoriales (cruzados clasificados) de tres factores de datos provenientes de la experimentación agropecuaria.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Datos utilizados:** el conjunto de datos utilizados como ejemplo provienen de Kling (2004) del curso de Experimental Design in Agriculture of Oregon State University, USA (Cuadro 1) de un experimento factorial (tres factores) en un diseño de bloques completos al azar (BCA).

**Cuadro 1. Producción de semilla (kg/parcela) de dos variedades de leguminosa forrajera (V) con tres niveles de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (kg/ha) (P) y con y sin control de malezas (W).**

Combinación de tratamientos	Bloques			Totales
	Bloque I	Bloque II	Bloque III	
V1P1W1	61	58	55	174
V1P1W2	56	45	43	144
V1P2W1	60	59	54	173
V1P2W2	60	50	45	155
V1P3W1	59	55	51	165
V1P3W2	66	57	50	173
V2P1W1	65	61	60	186
V2P1W2	60	61	50	171
V2P2W1	60	58	56	174
V2P2W2	62	68	67	197
V2P3W1	53	53	48	154
V2P3W2	73	57	77	207
Totales	735	682	656	2073

V= Red Clover (V1) y Sweet Clover (V2); P= 0, 25 y 50 kg/ha P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; W= Sin control (W1) y con control (W2) de malezas. Fuente: Kling (2004).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

**Análisis original de los datos experimentales:** Los datos fueron analizados mediante el PROC GLM de SAS®. El diseño experimental usado por Kling (2004) fue el BCA en un arreglo factorial en donde el bloqueo consistió en el agrupamiento de las parcelas o unidades experimentales, a las cuales se aplicaron los tratamientos o efectos a estudiar en bloques para disminuir los efectos que puede causar una fuente de variación externa a los tratamientos dentro de las unidades experimentales y que distorsionen sus resultados e inferencias en caso de omitirlos. De acuerdo con Salazar-Guerrero (sf) y Steel y Torrie (1980), los bloques son grupos de unidades que se forman de tal manera que ellas dentro de los bloques sean tan homogéneas como sea posible.

Por otro lado, Steel y Torrie (1980) indican que en un experimento factorial, una interacción significativa puede causar la pérdida del interés en probar hipótesis concernientes a los efectos principales y llegar a estar más interesado en otras pruebas como las de los efectos simples y llegar a la mejor interpretación satisfactoria de los resultados. Sin embargo, en un modelo mixto, podría no ser de interés los efectos simples para un efecto fijo, ya que ellos serán medidos en niveles selectos aleatoriamente de otro factor y así serían valores de una variable aleatoria.

**Modelo matemático del experimento factorial:** el modelo matemático para el experimento factorial con tres factores de Kling (2004) describe los efectos de V (Variedad), P (Nivel de fósforo) y W (Control de malezas) y es el siguiente:

$$Y_{ijklm} = \mu + \rho_i + \alpha_j + \beta_k + \gamma_l + (\alpha\beta)_{jk} + (\alpha\gamma)_{jl} + (\beta\gamma)_{kl} + (\alpha\beta\gamma)_{jkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

Donde:

$Y_{ijklm}$  = es la m-ésima observación en el i-ésimo bloque, j-ésimo nivel del factor  $\alpha$ , k-ésimo nivel del factor  $\beta$  y l-ésimo factor  $\gamma$ .

$\mu$  = media general,

$\rho_i$  = efecto del i-ésimo bloque,

$\alpha_j$  = efecto del j-ésimo nivel del factor variedad,

$\beta_k$  = efecto del k-ésimo nivel del factor fósforo,



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

$\gamma_l$  = efecto del l-ésimo nivel del factor control de malezas,

$(\alpha\beta)_{jk}$  = efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel de variedad con el k-ésimo nivel del factor fosforo,

$(\alpha\gamma)_{jl}$  = es el efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel de variedad con el l-ésimo nivel de control de malezas,

$(\beta\gamma)_{kl}$  = es el efecto de la interacción entre el k-ésimo nivel del factor fósforo con el l-ésimo nivel del factor control de malezas,

$(\alpha\beta\gamma)_{jkl}$  = es el efecto de la triple interacción entre el j-ésimo nivel de variedad, k-ésimo nivel del factor fósforo y l-ésimo nivel del factor control de malezas,

$\varepsilon_{ijklm}$  = es el error aleatorio ( $\sim NID, \mu=0, \sigma^2=1$ ).

Tradicionalmente, el modelo lineal mixto generalizado se escribe en forma de matrices de la siguiente manera (Lair y Ware, 1982):

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\beta + \mathbf{Z}\omega + \varepsilon$$

Donde:

$y$  = vector de observaciones o respuestas,

$\beta$  = vector de parámetros de efectos fijos desconocidos,

$X$ =matriz de incidencia que relaciona las observaciones fenotípicas con el vector  $\beta$  de efectos fijos (V y P),

$\omega$  = vector de parámetros de efectos aleatorios desconocidos,

$Z$  = matriz de incidencia que relaciona las observaciones fenotípicas con el vector  $\omega$  de efectos aleatorios (W),

$\varepsilon$  = vector de errores aleatorios residuales, normal e independientemente distribuidos.

Este procedimiento está basado en determinaciones probabilísticas máximas o restringidas de modelos lineales estadísticos que contemplan términos fijos y aleatorios. Los errores estándar (EE) fueron derivados del diseño experimental, fuentes de variación asumidas y sus componentes de varianza (Littell et al., 2006). Los EE para PROC GLM y PROC MIXED fueron calculados con la instrucción LSMEANS/STDERR;



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

**Representación de las Expectativas de los Cuadrados Medios del modelo fijo y aleatorios:** los promedios o valores esperados de los cuadrados medios en un experimento de tres factores fijos, en un diseño de bloques completos al azar para el modelo fijo están dados en el Cuadro 2 (Steel y Torrie, 1980). Las letras mayúsculas en la columna de Fuente de Variación se refieren a los efectos principales e interacciones y las letras minúsculas, en la columna de los grados de libertad, se refieren a los números de los niveles de los efectos designados por la correspondiente letra mayúscula. Por otra parte, las letras griegas, en la columna de las esperanzas de los cuadrados medios, se refieren a componentes de varianzas de cada efecto e interacción.

**Cuadro 2. Valores esperados de los cuadrados medios (ECM) con el modelo fijo para experimentos factoriales de tres-factores.**

F de V	gl	Valores Esperados de los Cuadrados Medios (CM)	
		Modelo I (Fijo)	Modelo II (Aleatorio)
Bloque	r-1	$\sigma^2 + abc \sum p^2 / (r-1)$	$\sigma^2 + abc \sigma_p^2$
V	a-1	$\sigma^2 + rbc \sum \alpha^2 / (a-1)$	$\sigma^2 + r \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2 + rc \sigma_{\alpha\beta}^2 + rb \sigma_{\alpha\gamma}^2 + rbc \sigma_{\alpha}^2$
P	b-1	$\sigma^2 + rac \sum \beta^2 / (b-1)$	$\sigma^2 + r \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2 + rc \sigma_{\alpha\beta}^2 + ra \sigma_{\beta\gamma}^2 + rac \sigma_{\beta}^2$
W	c-1	$\sigma^2 + rab \sum \gamma^2 / (c-1)$	$\sigma^2 + r \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2 + rb \sigma_{\alpha\gamma}^2 + ra \sigma_{\beta\gamma}^2 + rac \sigma_{\gamma}^2$
V*P	(a-1)(b-1)	$\sigma^2 + rc \sum (\alpha\beta)^2 / (a-1)(b-1)$	$\sigma^2 + r \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2 + rc \sigma_{\alpha\beta}^2$
V*W	(a-1)(c-1)	$\sigma^2 + rb \sum (\alpha\gamma)^2 / (a-1)(c-1)$	$\sigma^2 + r \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2 + rb \sigma_{\alpha\gamma}^2$
P*W	(b-1)(c-1)	$\sigma^2 + ra \sum (\beta\gamma)^2 / (b-1)(c-1)$	$\sigma^2 + r \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2 + rb \sigma_{\beta\gamma}^2$
V*P*W	(a-1)(b-1)(c-1)	$\sigma^2 + r \sum (\alpha\beta\gamma)^2 / (a-1)(b-1)(c-1)$	$\sigma^2 + r \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2$
Error Residual	(r-1)(abc-1)	$\sigma^2$	$\sigma^2$

Fuente: Steel y Torrie, 1980.

Los elementos  $\sigma^2$ ,  $\sum \alpha^2$ ,  $\sum \beta^2$ ,  $\sum \gamma^2$ ,  $\sum (\alpha\beta)^2$ ,  $\sum (\alpha\gamma)^2$ ,  $\sum (\beta\gamma)^2$ ,  $\sum (\alpha\beta\gamma)^2$ ,  $\sigma_{\alpha}^2$ ,  $\sigma_{\beta}^2$ ,  $\sigma_{\gamma}^2$ ,  $\sigma_{\alpha\beta}^2$ ,  $\sigma_{\alpha\gamma}^2$ ,  $\sigma_{\beta\gamma}^2$ , y  $\sigma_{\alpha\beta\gamma}^2$  son los componentes de varianza para el modelo fijo. Estos componentes en los efectos aleatorios son importantes estimarlos para los cálculos de los parámetros genéticos como heredabilidades y correlaciones genéticas. En la mayoría de los experimentos agropecuarios se asume que los efectos son todos fijos en el modelo matemático utilizado. De ser así, en este caso (Modelo I) se observa que la varianza del error ( $\sigma^2$ ) es un término apropiado para probar hipótesis de cualquier fuente de variación en el análisis de varianza (Steel y Torrie, 1980). Pero para el modelo aleatorio (Modelo II), de acuerdo con el Cuadro 2, el Error Residual es el apropiado para probar el efecto de



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

bloque y la triple interacción. Si  $\sigma^2_{\alpha\beta\gamma}$  es real, entonces el CM(V\*P\*W) es el apropiado para probar las dobles interacciones. Estos autores agregan que para probar los efectos principales es necesario realizar algunos agrupamientos de CM. Por ejemplo, para probar  $H_0: \sigma^2_{\gamma} = 0$ , CM(W) sería el numerador y  $CM(V*W) + CM(P*W) - CM(V*P*W) - 89e^{-17}(CM \text{ Error})$  sería el denominador o  $CM(W) + CM(V*P*W)$  puede ser usado como numerador y  $CM(V*W) + CM(P*W)$  como el denominador.

**Error experimental apropiado en el modelo aleatorio:** para las pruebas de hipótesis con los modelos aleatorios, la escogencia de un término de error adecuado, cuando todas las fuentes de variación son reales, es más difícil cuando las hipótesis concernientes a los efectos principales van a ser probados.

**Consideraciones del modelo mixto:** de acuerdo con Yang (2008) y Yang, (2010), la determinación si un efecto es fijo o aleatorio no es siempre fácil y ha sido debatido en la literatura científica. En la mayoría de los casos, los efectos de los tratamientos son considerados fijos porque los tratamientos en el experimento son los únicos sobre los cuales se realizarán inferencias y son seleccionados por el experimentador. Los efectos del bloque se consideran como efectos aleatorios porque los bloques en el experimento son sólo un pequeño subconjunto de un universo de bloques sobre los cuales se realizarán inferencias acerca de los tratamientos (Salazar-Guerrero, sf; Steel y Torrie, 1980). Así, el modelo para datos de BCA usualmente contiene efectos fijos por las contribuciones de los tratamientos y efectos aleatorios por las contribuciones de los bloques, conformándose un modelo mixto.

**Análisis con el Modelo Mixto:** para fines ilustrativos se tomaron los datos de Kling (2004) en donde V y P se consideraron como efectos fijos y W como un efecto aleatorio. De acuerdo con Gil (2001), este análisis con el modelo mixto está basado en estimaciones probabilísticas máximas o restringidas de modelos lineales estadísticos que contemplan términos fijos y aleatorios y es considerado la mejor opción para el análisis estadístico de este tipo de experimento (Littell et al., 1991; Littell et al., 2006; Yang, 2008).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

**Representación de las Expectativas de los Cuadrados Medios del modelo mixto:** el Cuadro 3 contiene las expectativas de los cuadrados medios (ECM) del modelo mixto, utilizados para calcular los componentes de varianza y considerar el error experimental apropiado para las pruebas de hipótesis.

**Cuadro 3. Valores esperados de los cuadrados medios (ECM) con el modelo mixto para experimentos factoriales: el experimento de tres-factores.**

Modelo mixto: V y P son fijos; W es aleatorio	
Bloque	$\sigma^2 + abc\sigma_p^2$
V	$\sigma^2 + rb \frac{a}{a-1} \sigma_{\alpha\gamma}^2 + rbc \sum \alpha^2 / (a-1)$
P	$\sigma^2 + ra \frac{b}{b-1} \sigma_{\beta\gamma}^2 + rac \sum \beta^2 / (b-1)$
W	$\sigma^2 + rab\sigma_\gamma^2$
V*P	$\sigma^2 + r \frac{a}{a-1} \frac{b}{b-1} \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2 + rc \sum (\alpha\beta)^2 / (a-1)(b-1)$
V*W	$\sigma^2 + rb \frac{a}{a-1} \sigma_{\alpha\gamma}^2$
P*W	$\sigma^2 + ra \frac{b}{b-1} \sigma_{\beta\gamma}^2$
V*P*W	$\sigma^2 + r \frac{a}{a-1} \frac{b}{b-1} \sigma_{\alpha\beta\gamma}^2$
Error	$\sigma^2$

Fuente: Steel y Torrie, 1980.

**Errores experimentales del Modelo Mixto:** tomando en cuenta el Cuadro 3, para las pruebas de hipótesis de efectos aleatorios y de las interacciones entre uno o dos factores fijos con un factor aleatorio, la interacción es considerada como aleatoria como es el caso de W, W\*P, P\*W y V\*P\*W. Para estas interacciones, el término de error ( $\sigma^2$ ) es usado para realizar la prueba de F. Sin embargo, para la interacción V\*P, entre dos efectos fijos, el término de error adecuado es la triple interacción o V\*P\*W. Para probar las hipótesis de los efectos fijos principales como V y P es más complejo. Por ejemplo, para el efecto de V sería:

$$F_V = \frac{CM_V + CM_{V*P*W}}{CM_{V*P} + CM_{V*W}} = \frac{2\sigma^2 + 2r\sigma_{V*P*W}^2 + rb\sigma_{V*W}^2 + rc\sigma_{V*P}^2 + rbc\sigma_V^2}{2\sigma^2 + 2r\sigma_{V*P*W}^2 + rb\sigma_{V*W}^2 + rc\sigma_{V*P}^2}$$

Con esta fórmula se tiene el apropiado numerador y denominador para probar la hipótesis del factor V.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

**Ajuste de grados de libertad:** Satterthwaite (1946) y Gaylor y Hopper (1969) propusieron ajustar los grados de libertad en el modelo mixto donde  $CM_i$  representa un cuadrado medio y cualquier  $CM_i$  debe no aparecer tanto en el numerador como en el denominador. Tales relaciones son también llamados *quasi* F. El criterio de prueba es distribuido aproximadamente como F. Para este caso de un experimento factorial con tres factores: V, P y W, en un arreglo de BCA, y donde W es el factor aleatorio, la prueba de F sería:

$$F_{p,q} = \frac{CMr + \dots + CMs}{CMu + \dots + CMv}$$

Donde  $p$  y  $q$  son los grados de libertad para el numerador y denominador, respectivamente

$$p = \frac{(CMr + \dots + CMs)^2}{(CM^2r/fr + \dots + CM^2s/fs)}$$

$$q = \frac{(CMu + \dots + CMv)^2}{(CM^2u/fu + \dots + CM^2v/fv)}$$

$f_i$  son los grados de libertad para  $CM_i$ . Aquí  $p$  y  $q$  son llamados grados de libertad “efectivos”. Además,  $CMr$  es el cuadrado medio de la variable de interés en la prueba F, en este caso es V;  $CMs$  es el cuadrado medio de la triple interacción;  $CMu$  es el cuadrado medio de la doble interacción de V\*P y  $CMv$  es el cuadrado medio de la doble interacción V\*W.

**Procedimientos de análisis:** los siguientes procedimientos o rutinas están diseñados para los usuarios de SAS®, así para:

**1 - Análisis como modelo fijo:** primeramente, asumiendo que los factores V, P y W son considerados como efectos fijos, el procedimiento con PROC GLM sería el siguiente:

```
data uno;
input id blk v p w rend;
cards;
1 1 1 0 1 61
```



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

```
2 1 1 0 2 56
3 1 1 25 1 60
```

Etc.

*-colocar datos del cuadro 1 en columnas indicadas por el orden del input-*

```
;
proc sort;
by blk v p w;
run;
proc glm;
class id blk v p w;
model rend = blk v|p|w; [automáticamente se estiman los efectos principales e
interacciones]
*****determinacion de contrastes ortogonales*****;
contrast 'v1 vs v2' v 1 -1; [contrastes para probar diferencias entre
variedades]
contrast 'v1 vs v2 con control de malezas' v 1 -1 v*p 0 1 0 -1; [prueba v1
contra v2 con control de malezas]
*****comparacion de medias ajustadas por el modelo y error estándar*****;
lsmeans v p v*p w v*w p*w/s; [pide las medias ajustadas y errores estándar de la
media de los efectos principales y sus interacciones
y las compara todas contra todas mediante pruebas de t]

run;
quit;
```

**2 - Análisis como modelo mixto con PROC GLM:** primeramente, asumiendo que los factores V y P son fijos y el efecto W es aleatorio, el procedimiento con PROC GLM sería el siguiente:

```
data dos;
input id v p w blk rend;
cards;
1 1 1 0 1 61
2 1 1 0 2 56
3 1 1 25 1 60
```

Etc.

*-colocar datos del Cuadro 1 en columnas indicadas por el orden del input-*

```
;
proc sort;
by id blk v p w;
run;
proc glm;
class id blk v p w;
model rend = blk v|p|w;
random blk c v*w p*w v*p*w/test; [pide prueba de las variables aleatorias]
*****prueba de hipótesis*****; [prueba de efectos principales con su
adecuado error experimental]

test h=v e=v*w;
test h=p e=p*w;
test h=v*p e=v*p*w;
```



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

```

***prueba de contrastes ortogonales de efectos fijos con sus
errores****;
contrast 'v1 vs v2' v 1 -1 /e=v*w;
contrast 'v1 vs v2 con control de malezas' v 1 -1 v*w 0 1 0 -1; [compara
0 contra 50 kg P2O5 con control de malezas]
*****comparaciones de medias de efectos principales*****;
lsmeans v/s e=v*w; [compara las medias ajustadas con su adecuado error
experimental y pide el error estándar]
lsmeans p/s e=p*w;
lsmeans w/s;
***comparacion de medias de las interacciones con su error*****;
lsmeans v*p/s e=v*p*w;
lsmeans v*w/s;
lsmeans p*w/s;
run;
quit;

```

**3 - Análisis como modelo mixto con PROC MIXED:** este procedimiento utiliza como defecto (default) la técnica de Máxima Verosimilitud Restringida (REML) y es muy preferido con datos desbalanceados sobre el método ANOVA (Yang, 2008 y Yang, 2010) y calcula correctamente efectos fijos y aleatorios. Asumiendo, nuevamente, que los factores V y P son fijos y el efecto W es aleatorio, el procedimiento con PROC MIXED sería el siguiente:

```

data tres;
input id blk v p w rend;
cards;
1 1 1 0 1 61
2 1 1 0 2 56
3 1 1 25 1 60
Etc.
-colocar datos del cuadro 1 en columnas indicadas por el orden del input-
;
proc sort;
by id blk v p w;
run;
proc mixed data=tres method=reml covtest; [covtest realiza la prueba de Wald para los
efectos aleatorios]
class id blk v p w;
model rend = v p v*p/ddfm=satterth; [ajusta los gl de acuerdo a
Satterthwaite, 1946]
random blk w v*w p*w v*p*w;
****estimación de medias y errores estándares de efectos fijos****;
estimate 'media variedad v1' intercept 1 v 1 0; [estima la media de V1 y error
estándar]
estimate 'media 50 kg-ha P2O5' intercept 1 p 0 1 0;
estimate 'variedad v1 vs v2 con 50 kg fosforo' v 1 -1 v*p 0 0 1 0 0 -1;
****comparación de medias con prueba de contrastes ortogonales****;
contrast 'v1 vs v2' v 1 -1; [contrasta V1 contra V2]
contrast 'v1 vs v2 con 50 kg-ha fosforo' v 1 -1 v*p 0 0 1 0 0 -1;
[contrasta V1 con V2 a un nivel de 50 kg-ha P2O5]

```



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

```
*****tambien estima medias ajustadas para efectos fijos*****;
lsmeans v/EST;
lsmeans p/EST;
lsmeans v*w/EST;
run;
quit;
```

**Comparación de las tres rutinas de SAS®:** para probar la eficiencia en el análisis de los datos con las tres rutinas de SAS® se compararon los Errores Estándares (EE) de las medias e interacciones. Para obtener los errores estándares de las medias e interacciones del modelo fijo y mixto con PROC GLM, además, de las instrucciones para el análisis, se añadieron las instrucciones (statements) para solicitar contrastes ortogonales (contrast) y comparar diferencias de medias y/o estimados (estimate) y así obtener las medias y sus errores estándares, tanto en efectos fijos como en aleatorios. También, en las dos primeras rutinas con PROC GLM se utilizó la instrucción “lsmeans” para obtener las medias ajustadas por el modelo y su error estándar, mientras que en el modelo mixto con PROC MIXED se utilizó la instrucción “estimate” para obtener la media ajustada y su error estándar de los efectos fijos. Para la diferencia de dos medias de efectos fijos se utilizó la instrucción “contrast”. Además, en el PROC MIXED se utilizó la instrucción “covtest” para realizar la prueba de Wald para efectos aleatorios (refiérase a Correa-Morales y Salazar-Uribe, 2016), la cual está basada en errores estándares que subestiman la verdadera variabilidad en la estimación de  $\beta$  debido a que estas no tienen en cuenta la variabilidad introducida al estimar a  $\alpha$ . Las hipótesis serían  $H_0: L\beta=0$  y  $H_a: L\beta\neq 0$ .  $L$  es cualquier matriz conocida y  $\beta_i$  es un vector  $q$ -dimensional con los coeficientes de regresión sujeto-específicos y

$$W = (\hat{\beta} - \beta)'L'[L(\sum_{i=1}^m X'iv_i(\hat{\alpha})Xi)]^{-1}L'(\hat{\beta} - \beta)$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se asumió un modelo fijo en donde el término de error se consideró como el apropiado para probar las hipótesis sobre los efectos principales y sus interacciones (Cuadro 4).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

**Cuadro 4. Análisis de varianza con el PROC GLM y PROC MIXED de SAS® de la producción de semilla (kg/parcela) de dos variedades de leguminosa forrajera (V) con tres niveles de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (P) y con y sin control de malezas (W), usando en modelo lineal generalizado fijo y mixto.**

F de V	gl	PROC GLM				PROC MIXED <sup>1</sup>			
		CM	FIJO <sup>a</sup> Valor-F	MIXTO Valor-F	σ <sup>2</sup> estimada	Gl Num	gl Den	Valor-F <sup>g</sup> Valor-Z <sup>h</sup>	σ <sup>2</sup> estimada
Bloques, BLK	2	135,08	5,93**	5,93** <sup>b</sup>	9,36	2	22	0,83	9,36
Variedades (V)	1	306,25	13,44**	1,08 <sup>c</sup>	.	1	1,74	1,64 <sup>g</sup>	.
Fósforo (P)	2	16,00	0,70	0,07 <sup>d</sup>	.	2	2,72	0,09 <sup>g</sup>	.
Malezas (W)	1	12,25	0,54	0,02 <sup>e</sup>	-0,59	.	.	.	0,00
VxP	2	9,33	0,41	0,42 <sup>f</sup>	.	2	1	0,41 <sup>g</sup>	.
VxW	1	283,36	12,44**	12,82 <sup>f</sup>	28,95	.	.	0,81 <sup>h</sup>	18,25
PxW	2	234,33	10,29**	10,60 <sup>f</sup>	35,26	.	.	1,01 <sup>h</sup>	27,28
VxPxW	2	22,11	0,97	0,97 <sup>b</sup>	-0,22	.	.	0,00 <sup>h</sup>	0,02
Error	22	22,78	.	.	22,78	.	.	3,32 <sup>h</sup>	22,78

\*\*P<0,01

<sup>1</sup>Valores-F de efectos fijos y estimados de varianza de efectos aleatorios.

<sup>a</sup>Fuente: Kling (2004).

Términos de errores (denominador) usados en la Prueba-F de PROC GLM de SAS®

<sup>b</sup>Error: CM(Error)

<sup>c</sup>Error: CM(VxW)

<sup>d</sup>Error: CM(PxW)

<sup>e</sup>Error: CM(VxW) + CM(PxW) – CM(VxPxW) – 89e<sup>-17</sup>(CM Error); gl error = 2,2742

<sup>f</sup>Error: CM(VxPxW)

<sup>g</sup>Valor-F para efectos fijos.

<sup>h</sup>Valor-Z para efectos aleatorios

Con PROC GLM de SAS® para el modelo fijo (Cuadro 4), se observa que los Valores-F se estimaron con el CM del error (residual) y basado en el Cuadro 2. Estos resultados muestran que los efectos BLK, V, VxW y PxW resultaron ser altamente significativos (p<0,01). Las interacciones VxW y PxW toman mayor relevancia en la discusión de los resultados, principalmente se debe enfocar en analizar los efectos simples y determinar cuál de ellos fue(ron) el(los) de mayor aporte a la significancia de las interacciones.

Usando un modelo mixto con PROC MIXED de SAS®, los Valores-F se calcularon de acuerdo a la estructura del Cuadro 2 y con los términos de error mostrados al pie del Cuadro 4. Los efectos de BLK y VxPxW se calcularon con el término de error residual. Las interacciones V, VxW y PxW ahora no mostraron una significancia (p>0,05). También, se observa que para la Prueba-F del efecto aleatorio W (modelo aleatorio del Cuadro 2), su denominador es un término compuesto que usa PROC GLM de SAS® para modelos mixtos



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

definido por la fórmula:  $\text{Error} = \text{CM}(\text{VxW}) + \text{CM}(\text{PxW}) - \text{CM}(\text{VxPxW}) - 89e^{-17}(\text{CM Error})$  con g.l. error = 2,2742 ajustado por Satterthwaite (1946). Sin embargo, basado en el Cuadro 3, el CM del término del error Residual ( $\sigma^2$ ) sería el más apropiado para la Prueba-F y su valor debió ser 0,43.

En contraste con el modelo fijo, se observó que con el modelo mixto de PROC GLM no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el efecto V. Por el contrario, en el modelo fijo, el efecto V resultó altamente significativo ( $p < 0,01$ ), llegándose a conclusiones erradas, en caso de que el modelo fuera en realidad mixto. Además, el PROC GLM de SAS® con el modelo mixto las interacciones VxW y PxW son probadas (Prueba-F) con el CM de la triple interacción (VxPxW), mientras que basado en el modelo mixto del Cuadro 3 se debiera probar adecuadamente con el término de error  $\sigma^2$ . Los valores de F debieran ser 12,44 y 10,29, respectivamente.

Con el PROC MIXED de SAS®, los Valor-F de V y P, ajustado por los grados de libertad de 1,74 y 2,72, respectivamente, de acuerdo Satterthwaite, (1946), fueron ligeramente mayores que en PROC GLM, pero aún no resultaron significativos ( $p > 0,05$ ) (Cuadro 4). Los efectos aleatorios de BLK y V, sus Valor-Z no fueron estimados, en este ejemplo, pero las interacciones VxW, PxW y VxPxW, sus Valor-Z fueron estimados, pero no resultaron significativos ( $p > 0,05$ ).

La varianza del efecto aleatorio W fue estimada; así como las interacciones donde este efecto participa con el modelo mixto de PROC GLM de SAS® (Cuadro 4). Por otra parte, las varianzas de W y VxPxW resultaron negativas. Con el PROC MIXED las varianzas de BLK y W fueron 0,00; sin embargo, las varianzas de VxW, PxW y VxPxW fueron positivas y de VxW y PxW fueron ligeramente menores que las estimadas por PROC GLM.

Con el PROC MIXED se pueden realizar las Pruebas-F para efectos fijos y así evaluar si las medias de tratamiento son diferentes y la Prueba-Z para determinar estimados de varianzas efectos aleatorios e inferir acerca de ellas. Esta situación favorece



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

el uso de PROC MIXED para proveer inferencias correctas acerca de efectos fijos y aleatorios, pero no así para el PROC GLM.

Los Cuadros 2 y 3 guían la estimación de las varianzas de los efectos aleatorios y el cálculo de los Valor-F de los efectos fijos. Las varianzas estimadas por PROC MIXED de SAS® son ligeramente menores que las estimadas por PROC GLM de SAS® con modelo mixto; además no existen varianzas negativas, las cuales no tienen significado alguno (Yang, 2008). Para el PROC GLM, debido a que el CM de W o Control de Malezas (12,25) es menor que el del CM del Error (22,78), la  $\sigma^2_W$  resultó ser -0,59 [ $\sigma^2_W = (12,25 - 22,78)/18 = -0,59$ ]. Sin embargo, el defecto (“default”) del método del análisis PROC MIXED es REML (Máxima Verosimilitud Restringida) establece que este indeseable valor negativo es estimado a ser cero. Además, establecer  $\sigma^2_W = 0$  afecta el estimado REML de  $\sigma^2_{V \times W}$  y  $\sigma^2_{P \times W}$ , el cual también afecta los Valores-F de los efectos V y P; así como los contrastes y estimados de medias o diferencias de medias (Yang, 2008).

Los Valores-F del PROC MIXED de los efectos fijos fueron calculados de los componentes de varianza. Así, para  $F_V$  se procedió así:  $CM_{V \times W} = \sigma^2 + rb\sigma^2_{V \times W} = 22,78 + (3)(3)(18,25) = 187,03$ .  $F_V = CM_V / CM_{A \times W} = 306,25/187,03 = 1,64$ . Similarmente se procede para  $F_P$  y  $F_{V \times P}$ . SAS® establece los valores de F tabulada con los grados de libertad ajustados por Satterthwaite (1946).

Los Valores-Z (Cuadro 4) para los efectos aleatorios del PROC MIXED indican que no existe diferencias significativas en sus efectos ( $p > 0,05$ ). No se obtuvo Valor-Z para el efecto de W, ya que su varianza en el modelo fijo resultó ser negativa y PROC MIXED lo ubica en cero (0,00).

Los errores estándares de acuerdo con los tres procedimientos usando el programa SAS® se muestran en el Cuadro 5.

Los errores estándares (EE) con el modelo fijo de PROC GLM se estimaron todos con el CM del error residual ( $\sigma^2=22,78$ ) y variaron de 1,125 con V a 2,756 con  $V \times P \times W$ ; sin embargo, con el modelo mixto de PROC GLM, los EE de los efectos fijos de V, P y su



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

interacción VxP variaron de 1,920 en VxP a 4,419 en P. Todos estos EE fueron estimados con su correspondientes y verdaderos CM. Un aumento de 253,7%. 220,7% se registró en V y P, respectivamente y una disminución de 1,5% en V\*P al compararlos con PROC GLM modelo fijo. Además, los EE del PROC MIXED para los efectos fijos, variaron de 4,249 en V a 5,449 en la interacción VxP. Los aumentos del EE en V, P y VxP fueron 7,1%, 9,1% y 183,8%, respectivamente, con respecto al modelo mixto de PROC GLM. Por otra parte, los EE de los efectos aleatorios fueron iguales en ambos modelos del PROC GLM y modelo fijo del PROC MIXED, solo que no fue mostrado en los resultados del análisis (output). En un experimento factorial de dos factores, uno fijo y otro aleatorio, Yang (2008) reportó también Errores Estándares mucho mayores con PROC MIXED que en PROC GLM para modelos fijos. Un aumento de 28,4% en los EE de los niveles del efecto fijo y 28,1% en las comparaciones de medias de los niveles del efecto fijo.

**Cuadro 5. Errores estándares de las fuentes de variación de acuerdo con el tipo de modelo y analizados por SAS®.**

F de V	PROC GLM	PROC GLM	PROC MIXED
	FIJO	MIXTO	
Variedad (V)	1,125	3,968	4,249
Fósforo (P)	1,378	4,419	4,819
VxP	1,949	1,920	5,449
Control de Malezas (W)	1,125	1,125	-
VxW	1,591	1,591	-
PxW	1,948	1,948	-
VxPxW	2,756	2,756	-

PROC MIXED correctamente determina los errores estándares de la media y las diferencias entre medias, mientras que PROC GLM produce valores errores incorrectos. Este procedimiento produce y acomoda más realísticamente la estructura de varianza-covarianza de efecto aleatorios. Esto se debe a que el PROC GLM considera todos los efectos e interacciones como efectos fijos y solamente el término de error es considerado como aleatorio (Yang, 2008).

Yang (2008) en su nota al editor “*Why is MIXED análisis underutilized*”, indicó lo siguiente, el PROC GLM de SAS® es el más utilizado en el análisis de varianza; sin



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

embargo, ha sido diseñado para analizar datos conteniendo solo efectos fijos. Por lo tanto, recomienda el PROC MIXED como el más adecuado para datos con efectos fijos y aleatorios. Además, agrega qué si los efectos aleatorios verdaderos son pequeños y/o los tamaños de la muestra son pequeños, estimados negativos de varianza pueden ser obtenidos usando PROC GLM. Sin embargo, cualquiera varianza por definición no debiera ser menor a cero y que los estimados negativos no tienen significado. Cuando esto ocurre, la máxima verosimilitud restringida o REML (defecto de MIXED) establece los estimados de varianza negativos a cero, sin importar si los datos están balanceados o no y esto guía a diferentes Pruebas-F de los mismos efectos fijos. Esta es una de las razones por la que PROC MIXED debe ser utilizado en modelos mixtos.

### CONCLUSIONES

- La comparación entre PROC GLM y PROC MIXED en el análisis de un experimento cruzado - clasificado de tres factores con un factor aleatorio y dos factores fijos, se reafirma lo encontrado en otros estudios con otros modelos estadísticos, que PROC MIXED es capaz de producir Pruebas-F y errores estándares correctos para medias de efectos fijos, mientras que el PROC GLM no los produce.
- El uso del PROC GLM de SAS® puede estimar varianzas negativas en variables aleatorias y las interacciones como ocurrió en este estudio. Varianzas negativas no tienen ningún significado e interpretación como en esta variable de respuesta (rendimiento).

### RECOMENDACIONES

- Con el apoyo de un biometrista, el investigador agropecuario debe estar seguro si hay o no presencia de efectos fijos y/o aleatorios.
- Utilizar siempre el PROC MIXED de presentarse un experimento en donde se combinen efectos fijos y aleatorios.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## REFERENCIAS

- Correa-Morales, J.C., y Salazar-Uribe, J.C. (2016). Introducción a los modelos mixtos. 1ª Edición. Centro Editorial. Escuela de Estadística. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín, Colombia.
- Gaylor, D.W., y Hopper, F.N. (1969). Estimating the degrees of freedom for linear combinations of mean squares by Satterthwaite's formula. *Technometrics* 11, 691-706.
- Gil, J.L. (2001). Comparación de los procedimientos GLM y MIXED del SAS® para analizar parcelas divididas con bloques al azar. *Zootecnia Tropical* 19(1), 43-58.
- Kling, J. (2004). Field plot techniques and experimental design in agriculture. Oregon State University. Corvallis, OR. USA.
- Lair, N.M., y Ware, J.H. (1982). Random effects models for longitudinal data. *Biometrics*, 38, 963-974.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W., Wolfinger, R.D., y Schabenberger, O. (2006). SAS for mixed models. 2<sup>nd</sup> Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Littell, R.C., Freund, R.J., y Spector, P.C. (1991). SAS system for linear models. 3<sup>rd</sup> Ed. SAS Institute, Cary, NC. USA.
- Lowry, S. (1983). Rules for thumb for writing parameters estimated in the analysis of variance. Monography. In: Design of Experiment. Agriculture 802. University of Nebraska at Lincoln. NE. USA. 9p.
- Salazar-Guerrero, A. sf. Estadística superior. Clave LII. Consultado 5 sept. 2020. [www.cursos.aiu.edu/Estadistica%20Superior/PDF/Tema%202.pdf](http://www.cursos.aiu.edu/Estadistica%20Superior/PDF/Tema%202.pdf)



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Satterthwaite, F.E. (1946). An approximate distribution of estimates of variance components. *Biometric Bulletin* 2, 110-114.

Steel, R.G.D., Torrie, J.H. (1980). Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2<sup>nd</sup> Edition. McGraw-Hill, Inc. New York. USA.

Yang, R-C. (2008). ¿Why is MIXED analysis underutilized? *Canadian Journal of Plant Science* 88, 563-567.

Yang, R-C. (2010). Towards understanding and use of mixed-model analysis of agricultural experiments. *Canadian Journal of Plant Science* 90, 605-627.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## EFECTO DEL MÉTODO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA BOVINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y TASA DE FERTILIZACIÓN *in vitro*<sup>1</sup>

**Raúl H. De León-García<sup>2</sup>; Roderick A. González M<sup>3</sup>; Pedro Guerra M<sup>3</sup>; Kristel Flores<sup>4</sup>**

### RESUMEN

Los espermatozoides mamíferos no son capaces de fertilizar el ovocito inmediatamente; primero deben sufrir un periodo de preparación llamado capacitación espermática, que se define como el conjunto de modificaciones que ocurren después de la maduración en el epidídimo, y que le confieren la capacidad de fertilizar al ovocito. Un primer requisito en el proceso de preparación de los espermatozoides para la fertilización *in vitro* (FIV) bovina incluye la separación de los mismos del diluyente y/o del crioprotector. Con el objetivo de examinar el efecto que tiene el método de capacitación sobre la concentración y la tasa de fertilización se realizó este trabajo en el Laboratorio de Biotecnología del IDIAP. Para ello se utilizaron ovocitos provenientes de ovarios *post mortem* que fueron transportados al laboratorio donde se puncionaron los folículos antrales (entre 2 mm y 5 mm). Posteriormente, se seleccionaron ovocitos con más de cinco capas de células del cúmulo y se colocaron a madurar por 20 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la FIV. Para la separación de la fracción espermática motil se utilizaron los métodos Gradiente de Percoll® y Swim up. La concentración espermática se midió utilizando un SpermaCue® y la tasa de fertilización se evaluó a las 18 horas post fertilización utilizando microscopio con aumento de 100x. Los resultados indicaron que la mayor concentración espermática y tasa de fertilización se observaron con Swim up ( $4,8 \times 10^6$  y  $83,7 \pm 7,8$  %, respectivamente), mientras que con el Gradiente de Percoll se lograron valores de  $3,5 \times 10^6$  y  $60,22 \pm 6,3$  % para concentración espermática y tasa de fertilización. La producción total de embriones con ambos métodos fue de 95 embriones transferibles, con una tasa de desarrollo de 21,7%. En este estudio se observó que la motilidad espermática no influyó en la tasa de fertilización y se concluye que ambos métodos de capacitación espermática son aptos para la producción de embriones *in vitro*.

**Palabras clave:** Crioprotector, ovocitos *post mortem*, maduración, fracción espermática motil, embrión.

<sup>1</sup> Recepción: 23 de junio de 2020. Aceptación: 1 de mayo de 2021. Trabajo para optar por el Título de Ing. Agr. con orientación en Producción Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá. Financiado por el Proyecto Mejoramiento de las Técnica de Biotecnología Animal utilizadas en el Mejoramiento Animal del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).

<sup>2</sup> IDIAP. Centro de Innovación Agropecuario Oriental. subcentro de Buena Vista. Ing. Zootecnista.  
e-mail: [raulherminio@gmail.com](mailto:raulherminio@gmail.com)

<sup>3</sup> IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria Chiriquí. Estación Experimental de Gualaca.

<sup>4</sup> Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Estudiante graduando.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## EFFECT OF BOVINE SPERM CAPACITATION METHOD ON CONCENTRATION AND RATE OF *in vitro* FERTILIZATION

### ABSTRACT

Mammalian sperm are not able to fertilize the oocyte immediately; they must first undergo a preparation period called *sperm capacitation*, which is defined as the set of modifications occurring after sperm maturation in the epididymis, giving it the ability to fertilize the oocyte. A first requirement in the process of preparing bovine sperm for *in vitro* fertilization (IVF) includes the separation of the sperm from the diluent and/or cryoprotectant. This work was carried out at the Biotechnology Laboratory of IDIAP in order to examine the effect of sperm capacitation method on concentration and fertilization rate of *in vitro* fertilization. For this purpose, oocytes from post-mortem ovaries were collected and transported to the laboratory where the antral follicles (between 2 mm and 5 mm) were punctured. Subsequently, oocytes with more than 5 layers of cumulus cells were selected and matured for 20 hours. After this time, IVF was carried out. The Gradient methods of Percoll® and Swim up were used for the separation of the motile sperm fraction. Sperm concentration was measured using a SpermaCue® and the fertilization rate was evaluated at 18 hours post-fertilization using a microscope with an increase of 100x. The results indicated that the highest sperm concentration and fertilization rate were observed with Swim up ( $4,8 \times 10^6$  and  $83,7 \times 7,8 \%$  respectively), while the values with the Percoll Gradient were  $3,5 \times 10^6$  and  $60,22 \times 6,3\%$  for sperm concentration and fertilization rate. The total production of embryos with both methods was 95 transferable embryos, with a development rate of 21,7%. This study reported that sperm motility did not influence the fertilization rate and concludes that both sperm capacitation methods are suitable for *in vitro* embryo production.

**Key words:** Cryoprotective, post mortem oocytes, maturation, motile sperm fraction, embryo.

### INTRODUCCIÓN

Uno de los eventos importantes que regulan la fecundación, es la capacitación espermática y la reacción del acrosoma, esto debido a que los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fecundar al ovocito y deben permanecer por un cierto período de tiempo en el tracto reproductivo femenino para adquirir la capacidad fecundante, fenómeno éste que se ha denominado capacitación espermática, (Austin, 1951; Chang, 1951). Este período es variable en las diferentes especies y en los bovinos se ha descrito que duraría aproximadamente 4 horas (Morrow, 1986).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Se ha definido a la capacitación como los cambios que preparan al espermatozoide para la hiperactivación y reacción acrosómica. Esta última es un pre-requisito para la penetración de la zona pelúcida y para la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, constituyendo un mecanismo de control para la fecundación (Barros y Berríos, 1977; Yanagimachi, 1988; Fraser, 1992).

De acuerdo con algunos autores (Yanagimachi, 1989; Fraser, 1990), entre los cambios que ocurren durante la capacitación, previo a la hiperactivación y reacción acrosómica, se encuentra la alteración de las glicoproteínas de la superficie del espermatozoide, las modificaciones de las proteínas y lípidos de la membrana plasmática al calcio y la activación del sistema adenilato ciclasa.

La reacción acrosómica puede considerarse como una secreción celular, durante la cual, las membranas plasmáticas y acrosómica externa se abren y se fusionan progresivamente entre sí (Bedford y Cooper, 1978; Roldan y Harrison, 1990), permitiendo que el espermatozoide establezca una unión secundaria con la zona pelúcida, iniciando así su paso a través de ella para más tarde fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Barros y Berríos, 1977).

*In vivo*, la capacitación espermática es adquirida durante la migración de los espermatozoides a través del tracto reproductivo femenino y la reacción acrosómica cuando los espermatozoides se unen a la zona pelúcida (Parrish et al., 1988; Parrish et al., 1989). Imitar *in vitro* estos fenómenos que ocurren naturalmente en el tracto reproductivo femenino, es de gran interés y representa un desafío importante en los estudios de fecundación; es por ello que para lograr este propósito, se han desarrollado diversas técnicas en las diferentes especies, utilizando variados regímenes de incubación, mientras que *in vitro*, este proceso puede ser mimetizado eliminando el plasma seminal por distintos sistemas de lavado e incubando los espermatozoides en medios de composición comparable a la del fluido oviductal (Visconti et al., 2002).

Para realizar los estudios de fecundación *in vitro* (FIV) en la especie bovina se han desarrollado una serie de protocolos para inducir la capacitación espermática (Van Soom



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

y De Kruif, 1996). Un primer requisito en el proceso de preparación de los espermatozoides para la FIV bovina incluye la separación de los mismos del plasma seminal, del diluyente y/o del crioprotector. Este proceso permite la selección de una subpoblación espermática que presente una buena motilidad.

Entre los tratamientos espermáticos utilizados habitualmente en los laboratorios se encuentran los lavados que se realizan con medios con albúmina o a través de centrifugaciones en un gradiente. En la mayoría de los casos, el medio de capacitación contiene sustratos energéticos (piruvato, lactato, glucosa), un aceptor de colesterol (normalmente albúmina), bicarbonato y calcio, además de determinados electrolitos.

Entre los métodos de selección de espermatozoides bovinos destacamos el gradiente de Percoll® (Saeki et al., 1990), la técnica de swim-up (Parrish y Foote, 1987), la migración a través de una columna de ácido hialurónico (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994) y la filtración a través de lana de vidrio (Pereira et al., 1999).

El método de preparación de los espermatozoides determina los resultados de la FIV, por lo que el estudio de los patrones de capacitación puede ser fundamental para optimizar el proceso de allí que se hace necesario estandarizar un método de capacitación espermática que garantice la fecundación de ovocitos bovinos madurados *in vitro*.

### **Obtención y Maduración de los ovocitos**

Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de vacas sacrificadas en matadero, colocados en solución salina fisiológica estéril + antibiótico (NaCl 0,9% + mezcla de penicilina-estreptomicina (0,75 mg/L) y transportados a temperatura ambiente al laboratorio de Biotecnología Animal del IDIAP. La colección de ovocitos y la maduración *in vitro* (MIV) fueron realizadas por el método previamente descrito por De León-García et al., 2012.

### **Capacitación Espermática**

Para la fertilización *in vitro*, se utilizaron pajuelas comerciales de 0,5 cc con concentraciones de  $30 \times 10^6$  de la misma casa comercial y el mismo toro. Dos horas antes de la fertilización *in vitro* (FIV) se procedió a la capacitación espermática (16 a 18 horas de



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

iniciada la MIV) de utilizando para la separación de la fracción espermática móvil las siguientes metodologías:

### **Método de “nadando hacia arriba”** (Swim-up, Parrish et al., 1986).

Para ello se utilizaron 10 ml del medio de cultivo base TALP SPERM suplementado con 60,0 mg de Albúmina Bovina (BSA fracción V); 100,0 µl de piruvato y 5,0 µl de gentamicina.

Para separar la fracción móvil se tomó un tubo cónico de centrifuga de 10 ml al que se le añadió 1 ml de medio de capacitación (TAL SPERM suplementado) y se colocó en baño maría a 37,5 °C por 15 minutos. Luego se tomó una pajuela comercial de semen congelada-descongelada de 0,5 ml y se descargó el contenido en el fondo del tubo con el medio de capacitación, evitando la mezcla entre el semen y el medio de capacitación. Durante el proceso se tapó el tubo herméticamente; con el fin de evitar intercambio del medio con el aire. Una vez finalizado esta fase se colocó nuevamente el tubo con la dosis de semen en baño maría durante una hora más.

Pasada la hora, se retiró el tubo del baño maría y se extrajo la fase superior y la interface con una micropipeta de 1 µl y se descargó, lo colectado, lentamente en un tubo cónico limpio y se le adiciono 1µl de medio dejándolo reposar por cinco minutos luego de los cuales se le agrego 4 ml más de medio y se centrifugó por 10 minutos (800 a 1,200 rpm). Terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 200 µl de medio en los cuales se mezcló el pellet (Figura 3) y se mantuvo a 37,5 °C durante la determinación de la concentración espermática (Figura 1).

### **Método de Gradiente de Percoll®**

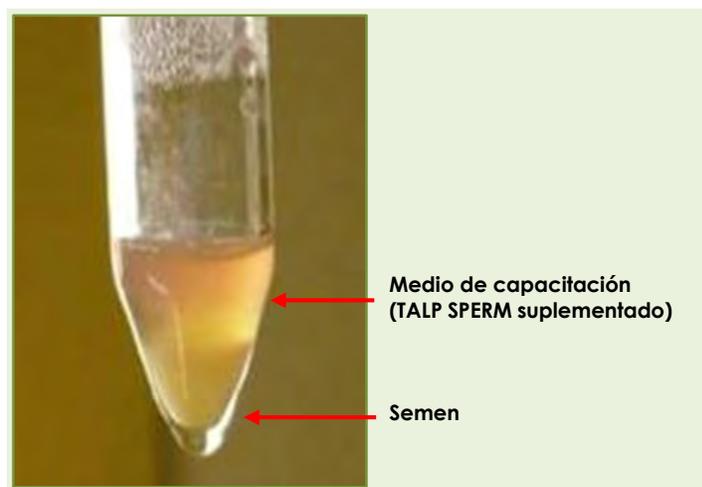
Para separar la fracción móvil de espermatozoides por este método, se colocaron, en un tubo de ensayo, dos cantidades del Percoll® a concentraciones distintas; la de mayor concentración (90%) se depositó al fondo del tubo y la menor concentración (45%) en la superior, con la intención de que se producirá una interface entre ambas concentraciones. Para preparar estas concentraciones, se tomaron 9 ml de Percoll® isotónico, al que se le agrego 1ml de medio de capacitación para preparar una dilución de 90%. De esta solución



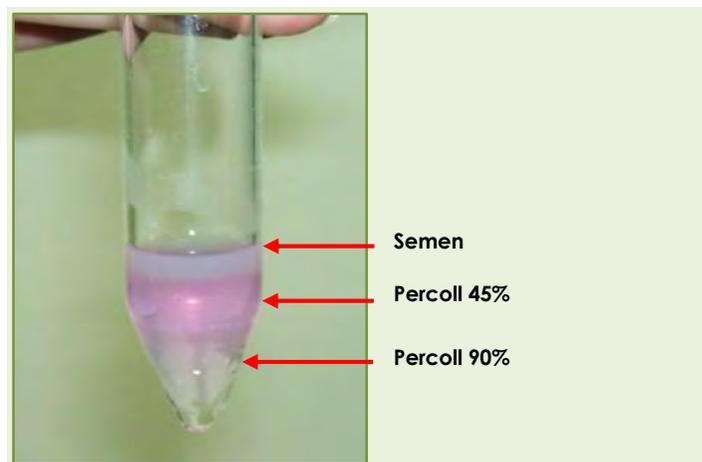
Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

al 90%, se tomaron 2 ml y se le añadieron 2 ml de medio de capacitación para obtener lo 45% de Percoll®.

El semen descongelado se depositó como una capa en la superficie de esta preparación y se sometió a centrifugación (Figura 2). Con este método, la migración de los espermatozoides está determinada por su vitalidad, por lo que los espermatozoides vivos se sedimentan formando un pellet, el cual se re-suspende y somete a conteo para determinar la concentrar espermática (Rosenkrans et al., 1993).



**Figura 1. Método “nadando hacia arriba” (Swim up, Parrish et al., 1986) para la separación de la fracción espermática móvil**



(Montes, 2008).

**Figura 2. Método de gradiente de Percoll® para separar la fracción espermática móvil**



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Después de esta primera centrifugación y la formación del pellet, se retiró el líquido sobrenadante, añadiendo 3 cc de medio TALP SPERM para lavar el pellet y nuevamente se centrifuga por 10 minutos a 1,200 rpm. Una vez terminada la segunda centrifugación, se retira el medio de lavado para obtener el pellet final (Figura 3) y determinar su concentración espermática y motilidad para realizar la fertilización *in vitro*.



**Figura 3. Pellet labil final resultado de la centrifugación con el que se realizó la fertilización *in vitro*.**

### **Determinación de la concentración espermática**

La determinación de la concentración espermática se realizó utilizando un SpermCue® (Figura 4). Para el cálculo del volumen de semen a agregar en cada pozo de 400  $\mu$ l y obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  espermios/ml se utilizó la siguiente fórmula aplicada por Lliteras (2007) y Montes (2008):

$$X = 400/C$$

Donde;

X= Volumen de medio TALP SPERM conteniendo los espermatozoides que se va a agregar en 400 $\mu$ l

C= Conteo en la cámara Neubauer o SpermCue®

400= Volumen en cada pozo (en micro litros ( $\mu$ l))



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**Figura 4. SpermCue® utilizado para determinar la concentración espermática.**

## Fertilización

Previo a la fertilización, los complejos cúmulos ovocitos (CCOs), fueron transferidos del medio de maduración (MIV) al medio de fertilización *in vitro* (MFIV) el cual utiliza como base el TALP SPERM suplementado con 20,0  $\mu$ l de Piruvato; 100,0  $\mu$ l de Glucosa; 100,0  $\mu$ l de Heparina 60,0 mg de BSA y 10,0  $\mu$ l Gentamicina.

Antes de añadir el volumen calculado conteniendo una concentración de espermios de  $1 \times 10^6$ , se evaluó la motilidad y luego se procedió a fertilizar los CCOs colocados en el MFIV. El volumen se depositó en cada pozo y luego se incubaron durante 22 horas a 38,5 °C; 5% de CO<sub>2</sub> y >90% de humedad relativa para su incubación.

## Cultivo de posibles cigotos.

Transcurridas 22 horas desde el momento de la fertilización de los ovocitos, los posibles cigotos fueron colocados en un vial de 1,5 ml en medio de lavado TCM-199 con NaHCO<sub>3</sub> + Hepes y sometidos a agitación en un vórtex por un minuto para su denudación. Los cigotos recuperados se colocaron en un plato de 35 mm con medio de lavado para su búsqueda y clasificación. Luego de recuperados y clasificados, fueron transferidos al medio de cultivo CR1aa (Rosekrans y First, 1993) colocando 30 ovocitos/pozo.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Para la preparación del medio de cultivo CR1aa se utilizaron 9ml del medio CR1aa, al que se le adicionó, 50 µl de L- Glutamina; 10 µl de piruvato; 10 µl de gentamicina y 1,0 ml de SFB: La esterilización se realizó por filtración con filtros millipore de 0,2 µl. Luego se prepararon los platos de cultivo de cuatro pozos con 400 µl de medio por pozo, equilibrando el medio por una hora y media a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y >90% de humedad relativa antes de colocar los cigotos.

La incubación se realizó durante cinco días en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y >90% de humedad relativa, después de los cuales se procedió a renovar el 100% del medio de cultivo con medio nuevo previamente equilibrado por dos horas, hasta el día siete en que fueron evaluados los estadios de desarrollo embrionario y la calidad de los embriones producidos.

## RESULTADOS

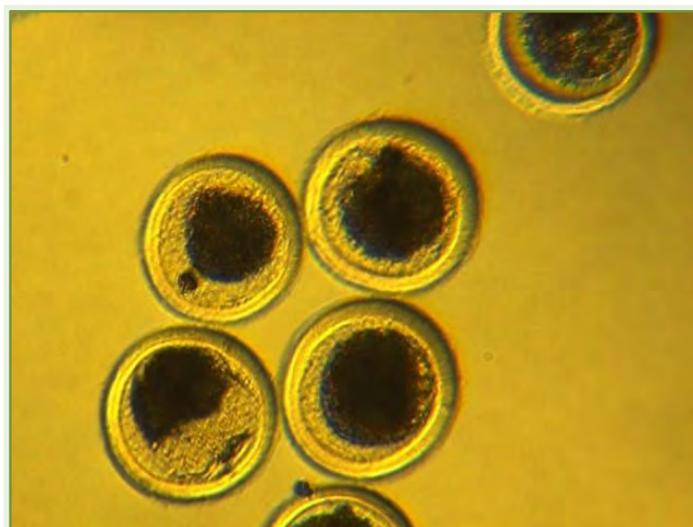
Los resultados mostraron una mayor concentración espermática móvil cuando se utilizó el método “*nadando hacia arriba*” (Swim up) que con Gradiente de Percoll® (4,8 x 10<sup>6</sup> vs 3,5 x 10<sup>6</sup>). Otros autores reportan una mayor concentración espermática cuando utilizan Gradiente de Percoll®, lo que podría deberse a que en la técnica de Swim-up los espermatozoides motiles deben migrar al medio de cultivo, mientras que en Gradiente de Percoll® la selección es por centrifugación y se seleccionan espermatozoides con motilidad progresiva más heterogénea, así como también espermatozoides inmóviles (Englert et al., 1992 Parrish et al., 1995; De los Reyes et al., 1996).

La mayor tasa de fertilización se logró con el método Swim-up (83,68% ± 7,8), mientras que con Gradiente de Percoll® la tasa fue de 60,22% (± 6,3), concordando con los resultados logrados por Parrish et al. (1995), quienes indican que utilizando Swim-up se pueden alcanzar tasas de fertilización de hasta 74% mientras que con Gradiente de Percoll® se pueden lograr medias de 52%.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que ambas metodologías utilizadas para la separación de la fracción espermática motil son eficaces en la producción de embriones *in vitro* (Figura 5).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**Figura 5. Embriones transferibles producido en el laboratorio de biotecnología animal fertilizado utilizando el método de swim up**

#### REFERENCIAS

- Austin, C.R. 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Austr. J. Sc. b4, 581 - 96.
- Barros, C., y Berríos, M. (1977). Is the activated spermatozoon really capacitated? J. Exp. Zool. 201, 65 - 72.
- Bedford, J.M., y Cooper, G.W. (1970). Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate eggs. En: Membrane Fusion. Poste, G. & Nicholson, G. L. (Eds). Amsterdam: Elsevier. p. 65 - 125.
- De Leon-Garcia, R. H, González, R.A., y Guerra, P. (2012). Manual técnico para la producción de embriones *in vitro*. Instituto De Investigación Agropecuaria De Panamá. 38 p.
- Chang, M. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposits into the fallopian tubes. nature 168, 697-698.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- De Los Reyes, M., Almendra, C., Berland, M., Del Campo, H., y Barros, C. (1996). Selección de espermatozoides de toro para fecundación *in vitro*. Arch. Med. Vet. 1, 31-38.
- Englert, Y., Van Den Bergh, M., Rodesch, C., Bertrand, E., Biramane, J.Y., y Legreve, A. (1992). Comparative auto-controlled study between swim-up and percoll preparation of fresh semen samples for *in-vitro* fertilization. Human Reproduction, 7(3), 399-402.
- Fraser, L. (1992). Requirements for successful mammalian sperm capacitation and fertilization. Arch. Pathol. Lab. Med. 116, 345-350.
- Lliteras, E. (2007). Manual de Fertilización *in vitro*. La Habana, Cu. Centro de Investigación y Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical. p. 55.
- Montes, I. (2008). Manual de Semen. Centro de Investigación para el Mejoramiento Animal y Ganadería Tropical. C.I.M.A.T.G.T. La Habana, Cuba. Inédito.
- Morrow, D.A. (1986). Current therapy in theriogenology 2° Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1143 p.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., y First, N.L. (1995). *In vitro* fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swim-up Separated frozen- thawed bovine semen is repetable and results is high frequencies of fertilization theriogenology.
- Parrish, J.J., y Foote, R.H. (1987). quantification of bovine sperm separation by a swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. J. Androl. 8, 259-266.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Winer, A., y First, N.L. 1988. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. Bio. Reprod. 38, 1171-1180.
- Parrish J.J., Susko-Parrish, J.L., Handrow, R.R., Sims, M.M., y First N.L. (1989). Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biol Reprod 1989; 40, 1020-1025.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- Pereira, R.J., Tuli, R.K., Wallenhorst, S., y Holtz, W. (2000). The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore a23187 on *in vitro* induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology*, 54, 185- 192.
- Roldan, E., y Harrison, R. (1990). Molecular mechanism leading to exocytosis during the sperm acrosome reaction. En: *Fertilization in mammals*. Serono Symposia, U.S.A. Bavister, B.D., Cummins, J. & Roldan, E.R. (Eds), pp. 179-195.
- Rosenkrans, C.F., Zeng, G.Q., Namara, G.T., Schoff, P.K., y First, N.L. (1993). Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*.
- Saeki, K., Hoshi, K., Leibfreidrutledge, M.L., y Fisrt, N.L. (1990). *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available FSH. *Theriogenology*, 34, 1035-1039.
- Shamsuddin, M., y Rodriguez-Martinez, H. (1994). A simple, nontraumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *Anim. Reprod. Sci.* 36, 61-75.
- Van Soom, A., y De Kruif, A. (1996). oocyte maturation, sperm capacitation and preimplantation development in the bovine: Implications for *in vitro* produciton of embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 687- 701.
- Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., y Diezman, A.B. (2002). *J. Reprod. Immunol.* 53, 133-150.
- Yanagimachi, R. (1988). *Mammalian Fertilization*. En: *The Physiology of Reproduction E*. Knobil Y J.D. Neilly (Ed) 1, 135–185.
- Yanagimachi, R. (1989). Sperm capacitation and gamete interaction. *J. Reprod. Fertil.* 38 (Suppl.) 27-33.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

### LISTA DE COMPROBACIÓN PARA LA PREPARACIÓN DE ENVÍOS

Como parte del proceso de envío, los autores/as están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. Se devolverán a los autores/as aquellos envíos que no cumplan estas directrices.

- El envío no ha sido publicado previamente ni se ha sometido a consideración por ninguna otra revista (o se ha proporcionado una explicación al respecto en los Comentarios al editor/a).
- El archivo de envío está en formato OpenOffice y Microsoft Word.
- Siempre que sea posible, se proporcionan direcciones DOI o URL para las referencias.
- El texto tiene interlineado a espacio y medio; 11 puntos de tamaño de fuente arial; se utiliza cursiva en lugar de subrayado (excepto en las direcciones URL); y todas las ilustraciones, figuras y tablas se encuentran colocadas en los lugares del texto apropiados, en vez de al final.
- El texto se adhiere a los requisitos estilísticos y bibliográficos resumidos en las [Directrices del autor/a](#), que aparecen en Acerca de la revista.

### A. NORMAS GENERALES

La revista Ciencia Agropecuaria publica artículos científicos originales realizados en cualquier área de las ciencias agropecuarias.

Los escritos deben ser redactados en español y enviados vía correo electrónico a [cienciaagropecuaria@idiap.gob.pa](mailto:cienciaagropecuaria@idiap.gob.pa) (solicitar confirmación de lectura). La presentación en otro idioma deberá ser consultada previamente con el editor principal de la revista. Deben ser de interés para un público especializado, redactados en prosa científica y comprensible al lector.

Los trabajos que ingresan a la revista son revisados, evaluados, que cumplan con el formato establecido (formato de revisión). Una vez ajustados al formato de la revista, son enviados a especialistas (revisión de pared) y con dos dictámenes positivos se acepta la incorporación del trabajo al índice en curso.

Aquellos trabajos que no se ajusten a las normas para autores y formato de revisión (disponibles en: <http://www.idiap.gob.pa/download/formato-de-revision/?wpdmdl=916>) serán devueltos a los autores para los respectivos ajustes, antes de ser considerados para evaluación y los aceptados serán publicados bajo el entendimiento de que el material presentado es original e inédito, siendo los autores los únicos responsables por la veracidad y exactitud de las afirmaciones y datos

presentados. Además, la revista provee acceso libre inmediato a su contenido en el principio de que hacer disponibles gratuitamente investigaciones al público apoya a un mayor intercambio de conocimiento global.

Los trabajos deben enviarse vía correo electrónico a [cienciaagropecuaria@idiap.gob.pa](mailto:cienciaagropecuaria@idiap.gob.pa) y su envío debe incluir carta de presentación del artículo, el documento, formato de revisión, declaración de inédito, aprobación de los autores y de las instituciones participantes mencionadas en el documento.

Todos los trabajos deben incluir título, autores, resumen y palabras claves, tal como se describen en el artículo.

Los trabajos deben ser preparados en el procesador de texto Microsoft Word, en letra arial, tamaño 11, a espacio y medio. Márgenes superior e inferior de 2,5 cm (1 pulgada) e izquierdo y derecho de 3,05 cm (1,2 pulgadas) y un máximo de 25 páginas.

Los nombres científicos deben ser escritos en cursiva, mayúscula inicial para el género y la especie en minúscula; para la familia se debe escribir en regular o normal (en Word) con mayúscula inicial. Las abreviaturas y signos redactados con base en el Sistema Internacional de Unidades (SI), también llamado Sistema Internacional de Medidas, usado internacionalmente y basado en el sistema métrico decimal.

Los cuadros y figuras (gráficos, dibujos, esquemas, diagramas) se presentan en secuencia lógica de acuerdo al texto. Adicional, deben aparecer en archivos aparte en original y las fotos en formato JPG o TIF. El tamaño de la fuente igual que el texto en negrita. Los cuadros y leyendas de las figuras deben ser enumerados en arábigo por orden de referencia en el texto.

## **Citación**

La literatura citada se basa en la norma implementada por la Normas APA (7<sup>a</sup> ed.) para la estructuración de la lista de referencias bibliográficas.

Sánchez, C. (11 de diciembre de 2019). Actualizaciones en la 7ma (séptima) edición de las Normas APA. *Normas APA (7ma edición)*. <https://normas-apa.org/introduccion/actualizaciones-en-la-7ma-septima-edicion-de-las-normas-apa/>

## **Generalidades**

- Evitar el uso de referencias de datos no publicados, ya que no se encuentran con la disponibilidad para los lectores que deseen acceder a esas fuentes.
- Las referencias bibliográficas en el texto deben aparecer citadas en idioma español independiente del idioma de origen de la fuente.
- En la literatura cita las referencias deben redactarse de acuerdo con el idioma de origen de la misma.

- No se aceptan referencias bibliográficas que tengan más de diez años de antigüedad, a menos que sea indispensable o sea trabajos clásicos que mantienen su vigencia en el tiempo.
- Evitar más de tres citas para apoyar una idea o información.
- Las citas en el texto según APA la cita parentética menciona separando con una coma el apellido del primer autor del año; si son dos autores el apellido de cada autor va separado por “y”, finalmente cuando se trata de referencias con más de dos autores, se menciona el apellido del primer autor seguido de “et al.”.

Ejemplos:

<b>Tipo de autor</b>	<b>Cita parentética</b>	<b>Cita narrativa</b>
Un autor	(Fernández González, 2010)	Fernández González (2010)
Dos autores	(Echeita y Serrano, 2019)	Echeita y Serrano (2019)
Tres o más autores	(Blanco et al., 2019)	Blanco et al. (2019)
Autor corporativo o institucional con siglas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primera cita</li> <li>• Citas sucesivas</li> </ul>	(Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016) (OMS, 2016)	Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) OMS (2016)
Autor corporativo o institucional sin siglas	(Colegio Oficial de la Psicología de Madrid, 2020)	Colegio Oficial de la Psicología de Madrid (2020)

### **Casos especiales:**

- Citas múltiples de un mismo autor y fecha: (Rodríguez, 2007a) o Rodríguez (2007b)
- Autores con apellidos iguales (se incluye la inicial del nombre): (J.M. Taylor, 2015; T. Taylor, 2014)
- Traducciones: (Piaget, 1966/2000) o Piaget (1966/2000)

## Citas textuales:

En este tipo de citas debemos incluir autor, año y número de página/s. Si el trabajo no está paginado indicar sección o párrafo en el que se encuentra la información.

- Menos de 40 palabras: introducir en el texto la información entrecomillada.
- Más de 40 palabras: introducir la información en párrafo aparte con margen de 5 espacios y sin utilizar comillas.
- Cita textual extraída de una página: (Blanco et al., 2019, p. 252)
- Cita textual extraída de más de una página: (Blanco et al., 2019, p. 252-253)
- Cita textual sin numeración de página: (Blanco et al., 2019, párr. 3)

## Redactar referencias en APA

### Libro en papel

Echeita, G., y Serrano, G. (2019). Educación inclusiva: el sueño de una noche de verano. Octaedro.

### Libro electrónico

Pichardo Galán, J., y St. fano Barbero, M. (Eds.). (2015). *Diversidad sexual y convivencia: una oportunidad educativa*. Universidad Complutense de Madrid. [http://eprints.ucm.es/34926/1/Diversidad\\_y\\_convivencia\\_2015\\_FINAL.pdf](http://eprints.ucm.es/34926/1/Diversidad_y_convivencia_2015_FINAL.pdf)

### Capítulo de libro

Gilmartín, M. A. (2008). Ambientes escolares. En J. A. Aragonés y M. Amérigo (Eds.), *Psicología ambiental* (pp. 221-237). Pirámide.

### Entrada en diccionario o enciclopedia

American Psychological Association. (n.d.). Educational Psychology. En *APA dictionary of psychology*. Recuperado 26 Junio, 2020, de <https://dictionary.apa.org/educational-psychology>

### Artículo de revista en papel

Rodríguez, C. (2007). God's eye does not look at signs. Early development and semiotics. *Infancia y Aprendizaje*, 30(3), 343-374.

## Artículo de revista electrónica

- Artículo de revista con paginación y doi

Blanco, M., Veiga, O. L., Sepúlveda, A. R., Izquierdo-Gomez, R., Román, F. J., López, S., y Rojo, M. (2019). Ambiente familiar, actividad física y sedentarismo en preadolescentes con obesidad infantil: estudio ANOBAS de casos-controles. *Atención Primaria*, 52(4), 250-257. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2018.05.013>

- Artículo de revista con identificador electrónico (eLocator)

Buring, D., Kilteni, K., Rabuffetti, M., Slater, M., y Pia, L. (2019). Body ownership increases the interference between observed and executed movements. *PLOS ONE*, 14(1), Article e0209899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209899>

## Comunicación en Congreso

Alonso-Vega, J., Álvarez-Iglesias, A., Ávila-Herrero, I., y Froxán-Parga, M. X. (2019, junio 18). *Verbal interaction analysis of the intervention to an adult with severe behavioral problems* [Presentación de póster]. XVI European Congress of Psychology, Moscú, Rusia. <https://doi.org/10.26226/morressier.5cf632bbaf72dec2b055469e>

## Legislación

Ley Orgánica 8/2013, de 9 de diciembre, para la mejora de la calidad educativa. *Boletín Oficial del Estado*, 295, de 10 de diciembre de 2013, 97858-97921. <http://www.boe.es/boe/dias/2013/12/10/pdfs/BOE-A-2013-12886.pdf>

## Test

Wechsler, D. (2005). *Escala de inteligencia de Wechsler para niños-IV (WISC-IV): Manual técnico y de interpretación*. TEA

## Página web

Organización Mundial de la Salud. (2016, Abril). *Preguntas y respuestas sobre los trastornos del espectro autista (TEA)*. <https://www.who.int/features/qa/85/es/>

## Tesis doctoral o trabajo académico

Fernández González, A. (2010). La inteligencia emocional como variable predictora de adaptación psicosocial en estudiantes de la Comunidad de Madrid [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid]. Biblos-e Archivo. <http://hdl.handle.net/10486/4872>

## **Audiovisuales**

TED. (2018, Septiembre 24). *Paolo Bortolameolli: ¿Por qué nos emociona la música?* [Vídeo]. YouTube. <https://youtu.be/ulDYtj8kQUs>

## **Redes Sociales**

- Perfil de Twitter

APA Style [@APA\_Style]. (n.d.). *Tweets* [Perfil de Twitter]. Twitter. Recuperado Junio 19, 2020, de [https://twitter.com/APA\\_Style](https://twitter.com/APA_Style)

- Tweet

APA Education [@APAEducation]. (2018, Junio 29). *College students are forming mental-health clubs-and they're making a difference@washingtonpost* [Imagen con enlace adjunto] [Tweet]. Twitter. <https://twitter.com/apaeducation/status/1012810490530140161>

- Página de Facebook

Colegio Oficial de la Psicología de Madrid. (n.d.). *Home* [Página de Facebook]. Facebook. Recuperado Junio 19, 2020, de <https://es-es.facebook.com/Colegio-Of-de-la-Psicolog%C3%ADa-de-Madrid-155367554511985/>

## **No debe incluir lo siguiente:**

Hay algunos tipos de trabajos que no deben ser incluidos en la lista de referencias. Por lo general, la razón por la cual no se incluye un trabajo es porque los lectores no podrán recuperarlo o porque la mención es tan amplia que los lectores no necesitan una entrada en la lista de referencias para comprender el uso.

Menciones generales de páginas web completas, publicaciones periódicas completas no requieren citas en el texto o entradas en la lista de referencias porque el uso es amplio y la fuente es familiar.

Las comunicaciones personales como correos electrónicos, llamadas telefónicas o mensajes de texto se citan solo en el texto, no en la lista de referencias, porque los lectores no pueden recuperar las comunicaciones personales.

Las frases o mensajes de eventuales entrevistados en la investigación pueden ser presentadas y discutidas en el texto, pero no necesitan citas ni entradas en la lista de referencias. En este caso, no es necesario una cita y su respectiva referencia porque las frases son parte de su investigación original. Además, también podrían comprometer la confidencialidad de los participantes, lo cual es una violación ética.

La fuente de una dedicatoria generalmente no aparece en la lista de referencias a menos que el trabajo sea un libro o revista académica. Por ejemplo, si agregas al comienzo de tu documento una cita inspiradora de un famoso, la fuente de la cita no aparece en la lista de referencia porque la cita está destinada a establecer el escenario para el trabajo, y no para justificar un punto clave.

## Formato

La lista de referencias debe iniciar en una nueva página separada del texto. El título de esta página debe ser "Referencias" y debe estar centrado en la parte superior de la página. La palabra Referencias debe ir en negrita.

Las referencias deben estar organizada en orden alfabético de acuerdo con el apellido y las iniciales del nombre del primer autor.

Recordar: Debe redactar lo que desea resaltar de la información y luego presentar la cita, igual para los cuadros, figuras e imágenes. Los artículos que mencionen productos químicos, deberán hacerlo por el nombre genérico o ingrediente activo.

## B. NORMAS ESPECÍFICAS

### 1. ARTÍCULOS

Se estructurará de la siguiente forma: Título (español e inglés), autores (afiliación, dirección, correo electrónico en pie de página), resumen y palabras claves en español e inglés, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones, bibliografía, cuadros y figuras. Extensión máxima de 25 páginas, incluyendo cuadros, figuras, fotos y referencias.

1. **Título:** En mayúscula cerrada y centrado, debe expresar en 15 palabras el contenido, las materias y conceptos clave. Se proporcionará en español e inglés. Indicar en pie de página si fue tesis, proyecto, entre otros.
2. **Autores:** Debe indicar el nombre completo y sus dos apellidos sin abreviar y separados por un guion, centrado, después del título, se indicarán en orden, primer autor e indicar en el pie de página la afiliación de cada autor, Institución o Compañía en la que labora (nombre completo y siglas entre paréntesis), dirección o correo electrónico y en caso de contar con el apartado postal incluirlo.
3. **Resumen:** En español e inglés. Debe ser breve y evitar exceder de 5% (aproximadamente 250 palabras) del texto principal Incluye el objetivo de la investigación, método experimental, los resultados más importantes y las conclusiones. El resumen debe ser lo suficientemente explícito para que el lector obtenga un conocimiento exacto del contenido. Esto es esencial para el resumen en inglés.

4. **Palabras claves:** Un máximo de cinco palabras, pueden ser compuestas, y las mismas, deben permitir identificar la temática y evitar repetir las palabras del título.
5. **Introducción:** Debe ser breve y contendrá los antecedentes más importantes o relevantes de la investigación, el estado actual del tema objeto de la investigación, la problemática (alcances y limitaciones) y las razones por las cuales se hizo el planteamiento. Debe redactar lo que desea resaltar de la información y luego presentar la cita, igual para los cuadros y figuras.
6. **Materiales y métodos:** Se expondrá de forma concisa, los materiales utilizados y la metodología. Se deberá presentar los detalles necesarios para que el lector interesado pueda repetir la parte experimental, con indicación de sobre los datos agro meteorológicos, diseño y métodos de análisis estadísticos empleados. Para los procedimientos ya descritos en la literatura, deben ser citados y sólo se aceptará la mención de modificaciones sustanciales.
7. **Resultados y discusión:** Se dan a conocer los datos obtenidos más importantes. Estos deben presentarse en la forma más concisa posible, (si es necesario se utilizarán subtítulos, si son varios los factores que intervinieron en el estudio). Las figuras y cuadros deben ser elementos de apoyo a los resultados y no deben repetir la información que aparece en el texto. Los promedios y señalamientos de diferencias significativas deben acompañarse de las indicaciones de la variación relativa y probabilidad alcanzada. En la discusión de resultados se señalan las relaciones entre los hechos observados. Debe indicarse el significado de los hechos, las causas, los efectos e implicaciones.
8. **Conclusiones:** En esta sección se presentan los hechos significativos en forma clara y lógicamente. Las conclusiones deben dar respuesta a los objetivos descritos en la introducción.
9. **Referencias:** Se incluirá sólo la literatura citada tomando en cuenta la Norma APA (7<sup>a</sup>) para la estructuración de la lista de referencias bibliográficas y se acepta con un mínimo de 10 citas.
10. **Agradecimiento:** (Opcional) Para efecto de reconocimiento del autor a personas e instituciones que hayan colaborado en la información del manuscrito, sus nombres deberán presentarse en esta sección.

## 2. NOTAS CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS

1. **Notas científicas:** Serán considerados aquellos escritos basados en aspectos experimentales, investigaciones terminadas o en curso, de cualquier tipo, que presenten un aspecto metodológico novedoso, con resultados que el autor decida comunicar, en este estilo, por considerarlo importante.
2. **Notas técnicas:** Serán considerados aquellos escritos que presenten: (1) Descripción de una nueva técnica de producción; (2) Estudios preliminares de caracterización de nuevos criterios de selección; (3) Resultados o logros sobresalientes de un programa (4) Temas de interés, científico y tecnológico. Se estructurará de igual forma que el artículo: Título (español e inglés), autores (identificación y lugar de trabajo en pie de página), resumen y palabras claves en

español e inglés, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones, Referencias, cuadros y figuras. Extensión máxima de 10 páginas en Word con el mismo formato y márgenes solicitados en el artículo e incluyendo cuadros, figuras y referencias bibliográficas. Los cuadros no deberán ser más de 3.

### **3. COMUNICACIONES CORTAS**

Las comunicaciones cortas son reportes de significado, urgencia e interés, pero deben contener resultados preliminares relevantes. Una extensión máxima de 10 páginas en Word. La introducción debe indicar la urgencia, el significado o el interés extraordinario de la información, lo cual ayudará al cuerpo editorial en la aceptación o rechazo de la comunicación. No debe ser estructurada de la misma manera que un artículo, debe contener una introducción breve sobre el tema y los resultados más importantes. Si se describe un trabajo sintético, se debe agregar suficiente material suplementario con el fin de quien lo desee pueda replicar la metodología.

Incluir: Título (español e inglés), autores (identificación y lugar de trabajo en pie de página), resumen y palabras claves en español e inglés.

### **4. ENSAYOS Y REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS**

Se estructurarán de la siguiente forma: Título (español e inglés), autores (identificación y lugar de trabajo en pie de página), resumen y palabras claves en español e inglés, introducción, subtítulos y referencias bibliográficas. Podrá ser presentado en otro idioma, previa consulta con el editor principal de la revista. Debe tener una extensión máxima de 25 páginas en Word con el mismo formato y márgenes solicitados en el artículo científico e incluyendo cuadros, figuras y no menos de 50 referencias bibliográficas.

