

Rev. FCA UNCuyo. Tomo XXXIX. N° 1. Año 2007. 83-91.



Las yemas, principal reservorio de levaduras entre los órganos aéreos vegetativos y reproductivos de la vid (*Vitis vinifera* var. Malbec).¹

Buds, main reserve of yeasts between vegetative and reproductive aerial organs of *Vitis vinifera* var. Malbec.

Claudia V. Lúquez Bibiloni²
Juan Carlos Formento³
Eduardo Díaz Peralta⁴

Originales
Recepción: 04/12/2006
Aceptación: 09/04/2007

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue suministrar nueva evidencia acerca del modelo de permanencia de las levaduras en el ciclo natural de la vid. Se efectuó la observación, la medición del número de levaduras y la descripción morfológica de los diferentes órganos aéreos de la vid. Se procedió a la recolección aséptica de muestras a campo, en yema en actividad, yema en reposo, hoja joven, hoja adulta, ritidomis, zarcillo, capullo floral, flor y fruto. Los resultados revelaron dos momentos de máxima población de levaduras: en yema cerrada a fines de otoño y en yema terminal abierta a mediados de verano. La evolución de las levaduras en función de la superficie del fruto mostró poca relación entre ambas variables, por lo que el valor a considerar sería la cantidad de levaduras por baya como unidad. La ritidomis exhibió valores muy uniformes a lo largo del ciclo vegetativo, asumiendo desde esta perspectiva el papel de reservorio de moderada importancia.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to provide new evidence about the model of permanence of yeasts of the grapevine in the natural cycle. It was carried out the observation, measurement of number and morphologic description of different aerial organs from the grapevine. It was come to the aseptic harvesting from samples in field of bud in activity, bud in rest, young leaf, adult leaf, bark, tendril, flower bud, flower, fruit. The results revealed two moments of maximum population of yeasts: in closed bud by the end of autumn and opened terminal bud in the middle of summer. The evolution of yeasts in the fruit referred to the surface of the berry showed little relation between both variables, whereas the value to consider would be the amount of yeasts by berry as unit. Bark displayed very uniform values throughout the vegetative cycle, assuming from this perspective the role of reserve of moderate importance.

Palabras clave

levaduras de la vid • ecología • morfología • anatomía de la vid • cepaje • vinos varietales • fermentación natural • ciclo biológico

Keywords

grapevine yeasts • ecology • morphology • anatomy of grapevine • vinestock • varietal wines • natural fermentation • biologic cycle

- 1 Trabajo presentado en el XXIX Congreso Mundial de la Viña y el Vino. OIV 2006. Logroño, España.
- 2 Cátedra de Botánica Agrícola. Dpto. de Ciencias Biológicas.
- 3 Cátedra de Enología II e Industrias Afines. Dpto. de Ciencias Enológicas y Agroalimentarias.
- 4 Cátedra de Enología I. Dpto. de Ciencias Enológicas y Agroalimentarias.
Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina.
M5528AHB. ccea@fca.uncu.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica de los mostos es efectuada por las levaduras provenientes normalmente de las uvas. Diversos trabajos sobre ecología de las levaduras confirman la presencia de especies del género *Saccharomyces sp.*, por lo que se han extendido los procesos de fermentación realizados con cepa pura (1).

El mosto de uva es un medio de cultivo diferencial por tener una elevada concentración de azúcares -distribuidos en cantidades semejantes entre glucosa y fructosa, siendo ambos azúcares fermentables por la levadura- y una fuerte acidez (pH = 3,5), que dificulta el crecimiento de bacterias. La curva de crecimiento sigue un patrón característico con fases inicial, exponencial, estacionaria y de declinación o muerte. La fase de crecimiento no es exponencial real más que durante un corto intervalo, en el cual las levaduras sólo se multiplican durante 6 ó 7 generaciones. En condiciones enológicas se observa sistemáticamente un desacoplamiento entre la fase de crecimiento y el consumo de azúcares, pues una considerable proporción de éstos es consumida durante la etapa estacionaria (12).

Se acepta que las levaduras viven en asociación con la vid, hallándose usualmente sobre la corteza, las hojas, las flores y en la pruina de la baya (2, 11, 13). Su crecimiento sobre la superficie de las bayas está determinado por diversos factores ambientales (temperatura, humedad), así como por el grado de madurez y el estado sanitario. Las paredes externas de las células epidérmicas están revestidas por la cutícula y las ceras epicuticulares, delgadas fibrillas que sirven de alojamiento a las levaduras. Las ceras se inician como pequeñas plaquetas verticales en el momento de la floración, para alcanzar 0,1 μ de diámetro en la madurez, con bordes lobulados, desordenadamente superpuestas formando una capa hidrofóbica de varios micrones de espesor (6, 8). Se conforma así una compleja red de canales capilares, cuya longitud es mucho mayor que el espesor de la capa de cera (3). Las levaduras quedarían atrapadas en estos microcapilares (9). Las levaduras se reconocen fácilmente y no pueden ser confundidas con otros microorganismos debido a su tamaño, la formación de pseudomicelio y, sobre todo, debido a su capacidad de gemación (2).

La diversidad de métodos empleados para investigar la ecología de las levaduras de la vid impone considerar rigurosamente las frecuencias de las diferentes especies (2, 7). Poco se ha investigado sobre la ecología de las levaduras en las vides argentinas. Su presencia en cada cepaje incide en las características distintivas de los vinos varietales y les otorgan sus rasgos particulares de calidad. La obtención de vinos de excelencia contempla el proceso de fermentación natural llevado a cabo por levaduras privativas de cada variedad (4).

Diversos trabajos ecológicos (7, 9) han adherido a la hipótesis, originalmente propuesta por Pasteur y aceptada universalmente, según la cual las levaduras del vino se hallan omnipresentes en la naturaleza y tienen propensión a prosperar en los suelos de los viñedos. Desde esta perspectiva, el suelo asumiría el rol de refugio de levaduras seleccionadas durante años, con propiedades enológicas favorables,

Yemas de vid, principal reservorio de levaduras

para fermentar los mostos de la variedad cultivada en ese lugar. No obstante, los resultados de los diversos estudios son contradictorios: no existen evidencias concretas que avalen este modelo de circulación, ya que aun actualmente se discute cómo sobreviven las levaduras durante el invierno y cómo pasan a la superficie de las uvas maduras, para reiniciar el ciclo en el momento en el que las mismas son cosechadas y llevadas a la bodega.

Objetivos

- Realizar una investigación que permita suministrar nueva evidencia acerca de la interacción entre la planta de vid y las levaduras, a lo largo del ciclo vegetativo en sus diferentes etapas.
- Exponer en forma precisa el modelo de circulación y permanencia de las levaduras en la parte aérea de la planta de vid.
- Cuantificar la distribución de las levaduras sobre la superficie de los diferentes órganos, tanto del trofotagma (parte aérea vegetativa) como del antotagma (parte reproductiva).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó en plantas de la variedad Malbec, cultivadas en sistema de espaldero alto, en la parcela experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo), ubicada a 960 msnm (33° 00' 38,23" S; 68° 52' 37,58" O) en Chacras de Coria, Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Se realizó un seguimiento fenológico a lo largo del ciclo vegetativo. Se llevó a cabo un muestreo sistemático eligiendo los individuos de la muestra a intervalos iguales a partir de un caso elegido al azar. Se extrajeron muestras de los diversos órganos de la parte aérea de la planta, recolectadas asépticamente, cada 15 días y por un lapso de 12 meses.

Cada muestra se recolectó por separado, con 6 repeticiones, coordinadamente extraídas para asegurar su comparación, tomando al azar todos los órganos de cada punto de muestreo según su disponibilidad temporal: yema terminal, yema lateral, hojita más joven (junto al meristema apical), hoja adulta, inflorescencia con capullos y con flores en anthesis (sin caliptra), baya, zarcillo y ritidomis.

Se privilegió el mosto de uva por ser un medio de cultivo diferencial debido a su bajo pH (3,5), que previene el desarrollo de bacterias, y a su elevado contenido de azúcares fermentables por las especies de levaduras asociadas con la vinificación. Los tubos con las muestras en mosto diluido se sometieron a agitación para provocar el desalojo de las levaduras adheridas a la superficie y se colocaron en estufa a 25 °C. Se procedió al conteo, observación y descripción de las levaduras por microscopía. Los resultados se refirieron a 1 cm² de superficie para cada órgano considerado.

RESULTADOS

La planta de vid presenta crecimiento acrópeto, es decir, entran en actividad preferentemente las yemas más alejadas del origen del brote. Todas las yemas de la vid son axilares, sus hojas portadoras pueden estar más o menos desarrolladas. La yema está protegida por escamas externas de color pardo (péculas). El cono primordial termina en el meristema apical y está envuelto por los primordios foliares, cada uno con estípulas cubiertas de abundante lanosidad.

La evolución de la presencia de levaduras en los órganos aéreos de la planta de vid muestra que se dan dos momentos de máxima cantidad de levaduras a lo largo del ciclo vegetativo: en yema cerrada a fines de otoño, con $38,75 \times 10^6$ lev/cm² y en yema terminal abierta con $43,75 \times 10^6$ lev/cm², así como en yema axilar a la hoja adulta con $38,25 \times 10^6$ lev/cm², a mediados de verano. Próximo a iniciar el invierno, la planta entra en receso vegetativo y disminuye la cantidad de levaduras. El mínimo en las yemas se da al inicio de la primavera, cuando ocurre la brotación de las yemas para producir pámpanos, hojas y flores, con la consiguiente expansión vegetativa de la planta. Sólo durante el período primaveral, las yemas son superadas por la ritidomía en cuanto a cantidad de levaduras/cm². Estos datos evidencian la importancia de las yemas como reservorios de levaduras a todo lo largo del ciclo vegetativo.

A medida que avanza la primavera, las yemas abiertas (en brotación) que poseían valores muy bajos, sufren un incremento uniforme y alcanzan su punto máximo a mediados de verano. Este momento concuerda con la estabilización de la expresión vegetativa de la planta y el período de maduración de los frutos, aumentando el nivel de azúcares en las bayas. Se aprecia una línea de tendencia muy similar en los valores de las yemas nuevas que surgen en las axilas de las hojas nuevas sobre los pámpanos (brotes verdes), con un valor máximo también a mediados de verano (figura 1, pág. 87).

Durante los meses invernales, las levaduras encuentran refugio en las yemas, protegidas por la pubescencia y la cámara de aire debajo de las péculas. Si se analiza la curva correspondiente a yema cerrada de invierno, se observa una continuidad con las yemas apicales (en brotación) y las yemas axilares a las hojas que se forman en los nuevos brotes (pámpanos) en primavera, uniéndose ambas en una línea de tendencia que sigue una curva polinomial de 2^{do} grado, con un mínimo en el momento de la brotación y un aumento de la masa vegetativa durante la primavera. La hoja presenta una epidermis compleja, con cutícula y ceras epicuticulares, y frecuente vellosidad localizada en las nervaduras mayores, constituida por pelos de los siguientes tipos: 1. tricomas simples uniseriados; 2. simples unicelulares, a veces muy largos produciendo una felpa similar a tela de araña; 3. unicelulares, ramificados; 4. glándulas perladas, estructuras esféricas con un corto pie, e interior con grandes células poligonales, rodeadas por una epidermis con un estoma en el extremo opuesto al pie (10).

La hoja más joven, que surge entre la pubescencia en el punto de crecimiento en la yema junto al meristema apical, muestra incremento en la cantidad de levaduras en el período primavera-verano, con una línea de tendencia de valor de $R^2 = 0,54$. La hoja adulta, ya alejada del meristema apical y tomada de la parte media del pámpano, muestra un valor máximo a mediados del verano, con un valor bajo de $R^2 = 0,37$ (figura 2, pág. 87).

Yemas de vid, principal reservorio de levaduras

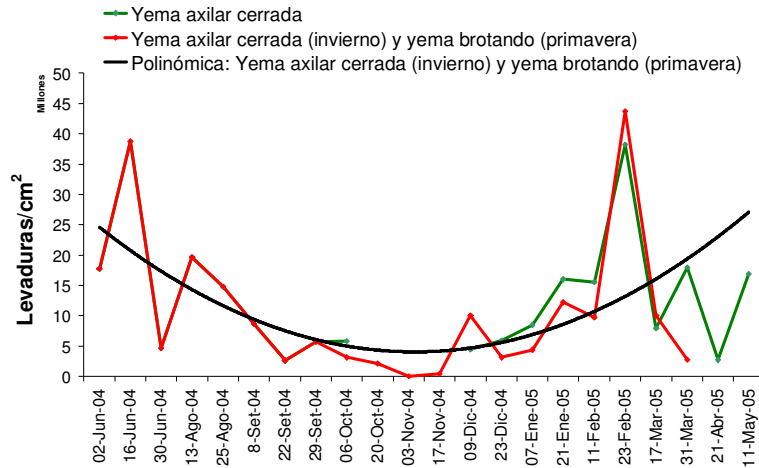


Figura 1. Distribución de las levaduras en las yemas de la vid.

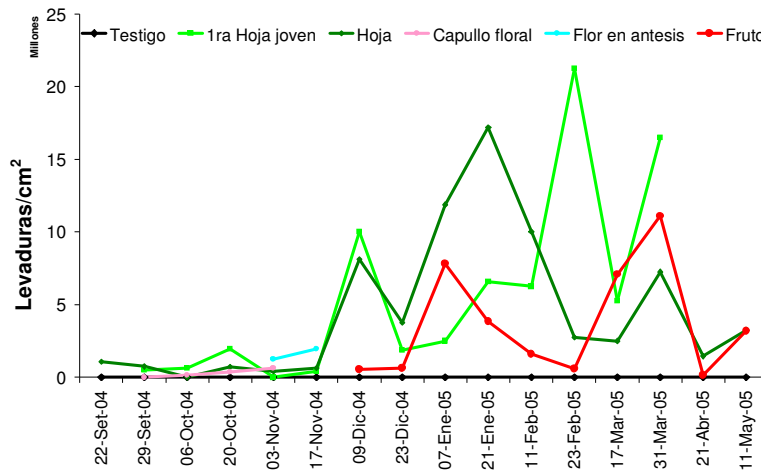


Figura 2. Distribución de las levaduras en hoja, flor y fruto.

Las inflorescencias surgen a principios de la primavera, con las flores con sus órganos sexuales protegidos debajo de la caliptra de pétalos. Se aprecia un significativo aumento de levaduras en el capullo floral, de cero a 625.000, con una línea de tendencia cuyo valor es de $R^2 = 0,99$ (figura 3, pág.88).

La caliptra de la vid está constituida por los pétalos, libres al principio y que se unen al finalizar su desarrollo, para formar una cofia que cubre las anteras y el gineceo. Los pétalos poseen epidermis adaxial y abaxial monoestratificadas, con estomas y cutícula listada. El gineceo forma un solo cuerpo con estigma, estilo y ovario. El estigma exhibe una epidermis glandular papilada, con células que secretan una solución azucarada con compuestos lipídicos y fenólicos. La pared del ovario presenta epidermis externa monoestratificada, con estomas en proporción de 1-2 mm² (8).

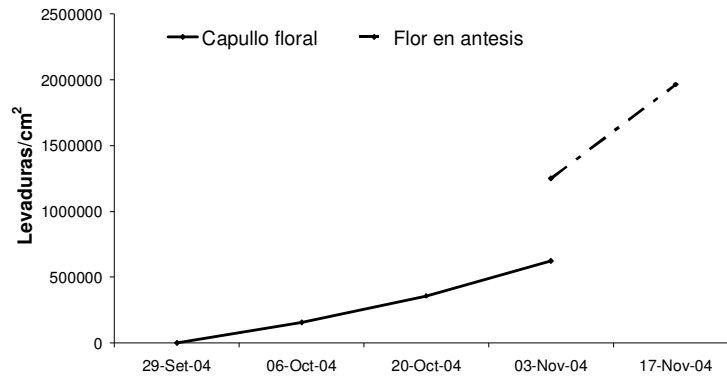


Figura 3. Distribución de levaduras en capullo floral y flor en anthesis.

En la flor en anthesis (ya caída la caliptra) se duplica el número de levaduras (de $1,25 \times 10^6$ a 2×10^6). Una vez producido el cuaje de la flor se inicia el crecimiento de la baya, en el período comprendido entre fines de la primavera y principios del verano. El racimo de vid puede dividirse en tres zonas: **el escobajo**, cuya epidermis posee estomas funcionales y la cutícula se halla desprovista de ornamentaciones; **el pedicelo**, con una zona angosta desprovista de estomas funcionales, y la zona del rodete, con cutícula lisa, ceras cuticulares lamelares apiladas y yuxtaposición de lenticelas con numerosas fracturas; **la baya**, con estomas no funcionales que presentan una aureola de tejidos peristomáticos con células muertas suberizadas.

La epidermis externa de la baya presenta ceras epicuticulares (pruina), formadas por delgadas fibrillas que sirven de alojamiento a las levaduras, desordenadamente superpuestas, y que constituyen una compleja red de canales capilares (6, 8). La evolución de la superficie de la baya en función del tiempo responde a una curva polinomial de 2^{do} orden, con un valor de $R^2 = 0,97$. A principios del verano, el fruto sufre un aumento sustancial de su superficie, que coincide con una marcada disminución de la cantidad de levaduras/cm². A partir de mediados de febrero cesa notoriamente el aumento de superficie, a medida que se intensifica el grado de madurez de la baya. En este período se aprecia un importante incremento del número de levaduras, hasta fines de marzo, cuando comienza a decrecer, coincidiendo con el descenso de la temperatura en otoño.

La evolución de la cantidad de levaduras en el fruto en función de la superficie de la baya proporciona un valor muy bajo de $R^2 = 0,12$, lo que indica poca o ninguna relación entre ambas variables. De esto se infiere que el valor a considerar es la cantidad de levaduras por baya tomada como unidad, prescindiendo del valor de su superficie. Estos datos coinciden con las investigaciones de Belin (2), según las cuales las levaduras se encuentran en cantidades muy diferentes de acuerdo con la parte de la baya de la vid que se analice. En el escobajo existen muy pocas levaduras; en el rodete del pedicelo hay abundancia de colonias; y en la baya, los estomas y las aureolas peristomáticas son una zona privilegiada por la intensa multiplicación de levaduras. Éstas son más abundantes en las zonas de fractura de tejidos superficiales donde se producen secreciones azucaradas que permiten una multiplicación vegetativa intensa (figura 4, pág. 89).

Yemas de vid, principal reservorio de levaduras

El zarcillo representa, según la teoría simpodial, el tallo principal que se modifica como órgano de sostén de la planta, detiene su crecimiento y es reemplazado por una ramificación que toma su lugar para proseguir el desarrollo del pámpano. Se encuentra ya alejado de la yema apical del tallo de reemplazo. Los valores observados en primavera-verano (setiembre a enero) no superaron 2×10^6 lev/cm². Sin embargo, en el período siguiente, de mediados de verano a mediados de otoño (febrero a mayo) se produjo un notable incremento, alcanzando valores promedio de alrededor de 18×10^6 lev/cm², lo que significa un incremento de 20 veces los valores iniciales. Este fenómeno coincide con el aumento de grosor de los zarcillos y la aparición de peridermis, con el subsiguiente cambio de color verde a castaño (figura 5).

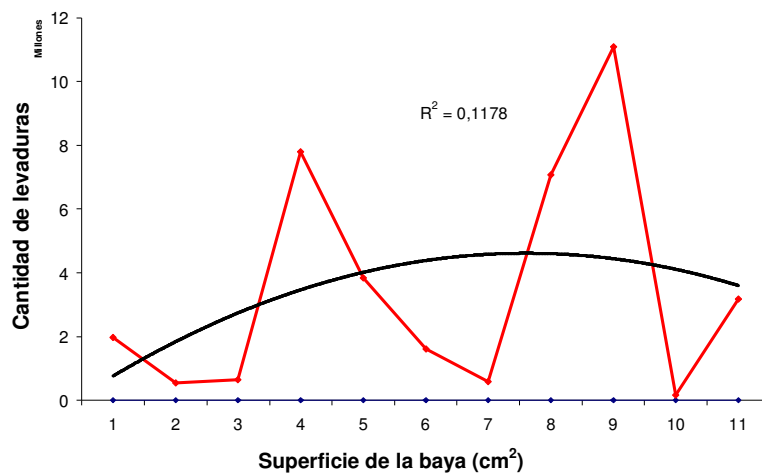


Figura 4. Evolución de la cantidad de levaduras en el fruto.

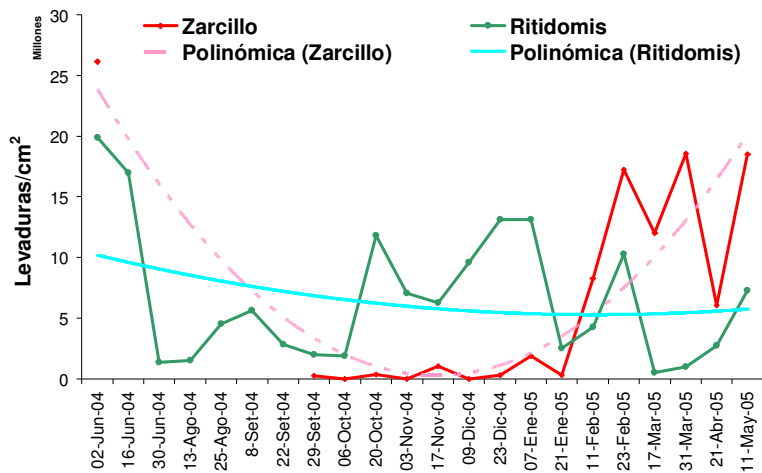


Figura 5. Distribución de las levaduras en zarcillo y ritidomis.

La ritidomis mostró valores muy uniformes a lo largo del ciclo vegetativo, con un promedio de $6,6 \times 10^6$ lev/cm², con un valor de $R^2 = 0,0779$, lo que indica que existe poca o ninguna correlación entre la cantidad de levaduras en la ritidomis y el transcurso del tiempo. La ritidomis asume desde esta perspectiva el papel de reservorio de moderada importancia para las levaduras a lo largo de todo el ciclo vegetativo de la vid.

CONCLUSIONES

- ❖ La presencia de levaduras en los órganos aéreos de la planta de vid, a lo largo del ciclo vegetativo, muestra que se dan dos momentos de máxima cantidad de levaduras: en yema cerrada a fines de otoño y en yema terminal abierta así como en yema axilar a la hoja adulta, a mediados de verano. Estos datos evidencian la importancia de las yemas como reservorios de levaduras, ya que durante los meses invernales éstas encuentran refugio protegidas debajo de las pérulas que cubren el meristema.
- ❖ La evolución en el fruto en función de la superficie de la baya muestra poca o ninguna relación entre ambas variables. De esto se infiere que el valor a considerar es la cantidad de levaduras por baya como unidad, prescindiendo de la relación número de levaduras por unidad de superficie.
- ❖ En los zarcillos se produce un notable incremento a mediados del verano, en coincidencia con el incremento del grosor, y en otoño, con la aparición de la peridermis (cambio de color verde a castaño).
- ❖ La ritidomis exhibe valores muy uniformes a lo largo del ciclo vegetativo, asumiendo desde esta perspectiva el papel de reservorio de moderada importancia.
- ❖ En las inflorescencias que surgen de las yemas a principios de primavera se aprecia un significativo aumento de levaduras en las etapas de capullo floral y de anthesis. Las levaduras presentes en las bayas derivan de las yemas y en éstas perduran a través del tiempo. Esto explica en parte la relación de las levaduras con cada variedad y la importancia de trabajar con levaduras nativas específicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barre, P.; Blondin, B.; Dequin, S.; Feuillat, M.; Sablayrolles, J. M.; Salmon, J. M. 2000. La levadura de fermentación alcohólica. En: Flanzy, Claude. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. AMV Ediciones. Mundi-Prensa. Madrid. 292 p.
2. Belin, J. M. 1972. Recherches sur la répartition des levures à la surface de la grappe de raisin. *Vitis* 11: 135-145.
3. Chambers, T. C.; Possingham, J. V. 1963. Studies of the fine structure of the wax layer of Sultana grapes. *Austr. J. Biol. Sci.* 16: 818-825.
4. Combina, M.; Elía, A.; Mercado, L.; Catania, C.; Ganga, A.; Martínez, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 99: 237-246.
5. Domercq, S. 1956. Étude et classification des levures de vin de la Gironde. Thèse Ingénieur-Docteur. Bordeaux (según Belin, J. M. 1972).

Yemas de vid, principal reservorio de levaduras

6. Formento, J. C.; Rodríguez, J.; Galiotti, H.; Paladino, S.; Lúquez, C. 1999. Mosto concentrado tinto. Nueva variedad de vid para su elaboración. La Semana Vitivinícola. N° 2763/64 del 24/31 de julio de 1999. Sevilla, España. p. 2628-2637.
7. Kunkee, R. E.; Amerine, M. A. 1970. Yeasts in winemaking. In: The Yeasts. III- Yeast Technology. A. H. Rose and J. S. Harrison (Eds.) p. 5-71. Academic Press, London.
8. Lúquez, C. V.; Formento, J. C. 2002. Flor y fruto de vid (*Vitis vinifera* L.). Micrografía aplicada a Viticultura y Enología. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo. 34(1): 109-121.
9. Martini, A.; Ciani, M.; Scorzetti, G. 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. Am. J. Enol. Vitic. 47(4): 435-440.
10. Metcalfe, C. R.; Chalk, L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons. Vol. I. Clarendon Press, Oxford, p. 413-419.
11. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. 2003. Tratado de Enología. Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
12. Salmon, J. M. Relaciones levadura-medio. En: Flanzy, Claude. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. AMV Ediciones. Mundi-Prensa. Madrid. p. 275-284.
13. Van Zyl, J. A.; De W. Du Plessis, L. 1961. The microbiology of South African winemaking. Part I. The yeasts occurring in vineyards, musts and wines. South African Journal of Agricultural Science 4(3): 393-403.

Agradecimiento

A los estudiantes A. M. Fonzar, M. S. Ferrer y M. E. Bertona.



César Campio Sáez
1960 - 2006

**Profesor Adjunto de la Cátedra de Zoología Agrícola
Facultad de Ciencias Agrarias
(1997)**

Nació en el Departamento de San Carlos, Mendoza, el 28 de julio de 1960. Hijo de Campio Sáez y de María Valdés, era el mayor de cuatro hermanos: César, Amalia, Adrián y Laura.

Cursó sus estudios primarios y secundarios en Mendoza, estos últimos en el Liceo Agrícola «Domingo Faustino Sarmiento» de donde egresó con el Título de Bachiller Enólogo en 1979. Ingresó a la Facultad de Ciencias Agrarias y obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo en agosto de 1988. Cuando todavía era alumno inició su actividad docente y de investigación en la Cátedra de Zoología Agrícola: comenzó en mayo de 1985 como Auxiliar de Segunda y al obtener su título universitario fue ascendido a Jefe de Trabajos Prácticos con dedicación exclusiva. En 1990 asumió como Profesor Adjunto (dedicación exclusiva) y en 1992 accedió a dicho cargo por concurso. Posteriormente se desempeñó como Profesor Asociado Interino.

Durante dos períodos integró el Consejo Directivo de esta unidad académica, en representación de los Profesores Adjuntos. Fue director de tesis y profesor en las carreras de postgrado. Fue autor de numerosos trabajos de investigación en su especialidad y becario en diversos proyectos en México, Brasil y Estados Unidos. Participó en varios cursos de capacitación en el exterior: en México en 1991 y en Estados Unidos (Florida) en 1994; en este último se especializó en el empleo de isótopos radioactivos en la lucha contra insectos.

Conjuntamente con su labor universitaria, se desempeñó en la actividad privada, logrando importantes reconocimientos profesionales en el uso de feromonas en el manejo integrado de plagas.

Además de la entomología, gustaba de dedicar su tiempo a la pesca con mosca, actividad en la que incursionaba frecuentemente.

En diciembre de 1994 contrajo matrimonio con Cristina Nidia Pérez y tuvo dos hijos: Victoria, en 1997, y Andrés, en 2001.

Dueño -como lo expresan sus compañeros de trabajo- de una extraordinaria calidez humana, promotor del trabajo armonioso y trato cordial, fue un docente que se hizo querer por los alumnos a quienes les inculcó el interés por la asignatura, lo que hizo que varios de ellos se convirtieran en discípulos destacados y que actualmente se desempeñen en cargos de responsabilidad en distintas empresas de Mendoza.

En 2005 se le detectó una grave enfermedad que sin embargo no diezmó su espíritu; se sometió a un largo tratamiento pero lamentablemente falleció el 7 de diciembre de 2006 a la temprana edad de cuarenta y seis años.

En virtud de una presentación llevada a cabo por los docentes de la Cátedra de Zoología Agrícola, el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias, por Resolución N° 39 del 16 de abril de 2007, accedió a designar el aula de dicha cátedra con el nombre de Prof. Ing. Agr. César Campio Sáez en homenaje a quien fuera ejemplo de vida, tanto personal como profesional.

□. □. □□□□

Fuentes:

Archivo de la Facultad de Ciencias Agrarias.
Manuscrito del Ing. Agr. José Guillermo García Sáez.