

*Sabe a lo
que nunca
has probado!*
Nuevas bebidas instantáneas



Bajo en calorías

Con extracto de
Stevia

Descubrí tu sabor

REVISTA

ENTRE CAÑEROS

NÚMERO 11 AGOSTO 2018

Revista trimestral del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA). Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA)



PRESENTACIÓN

En este nuevo esfuerzo que da continuidad a nuestra misión de informar, les presentamos el número 11 de nuestra revista Entre Cañeros prácticamente a las puertas de celebrar el VII Congreso Técnico de DIECA, y queremos también invitar a nuestros lectores para que participen en este evento que es de asistencia abierta y gratuita para quienes tengan interés de compartir con técnicos, productores, representantes de casas comerciales y otras organizaciones vinculadas al sector azucarero costarricense. Entre las actividades que ofrece este evento está una importante mesa redonda que abordará el tema del registro de nuevos agroquímicos como una limitante que afecta directamente la productividad y la competitividad de la agricultura costarricense, en la que participarán reconocidas personalidades del gobierno y representantes del sector comercial de agroquímicos. También se llevará un día de campo para el cierre del evento, en el que se harán demostraciones de labores agrícolas, equipos, recomendaciones para el manipulación de productos, etc.

En este número les compartimos un profundo análisis del tema de la carga química en la producción de caña de azúcar en Costa Rica, donde se abordan las posibles implicaciones que podría tener para el sector azucarero la implementación de este nuevo indicador. También le brindamos los resultados de un interesante trabajo realizado en DIECA sobre el diagnóstico de dos importantes enfermedades mediante técnicas moleculares. Finalmente presentamos una valoración y análisis de los hábitos de floración de la caña de azúcar en el país, y sus implicaciones para los procesos de hibridación y obtención de nuevas variedades.

Como siempre esperamos que esta publicación sea de su agrado y los incentivamos a que nos hagan llegar sus comentarios a través del correo electrónico echavarria@laica.co.cr.

Ing. Erick Chavarría Soto
Coordinador comité editorial
Revista Entre Cañeros
Correo-e: echavarria@laica.co.cr

CONTENIDO

01

Presentación

06

Carga química activa por uso de agroquímicos en la caña de azúcar

19

Estandarización de la metodología para el diagnóstico molecular de la escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans*) y el raquitismo de retoños (*Leifsonia xyli subsp. xyli*) de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Costa Rica.

43

Evaluación de la Incidencia e Intensidad de la Floración en el Banco de Germoplasma de Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.) en Costa Rica, Durante el año 2016

Revista Entre Cañeros
Número 11, 14 de agosto del 2018.

Publicación técnica gratuita del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar
Producida por la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar.

Avenida 15 y calle 3, Barrio Tournón,
San Francisco, Goicoechea.
10802 San José, Costa Rica.
www.laica.co.cr

Comité Editorial
Ing. Agr. Erick Chavarría Soto, coordinador.
Ing. Agr. Marco A. Chaves Solera.
Ing. Agr. José Daniel Salazar Blanco.
Ing. Agr. Julio César Barrantes Mora.

VII Congreso Tecnológico

del Departamento de Investigación y Extensión
de la Caña de Azúcar (DIECA) Liga Agrícola
Industrial de la Caña de Azúcar



Fecha: miércoles 29, jueves 30 y Viernes 31 de agosto 2018

Lugar: Santa Clara, San Carlos, Alajuela

Sesiones de charlas y mesa redonda los días miércoles y jueves en el auditorio del Colegio Agropecuario de Santa Clara, San Carlos, Alajuela. Día de campo: a realizarse el día viernes en las plantaciones del Ingenio Quebrada Azul, Florencia, San Carlos, Alajuela.



La actividad es para todo público y gratuita.
Inscripción a los teléfonos: 2494-1129 / 2494-4451 / 2494-2955 o 2494-7555;
también vía e-mail: krodriguez@laica.co.cr



En el Sector Cañero Azucarero Costarricense decimos:

NO
Trabajo Infantil



¿Qué legislación existe en Costa Rica, para proteger a los niños y adolescentes?

- Constitución Política.
- Código de la Niñez y la Adolescencia
- Código de Trabajo
- Ley 8922 Prohibición del trabajo peligroso e insalubre para personas adolescentes trabajadoras.

¿Qué dice la legislación?

Trabajo Infantil (0-15 años)
Es Prohibido

- No permite que los niños se desarrollen física, emocional y psicológicamente.
- Les puede causar enfermedades, lesiones o deterioro en la salud.
- Causa bajo rendimiento o abandono de la educación.

Trabajo adolescente (15-17 años)
Permitido con regulaciones

- Se le debe facilitar al adolescente el espacio para estudiar y asistir al centro educativo.
- Se le deben dar las mismas garantías como remuneración y vacaciones que a una persona adulta.
- La jornada no puede ser mayor a 6 horas diarias ni 36 semanales.
- No pueden realizar trabajo nocturno ni trabajos peligrosos, como:
 - Estar en espacios insalubres con altas temperaturas, espacios cerrados, alturas peligrosas o estar bajo tierra.
 - Utilizar herramientas o maquinaria peligrosa.
 - Levantar peso mayor a 15 kg los hombres y 10 kg las mujeres.



LAICA RSE



“Esta es una sección para opinión y discusión sobre temáticas de índole exclusivamente técnicas en lo referente al entorno de la producción de caña de azúcar a nivel nacional e internacional, los temas publicados en esta sección no representan ni reflejan las políticas internas o externas de LAICA; ni personifican tampoco la manera de pensar o de opinar del Comité Editorial. Los autores deberán de asumir la responsabilidad en lo personal y de manera independiente por lo que publiquen en esta sección.”

CARGA QUÍMICA ACTIVA POR USO DE AGROQUÍMICOS EN LA CAÑA DE AZÚCAR

Marco A. Chaves Solera¹

Introducción

La agricultura costarricense se encuentra actualmente inmersa y maniobrando en la dinámica general de los sistemas agroalimentarios y los espacios geoeconómicos mundiales; es decir, operando en el marco de las regulaciones comerciales nacionales e internacionales derivadas de la globalización, la apertura comercial y la competitividad. La estricta y rigurosa dinámica del comercio mundial obliga e impone accesar para poder mantenerse vigente y competitivo, nuevas y mejores formas de hacer las cosas, las cuales deben satisfacer patrones agroalimentarios, sociales, ambientales y económicos cada vez más exigentes, que intervienen y afectan los sistemas productivos tradicionales que los han mantenido activos por muchos años. Como se anotó, estos profundos cambios de concepto y operación son impuestos por las demandas que los mercados y los consumidores exigen; y que alcanzan intervenir lo social, lo económico, lo ambiental y también lo tecnológico (Chaves 2014ab, 2016a, 2017b).

Es perceptible y comprensible que Costa Rica necesita que su agricultura sea rentable y muy competitiva, no apenas por simples razones productivas, económicas y de justicia social; sino también por el reconocido potencial intrínseco que el agro posee, para contribuir con un aporte ostensible y sustantivo a la solución de los grandes y cada vez más graves problemas nacionales. El incremento productivo, la incorporación de valor agregado y la mejora de la calidad en todas sus manifestaciones, es incuestionablemente la ruta correcta a seguir para que nuestros productos sean aceptados por los consumidores y se posicionen en mercados de

calidad que reconozcan precios satisfactorios (Chaves 2013a, 2014b).

El sector azucarero no está en absoluto ajeno de tener que cumplir con esos insoslayables y necesarios requerimientos comerciales, de lo cual es consciente y para lo cual ha venido sistemáticamente realizando los ajustes necesarios y obligados en todos los campos: administrativo, legal, infraestructura, insumos, mecánico, de procesos, diversificación productiva, calidad, trazabilidad, incorporación de valor agregado y también en el área tecnológica agroindustrial (Chaves 2012, Chaves *et al* 2018). El cambio ha sido sin embargo relativamente lento, causado y favorecido por varias consideraciones propias y particulares de la agroindustria azucarera y el sector agropecuario costarricense en general.



¹Ingeniero Agrónomo, M. Sc. Gerente. Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA-LAICA), Costa Rica. E-mail: mchavezsa@laica.co.cr. Teléfono (506) 2284-6066 / Fax (506) 2223-0839.



Acontece que pese a la importante gestión institucional y empresarial desarrollada por parte del sector azucarero nacional en todos esos campos, existen factores internos de nuestra agricultura que dificultan y limitan el poder alcanzar y lograr el avance pretendido con la celeridad, profundidad y calidad deseada, lo que torna la situación difícil y comprometedor para con los demandantes nacionales y externos de nuestros productos. Algunas de esas limitantes son por su naturaleza ajenas al sector azucarero

Requerimiento

Varios ingenios nacionales están abocados actualmente en procurar cumplir satisfactoriamente con la gestión e implementación de importantes acciones desarrolladas en varias direcciones, orientadas a procurar la certificación de procesos y productos, que les permita alinearse y adherirse al cumplimiento de las normativas de calidad que regulan los principales mercados azucareros.

En este sentido, se atienden y procura satisfacer en primera instancia, los requisitos establecidos por la reconocida certificadora internacional BONSUCRO, la cual impone el cumplimiento de diferentes conceptos y obligaciones asociadas, entre las cuales está el concerniente al empleo de agroquímicos en la etapa de producción primaria, estableciendo para ello límites por me-

y por tanto de difícil resolución para este; como acontece en el presente caso con el acceso y la disponibilidad de productos y moléculas modernas de agroquímicos (insecticidas, herbicidas, fungicidas, fertilizantes, madurantes, coadyuvantes) de alta eficacia técnica, baja toxicidad y residualidad para ser empleados en el área fitosanitaria y poder cumplir cabalmente con los requisitos solicitados por los mercados de destino.

dio de la denominada Carga Química Activa (BONSUCRO 2013, 2016). No lograr certificarse en tiempo (2020) como ha sido solicitado por importantes clientes, generaría serios problemas al sector para poder permanecer vigente en dichos mercados con el consecuente perjuicio que se generarían para la agroindustria y el país (LAICA 2018).

¿Qué es Carga Química Activa?

La denominada Carga Química Activa (CQA) se refiere a la suma de las cantidades individuales de los ingredientes activos que son incorporadas por los productos empleados en una o varias aplicaciones de agroquímicos por ciclo vegetativo, año y hectárea.

El indicador técnico establecido por BONSUCRO como su Principio N° 4 de los 6 considerados en su Guía de Producción, es enunciado con el objeto de Gestionar Activamente los Servicios de Biodiversidad y Ecosistemas, regulando en el Punto 4.1.5 los agroquímicos aplicados por hectárea por año. El verificador utilizado por el mismo son los kilogramos de ingrediente activo (i.a)/ha/año adicionados, con un valor Estándar máximo aceptable de < 5,00 kg. Se le considera

uno de los indicadores fundamentales orientados a “Minimizar la contaminación del aire, el suelo y el agua. Controlar las cantidades aplicadas de ingredientes activos de agroquímicos (pesticidas, herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, maduradores incluidos)”. El requerimiento para alcanzar certificación busca utilizar solamente productos registrados en concordancia con los índices aprobados (BONSUCRO 2016).

¿Cómo se estima y contabiliza?

La estimación de la CQA resulta simple de realizar en consideración de que los factores fundamentales involucrados, son



a) tipo y naturaleza de los agroquímicos aplicados que aportan CQA,



b) ingrediente activo (i.a) contenido,



c) concentración del producto y



d) cantidad de aplicaciones realizadas por ciclo vegetativo u año por hectárea.

SECCIÓN EDITORIAL

El cálculo es inclusivo pues considera e integra como se anotó en el punto anterior, el concepto genérico de agroquímicos, lo que implica que en la estimación deben considerarse en el caso cañero herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, madurantes, rodenticidas, coadyuvantes y cualquier otro producto similar o equivalente empleado en el campo agrícola. En este particular cabe anotar que los fertilizantes no se contabilizan, como tampoco los madurantes o productos de naturaleza orgánica o no sintéticos (fosfita de potasio, fitoreguladores, fertilizantes foliares, etc.). Por su relevancia y con el fin de evitar errores de estimación, cabe señalar que las características y propiedades físico-químicas de los productos, como son solubilidad, densidad, punto de ebullición, presión de vapor, constante Kc, volatilidad y otras, no participan en el cálculo de la CQA (BONSUCRO 2016).

En el Cuadro 1 se adjunta un detalle del cálculo de una posible situación teórica acontecida por uso de agroquímicos, que puede resultar común en el

manejo habitual de una plantación comercial de caña de azúcar con problemas fitosanitarios y con inductores de maduración. Se anota el respectivo aporte individual de cada producto y su correspondiente CQA total. Como se detalla en dicho cuadro, hay empleo de agroquímicos de diferente naturaleza, como son: herbicidas, insecticidas, rodenticidas, fungicidas, madurantes y coadyuvantes, los cuales participan de manera diferencial en la CQA.

La CQA total incorporada es en este ejemplo de 7,98 kg/ha contabilizado para el supuesto de que solo se incurra en un ciclo de aplicación, lo cual por lo general no resulta cierto por las condiciones naturales difíciles y heterogéneas de nuestros entornos productivos. Siendo así, lo esperable es que se den durante un ciclo vegetativo anual al menos dos aplicaciones de todos los productos, excepto el madurante y el rodenticida, lo que elevaría la CQA a 15,44 kg/ha/año; valor muy superior (3,1 veces) a los 5,00 kg/ha/año fijados como máximo aceptable por la certificadora BONSUCRO.

Cuadro 1.

Estimación de la Carga Química Activa por agroquímicos en una plantación comercial de caña de azúcar.

Etapa fenológica	Tipo de agroquímico	Ingrediente activo	% i.a	Dosis comercial /ha	Unidad	Carga química activa kg/ha
Siembra	Fungicidas	Folpet	48	0,30	Litros	0,14
	Herbicidas	Pendimetalina	45,5	3,30	Litros	1,50
		Terbutrina	50	3,00	Litros	1,50
		2,4 - D	72	1,50	Litros	1,08
Coayuvantes	Alcohol etoxilado + polioxietileno Alquil éter + indicador Ph	27,5	0,40	Litros	0,11	
Desarrollo	Insecticidas	Imidacloprid	0,80	16,00	Kg	0,13
	Herbicidas	Hexazinona	75	1,00	Kg	0,75
		Diurón	80	2,00	Litros	1,60
		2,4 - D	80	1,00	Litros	0,80
	Coayuvantes	Alcohol etoxilado + polioxietileno Alquil éter + indicador Ph	27	0,40	Litros	0,11
Rodenticida	Brodifacoum	0,005	2,00	Kg	0,0001	
Cosecha	Madurante	Glifosato	36,5	0,70	Litros	0,26
Carga Química Activa Total						7,98

¿Por qué es importante?

La relevancia e importancia de la CQA en la agricultura puede ubicarse y establecerse desde diferentes perspectivas: 1) En primera instancia hay una razón de fondo que es la **ambiental**, pues se produce un menor impacto negativo sobre el ecosistema, en consideración de que una carga baja se genera y traduce partiendo de varias posibilidades: a) por menor uso de plaguicidas tradicionales de alta toxicidad y residualidad, b) utilización de moléculas más nobles con proyección ecoeficiente, c) empleo óptimo de agroquímicos en términos de productos, dosis, residualidad, frecuencia, momento y forma de aplicación; 2) Los **costos vinculados** se ven también disminuidos por las razones anteriores favoreciendo la rentabilidad de la empresa; 3) Participa directamente en las iniciativas de **certificación de procesos y productos**, con el importante beneficio y ventaja comercial

implícita que en términos de imagen, acceso a mejores mercados y precios incorpora y 4) Interviene en la **calidad de los alimentos** al reducir posibles riesgos por contaminación, lo cual es muy positivo para la salud.

La Carga Química aportada por los agroquímicos utilizados en la agricultura no es en los tiempos actuales una moda, una condición mercantil optativa, ni una alternativa de decisión personal o empresarial que pueda obviarse; pues constituye por el contrario, un requerimiento y una obligación que la legislación ambiental y los alimentos de consumo humano han impuesto y que el comercio mundial ha venido sistemáticamente exigiendo. La realidad es que quién no cumpla los términos, condiciones y normativas establecidas, simplemente quedará fuera de los mercados importantes incumpliendo la regulación vigente; el azúcar no es en este sentido ninguna excepción.

¿Cómo controlarla y disminuirla?

La vía razonable para lograr bajar la CQA empleada en el manejo agronómico de las plantaciones de caña de azúcar, en principio no pareciera difícil de alcanzar, en consideración de que basta con utilizar los productos adecuados aplicados en la dosis, frecuencia, momento y forma conveniente; lo cual sin embargo, cuando lo cotejamos con lo que se hace realmente en el campo, vemos que la distancia de la meta pretendida pareciera lejana y difícil de cumplir en el corto plazo si algunas condiciones interventoras no cambian.

En el caso particular de Costa Rica, el problema surge, como ya se comentó, con la carencia de los productos químicos adecuados para protocolariamente cumplir con el objetivo de llegar a una carga inferior a 5,00 kg/ha/año.

Lamentablemente la mayoría de los agroquímicos, en especial los herbicidas, que se dispone para uso comercial son antiguos y están ya superados por otras moléculas de nueva generación que aportan mejores condiciones en su composición, efecto y eco eficiencia; sin embargo, por razones de carácter legal-institucional las mismas no ha sido aún



posible registrarlas en el país, lo que deja a nuestra agricultura en franca desventaja y en una condición donde bajar la carga por las vías convencionales se torna muy difícil.

Como se indicó, la mejor forma de reducir la Carga Química es empleando agroquímicos que lo permitan, los cuales empleados en la mezcla correcta, con los coadyuvantes adecuados, aplicados en el momento y forma oportuna, sea en preemergencia o poseemergencia (temprana), definen una frecuencia correcta de adición y dosis menores, lo cual contribuye a que la CQA se reduzca.

En el Cuadro 2 se expone una valoración y estimación de CQA aplicada a la realidad de nuestras principales regiones productoras de

Cuadro 2.

Mezclas de herbicidas con su correspondiente Carga Química Activa más comunes, empleadas para realizar el control de malezas en algunas zonas productoras de caña de azúcar.

No.	Región / Ingrediente Activo	Producto *	% Ingrediente Activo	Dosis	Unidad	Carga química
A GUANACASTE						
1	Pendimetalina	Prowl 45,5 CS	45,5	3,30	Litros	1,50
2	Terbutrina	Agromart 50 SC	50	3,00	Litros	1,50
3	2,4 - D	HA 72 SL	72	1,50	Litros	1,08
4	Coadyuvante	Cosmoin-d 27 SL	27	0,40	Litros	0,11
Total						4,19
1	Pendimetalina	Prowl 45,5 CS	45,5	3,00	Litros	1,37
2	Ametrina	Ametrina 50 SC	50	2,00	Litros	1,00
3	2,4 - D	HA 72 SL	72	2,00	Litros	1,44
4	Coadyuvante	Cosmoin-d 27 SL	27	0,40	Litros	0,11
Total						3,92
1	Pendimetalina	Prowl 45,5 CS	45,5	3,30	Litros	1,50
2	Hexazinona	Hexacto 75 WP	75	1,00	Kg	0,75
3	Diurón	Sheik 80 SC	80	2,00	Litros	1,60
4	2,4 - D	Baton	80	1,00	Litros	0,80
5	Coadyuvante	Cosmoin-d 27 SL	27	0,40	Litros	0,11
Total						4,76
B PACÍFICO CENTRAL						
1	Hexazinona	Hexacto 75 WP	75	0,75	Kg	0,56
2	2,4 - D	Rimaxil 60 SL	60	2,00	Litros	1,20
3	Coadyuvante	WK 85%	85	0,40	Litro	0,34
Total						2,10
C ZONA NORTE						
1	Diurón	Karmex 80%	80	2,00	Kg	1,60
2	Hexazinona	Hexacto 75 WP	75	0,50	Kg	0,38
3	2,4-D	Pradera 72%	72	0,66	Litro	0,48
4	Coadyuvante	WK 85%	85	0,40	Litro	0,34
Total						2,80
1	Pendimetalina	Prowl 45,5 CS	45,5	3,00	Litros	1,37
2	Diuron	Karmex 80 WG	80	2,00	Kg	1,60
3	Coadyuvante	WK 85%	85	0,40	Litro	0,34
Total						3,31

Cuadro 2.

Mezclas de herbicidas con su correspondiente Carga Química Activa más comunes, empleadas para realizar el control de malezas en algunas zonas productoras de caña de azúcar.

No.	Región / Ingrediente Activo	Producto *	% Ingrediente Activo	Dosis	Unidad	Carga química
D ZONA SUR						
1	Pendimetalina	Toro 50 EC	50	3,00	Litros	1,50
2	Terbutilazina	Chapeador 50 SC	50	2,00	Litros	1,00
3	Coadyuvante	Cosmoin-d 27 SL	27	0,50	Litros	0,14
Total						2,64
1	Hexazinona	Velpar 75 WG	75	0,90	Kg	0,68
2	Diurón	Diurex 80 WG	80	2,00	Kg	1,60
3	Coadyuvante	Cosmoin-d 27 SL	27	0,50	Litros	0,14
Total						2,42
D VALLE CENTRAL						
1	Hexazinona	Velpar 75 WG	75	0,50	Kg	0,38
2	Diurón	Diurex 80 WG	80	2,00	Kg	1,60
3	2,4 - D	Rimaxil 60 SL	60	2,00	Litros	1,20
4	Coadyuvante	WK 85%	85	0,40	Litros	0,34
Total						3,52
1	Pendimetalina	Prowl 45,5 CS	45,5	3,00	Litros	1,37
2	Diurón	Diurex 80 WG	80	2,00	Kg	1,60
3	Coadyuvante	WK 85%	85	0,40	Litros	0,34
Total						3,31
E TURRIALBA						
1	Hexazinona	Velpar 75 WG	75	0,50	Kg	0,38
2	Diurón	Sheik 80 SC	80	2,00	Litros	1,60
3	2,4-D	Rimaxil 60 SL	60	2,00	Litros	1,20
4	Coadyuvante	WK 85%	85	0,3	Litros	0,25
Total						3,43
1	Hexazinona	Hexacto 75 WP	75	0,50	Kg	0,38
2	Diurón	Diurón 80 WG	80	2,00	Kg	1,60
3	2,4 - D	HA 72 SL	72	2,00	Litros	1,44
4	Coadyuvante	Cosmoin-d 27 SL	27	0,3	Litros	0,08
Total						3,50

Fuente: elaborado por el autor.



caña, interpretado a partir de mezclas de uso común para realizar el control de malezas en cada localidad. Como se infiere, en algunas zonas se utilizan hasta cuatro productos herbicidas diferentes que aportan significativamente a la carga química, lo cual obviamente la eleva. Debe considerarse adicionalmente, que por lo general en un periodo vegetativo de cultivo pueden emplearse hasta dos ciclos de aplicación de agroquímicos en el campo, además de control de rondas, lo cual viene determinado por las condiciones del entorno productivo elevando consecuentemente la CQA.

Para contribuir con esa reducción resulta también fundamental además de contar con buenos agroquímicos, corresponder adicionalmente con un manejo correcto de las plantaciones comerciales empleando criterios asociados a las Buenas Prácticas Agrícolas (Chaves 2013b), evitando cometer errores u omisiones de carácter técnico-administrativo (Chaves 2015) que provocan y favorecen condiciones inadecuadas que inducen mayores problemas con malezas, plagas, enfermedades y maduración, con el consecuente impacto productivo y económico.

No hay duda que principios, conceptos y modelos productivos modernos aplicados en el manejo de plantaciones y llevados a la práctica, como son: **Desarrollo Sostenible, Producción Más Limpia, Producción Ambientalmente Amigable, Agricultura Conservacionista, Agricultura Regenerativa, Agricultura Orgánica, Agricultura de Precisión (Sitio), Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Manejo Integrado del Cultivo (MIC) y Manejo Integrado de Plagas (MIP)**, entre otros, sobre todo las vinculadas directamente con la Mejora Genética

mediante el empleo de variedades adaptadas, aportan elementos interesantes e importantes para procurar una mayor racionalidad en el empleo de agroquímicos, procurando su optimización.

Siempre resulta válido y recomendable identificar, adoptar y adaptar aquellas prácticas que contribuyan a un manejo más biológico de las plantaciones, especialmente si no se sacrifica productividad agroindustrial; lo cual en el caso del asunto aquí procurado, resulta determinante para consumir el objetivo pretendido.



¿Cuál es el problema?

El sector azucarero costarricense adquirió recientemente un importante y trascendente compromiso de **Certificación de Sostenibilidad** de su proceso de producción de caña y fabricación de azúcar bajo la norma BONSUCRO, por medio del cual debe, entre otras acciones, reducir la CQA generada por el uso de agroquímicos empleados en la fase de producción agrícola de la materia prima que será luego procesada en el Ingenio, para la extracción y fabricación del azúcar que se coloca en nuestros mercados de destino. La certificadora estableció para esa acción como límite técnico a cumplir en el año 2020, alcanzar una Carga Química Activa máxima de hasta 5,00 kg/ha/año, para lo cual el tiempo disponible se estima como muy corto, debido a la existencia de problemas no atinentes de solución por parte del sector azucarero, pues su origen es legal-institucional.

Una valoración interna objetiva y responsable de la situación prevaleciente actualmente, revela la existencia de serias limitantes, algunas ajenas a nuestro control, que dificultan y ponen en serio riesgo el poder lograr cumplir a cabalidad en tiempo y cantidad el compromiso adquirido, lo que a criterio de la agroindustria azucarera merece revisión y de ser válido, adecuación a nuestra realidad, viabilidad y factibilidad institucional y sectorial.

Por casi 14 años, el Sistema de Registro de Agroquímicos en Costa Rica operado por el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) y regulado por medio del **Decreto Ejecutivo N° 33495-MAG-S-MINAE-MEIC: Reglamento sobre Registro, Uso y Control de Plaguicidas Sintéticos Formulados, Ingrediente Activo Grado Técnico, Coadyuvantes y Sustancias Afines de Uso Agrícola** del 31 de octubre del 2006, mostró problemas y serias limitaciones para que las empresas de agroquímicos interesadas pudieran registrar, incorporar y liberar para uso comercial al sector productivo nacional nuevos agroquímicos. Con el transcurrir del tiempo lejos de resolverse, por el contrario, la situación se agudizó, colocando al sector agropecuario en una difícil situación de desventaja que ha venido afectando severamente su productividad agropecuaria y con ello su competitividad. Según información confiable, desde el año 2009 se han registrado muy pocos productos, lo que revela

fehacientemente la gravedad de la situación prevaleciente.

Esta grave situación dio origen a una importante y prolongada gestión de reforma promovida por grupos empresariales, asociativos y gremiales que contaron con el apoyo gubernamental, que permitió realizar e incorporar los cambios y ajustes pertinentes, que dieron lugar al **"Reglamento Técnico: "RTCR 484:2016. Insumos Agrícolas. Plaguicidas Sintéticos Formulados, Ingrediente Activo Grado Técnico, Coadyuvantes y Sustancias Afines de Uso Agrícola. Registro, Uso y Control"**, contenido en el **Decreto Ejecutivo N° 40059-MAG-MINAE-S**, publicado el 12 de enero del 2017. Dicha normativa tiene dentro de sus objetivos fundamentales mejorar el registro de este tipo de sustancias, en aras de favorecer la competitividad, velando a la vez por el resguardo de la salud humana, el ambiente y la sanidad vegetal. La nueva legislación pretende facilitar a los agricultores el acceso a nuevas y mejores fórmulas con productos más innovadores e incluso más amigables con el ambiente; además de más eficientes, lo que como principio procurado redundará en un menor uso de plaguicidas y menos costos de producción (Vargas 2017).

Pese a que presuntamente el camino legal se encuentra con el nuevo Decreto Ejecutivo abierto y habilitado, las empresas representantes de agroquímicos aducen tener aún serias limitantes para registrar sus productos, pues las exigencias técnicas y la dinámica del proceso administrativo de inscripción es lenta y obstruccionista. Consultadas por su parte las autoridades del MAG en torno al tema, propiamente en la Oficina de Registro, indican que parte del problema sucede por el aparente desinterés e incumplimiento de los requisitos técnico-administrativos exigidos por parte de algunas de las empresas registrantes; algo similar aducen en el MINAE. Si se reconoce por todos que efectivamente existe una cantidad muy grande (en lista) de productos nuevos en espera de ser registrados, que limitan y retardan la gestión de renovación. También aducen que la nueva legislación no resolvió muchos de los problemas existentes, por lo que persisten aún limitantes que impiden darle fluidez al registro.

Lo cuestionable y paradójico del tema es que muchos de los agroquímicos requeridos con

SECCIÓN EDITORIAL

urgencia por nuestro sector agropecuario y, por ende, por nuestra agroindustria cañero-azucarera, están ya registrados en otros países inclusive centroamericanos, lo que les ha permitido cumplir con la meta de los 5,00 kg/ha y certificarse ante BONSUCRO. Surgen ante esto preguntas lógicas y razonables que dejan dudas, como ¿Qué motivo existe para que las empresas representantes no registren los productos, si en otros países ya lo hicieron? ¿Existe desinterés comercial por parte de las empresas registrantes no participando del mercado? ¿Es el sistema de registro nacional inoperante e ineficiente? ¿Son acaso los requisitos técnicos establecidos y requeridos para registrar difíciles de satisfacer? ¿Es que posiciones personales fundamentalistas y dogmáticas intervienen en el proceso? Podría con buen criterio y escuchando las partes, pensar en que hay un poco de todo eso.

¿Qué hace el sector azucarero nacional al respecto?

En consideración del grave problema existente con la ineficacia demostrada en el proceso de registro de nuevos agroquímicos para uso comercial público, el limitado tiempo disponible (2020) para procurar la certificación con BONSUCRO en proceso y ante la preocupación de la limitante técnica que nos deja en franca desventaja respecto a otros países y mercados, la agroindustria azucarera nacional ha venido por medio de LAICA-DIECA (LAICA 2018) realizando diversas gestiones técnico-institucionales en procura de contribuir a resolver el problema, el cual como se indicó, es de naturaleza legal y de ámbito sectorial agropecuario nacional, con la dificultad implícita.

En esta gestión se han girado comunicados y mantenido reuniones con organizaciones y funcionarios vinculados directa e indirectamente con el tema, como los que se anotan seguidamente:

- Ministros de Agricultura y Ganadería anterior y actual.
- Viceministro de Agricultura y Ganadería anterior y actual.
- Director del Servicio Fitosanitario del Estado (SFE).
- Jefe Unidad de Registro de Agroquímicos y Equipos del SFE.

- Cámara Nacional de Agricultura y Ganadería (CNAAG).
- Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica.
- Cámara Nacional de Agroinsumos y Productos Genéricos (CANAPROGE).
- Federación de Cámaras de Productores de Caña (FEDECAÑA).
- Cámara de Azucareros.
- Certificadora BONSUCRO.
- Empresa BAYER.
- Empresa BIOCONTROL S.A.
- Azucarera del Norte S.A. (AZUNOSA), San Pedro Sula, Honduras.

Como se infiere la gestión realizada por LAICA ha sido trascendente y de carácter permanente con resultados y avances importantes, aunque insuficientes en lo esencial, que mantienen el problema aún vigente con algunas posibilidades de solución próximas sobre las que se trabaja.

El tema ha sido como lo señalara Chaves (2018), un *“Reto para la nueva administración en agricultura”*, manifestando puntualmente en lo concerniente al tema aludido, que *“No se puede dejar de citar el enorme problema que persiste desde hace muchos años con el registro de insumos agropecuarios, donde la inscripción de nuevas, modernas y mejores moléculas se torna imposible, sumiendo al sector productivo en un atraso tecnológico que resulta inconcebible, inaceptable y que cobra perjuicios en todos los sentidos. El esfuerzo y valioso aporte del gobierno anterior al tema es reconocido, sin embargo es insuficiente y debe retomarse con carácter, valentía y capacidad en defensa de los intereses nacionales. Resulta incomprensible pensar como dogmáticos fundamentalistas del MINAE detienen el avance nacional, imponiendo e interpretando casi a placer criterios técnicos que tienen al sector postrado y operando con agroquímicos ya superados. Es inadmisibles e intolerables que pocos afecten a tantos. El rector MAG debe resolver de inmediato sin dilación ni justificación esta situación; es su obligación.”*

CONCLUSIONES

La certificación de procesos y productos es una realidad actual a la que inequívoca e indefectiblemente la agroindustria azucarera costarricense debe acceder con carácter prioritario, como ruta viable y efectiva hacia la ansiada y necesaria mejora sectorial, virtud de las incuestionables ventajas competitivas que dicho logro otorga en materia de selectividad de mercados, precios y competitividad general en el ámbito nacional e internacional.



Cumplir y satisfacer esta meta implica consumir a cabalidad normas prefijadas y resolver varias obligaciones de carácter tecnológico, legal, social, industrial, ambiental, institucional, que se constituyen en serias limitantes al proceso de certificación bajo la norma BONSUCRO. Como se analizó y comentó en el documento, en materia de tecnología de producción agrícola, el cumplimiento del límite máximo de Carga Química Activa por uso de agroquímicos establecido en hasta 5,00 kg/ha/ciclo anual, implica resolver varios problemas importantes, como son entre otros: 1) habilitar la disponibilidad de productos químicos, principalmente herbicidas nuevos y modernos, que provean facilidad por su composición química, para lograr alcanzar esa cuota con menor esfuerzo y sacrificio tecnológico y productivo; 2) identificar de esos los mejores productos, lo que implica investigación y validación comercial de los mismos en los diferentes sistemas de producción de caña del país; 3) incorporar otros elementos y prácticas de manejo justas y necesarias que reduzcan el empleo de agroquímicos; 4) deben integrarse criterios de manejo asociados con la Agricultura de Sitio y Precisión, que permitan potenciar y optimizar el uso de los factores positivos asociados a la producción.

El desafío que la agroindustria nacional cañero-azucarera tiene por delante que resolver no es fácil de lograr, lo que obliga y justifica necesariamente aunar y concentrar esfuerzos institucionales en torno a la iniciativa sectorial; sin embargo, el beneficio por alcanzar resulta muy satisfactorio para todos, motivo por el cual se debe proseguir con la gestión desarrollada para superar pronto las limitantes que existen actualmente. En toda esta aspiración, la participación del agricultor de caña como gestor

de su propio desarrollo y futuro es máxima, lo que lo obliga a actuar como un proactivo agente de cambio y no como un simple espectador de su destino (Chaves 2017b). El tiempo nos dará la razón y esperemos lograr el fruto del esfuerzo sectorial.

Recomendaciones

En calidad de recomendaciones por adoptar se sugiere lo siguiente:

- 1) Continuar con la gestión desarrollada ante las instituciones públicas vinculadas con el proceso, orientada a lograr el registro pronto de los agroquímicos (herbicidas) de nuestro interés y necesidad inmediata, sea por apertura del





sistema nacional; o en su caso, por otorgamiento de un esquema de excepción previsto en la Ley de Protección Fitosanitaria.

2) Integrar y participar activamente dentro de la iniciativa promovida, a las empresas comerciales requeridas en el registro de los productos procurados por la industria azucarera.

3) En la medida de las posibilidades de tiempo, investigar y sobre todo validar desde la perspectiva técnica, ambiental y económica previo a su uso y recomendación comercial, cualquier agroquímico nuevo con el que se pretenda bajar la CQA. La variabilidad y heterogeneidad de nuestros entornos productivos de caña de azúcar justifican la medida (Chaves et al 2018).

4) Deben incorporarse, adaptarse y pragmatizarse en el manejo de las plantaciones comerciales de caña, criterios asociados con Agricultura de Sitio y Precisión, Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Manejo Integrado de Plantaciones (MIP) y Manejo Integrado de Plagas

(MIP), entre otros, como principios asociados y contribuyentes a lograr la meta pretendida. Es claro que no es apenas incidiendo en el tema del control de malezas donde está la solución al problema.

5) Deben formularse y desarrollarse campañas sectoriales de información y capacitación bien estructuradas y de amplia cobertura en todos los niveles: productores, técnicos y empresarios, que concienticen y demuestren la imperiosa necesidad de provocar los cambios necesarios que permitan cumplir las demandas de calidad que el comercio exige actualmente.

6) Resulta trascendental informarse y nutrirse de lo actuado y experimentado a nivel internacional en esta materia, particularmente en el ámbito centroamericano, lo cual permitiría superar fases de adaptación a los sistemas de producción agrícola de la caña. La acción debe ser prudente y razonable evitando la impericia y la improvisación en el manejo de un tema tan importante y sensible.

Literatura citada

- BONSUCRO. 2013. Una Guía sobre Bonsucro. V1.0. London, United Kingdom. 23 p. www.bonsucro.com.
- BONSUCRO The global sugarcane platform. 2016. Estándar de Producción BONSUCRO que incluye la Guía para el Estándar de Producción Bonsucro para la UE. Versão 4.2 London, United Kingdom. Dezembro de 2016. 60 p.
- Chaves Solera, M. 2012. Sector azucarero costarricense: *una agroindustria dinámica en activa evolución y crecimiento*. Congreso Azucarero Nacional ATACORI "Alex Soto Montenegro", 19, Condovac La

Costa, Guanacaste, Costa Rica, 2011. Memoria. San José, Asociación de Técnicos Azucareros de Costa Rica (ATACORI), 4 y 5 de octubre del 2012. Presentación Electrónica en Power Point. 115 Láminas.

Chaves Solera, M. 2013a. Productividad agroindustrial: *desafío permanente del sector cañero azucarero costarricense*. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA, agosto. Presentación Electrónica en Power Point. 184 Láminas.

Chaves Solera, M. 2013b. Buenas prácticas agrícolas aplicadas en caña de azúcar en Costa Rica. Tucurrique, Jiménez, Costa Rica. LAICA-DIECA, abril. Presentación Electrónica en Power Point. 78 Láminas.

Chaves Solera, M. 2014a. Entorno comercial regional y competitividad azucarera costarricense. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA, noviembre. Presentación Electrónica en Power Point. 50 Láminas.

Chaves Solera, M. 2014b. Competitividad azucarera: *un concepto necesario materializar*. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA, noviembre. Presentación Electrónica en Power Point. 94 Láminas.

Chaves Solera, M.A. 2015. Errores y omisiones técnico-administrativas que sacrifican productividad y cuestan dinero en la agroindustria azucarera. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA, febrero. 16 p.

Chaves Solera, M.A. 2016a. Competitividad: *imperativo insoslayable para que el agro continúe vigente y crezca*. Revista Germinar, Órgano Informativo Oficial del Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica, Año 6, Edición N° 19, mayo. p: 6-7.

Chaves Solera, M.A. 2017a. Productividad agropecuaria: *ruta correcta hacia la competitividad*. Revista Germinar, Órgano Informativo Oficial del Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica, Año 7, Edición N° 20, febrero. p: 4-5.

Chaves Solera, M.A. 2017b. El agricultor: *gestor y protagonista de su propio mejoramiento*. Revista Germinar, Órgano Informativo Oficial del Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica, Año 7, Edición N° 21, junio. p: 5-6.

Chaves Solera, M.; Bermúdez Acuña, L.; Méndez Pérez, D. 2018a. Análisis de resultados agroindustriales finales de la zafra 2016-2017. Boletín Informativo "Conexión", Número 11, enero. LAICA. San José, Costa Rica. 48 p.

Chaves Solera, M.A. 2018. Los retos de la nueva administración en agricultura. Revista Germinar, Órgano Informativo Oficial del Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica, Año 9, Edición N° 24, mayo. p: 4-5.

LAICA, Azucarera El Viejo, Ingenio Cutris, Ingenio Taboga. 2018. Informe situación de la Carga Química Activa por agroquímicos prevaleciente en los ingenios costarricenses en proceso de certificación BONSUCRO. Acciones institucionales para su reducción. Chaves Solera M.A. (Coord.). San José, Costa Rica, febrero. 115 p.

Vargas Young, S. 2017. Importancia del reglamento para la actualización de expedientes de registro de IAGT y productos formulados para el ordenamiento de los registros vigentes. Revista Germinar, Órgano Informativo Oficial del Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica, Año 7, Edición N° 20, febrero. p: 14-15.



El cultivo de la caña de azúcar en Costa Rica constituye una de las principales actividades agrícolas, abarcando un área total de 63.315,71 hectáreas del territorio nacional aproximadamente. Además representa un importante aporte económico al producto interno bruto del país y genera gran cantidad de empleos directos e indirectos, en el cultivo y la producción de azúcar, elaboración de alcohol, entre otros (Chaves & Chavarría, 2013, SEPSA, 2016).

ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ESCALDADURA FOLIAR (*Xanthomonas albilineans*) Y EL RAQUITISMO DE RETOÑOS (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp) EN COSTA RICA.¹

Karen Oviedo Bolaños²

Introducción

Debido a que es un monocultivo de semi perenne, se encuentra expuesto a enfermedades causadas por agentes fitopatógenos, principalmente hongos, virus y bacterias que provocan grandes daños de importancia económica. Como consecuencia, el rendimiento agrícola y la calidad de la materia prima desciende considerablemente generando importantes pérdidas de rentabilidad a los productores. El grado de afectación depende de la variedad, estado fenológico y fisiológico de la planta sembrada, el agente causal, la época del año, las condiciones ambientales, entre otros (LAICA, 2012).

Las enfermedades bacterianas en caña de azúcar son muy importantes debido a sus implicaciones en la producción de semilla y su impacto a nivel productivo, provocando pérdidas en el rendimiento del cultivo estimadas entre el 5% y más del 60%. Entre las cuales se encuentra la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* que causa una de las enfermedades más serias y es comúnmente denominada como raquitismo de retoños. Este patógeno es transmitido principalmente durante la cosecha a través del contacto con instrumentos de corte y maquinaria contaminados con jugo de caña infectado (Carvalho *et al*, 2016; Grisham *et al*, 2007). La bacteria coloniza y ocluye los tejidos vasculares mediante la secreción de un polisacárido que impide el adecuado transporte de agua y nutrientes (Solas *et al*, 2003). Por lo tanto provoca reducción del diámetro de los tallos y

acortamiento de internodos, disminuyendo el número de brotes y la biomasa total. En etapas tempranas, esta enfermedad no presenta síntomas externos visibles, por lo tanto es muy difícil de detectar (Quecine *et al*, 2016; Carvalho *et al*, 2016).

Por otro lado, la bacteria *Xanthomonas albilineans* produce una fitotoxina denominada albicidina que inhibe la actividad de la ADN girasa, impidiendo la replicación del ADN en los proplastidios, por lo tanto la superficie foliar exhibe síntomas como la clorosis y necrosis (Hashimi *et al*, 2007; Hashimi *et al*, 2008). En investigaciones realizadas se demostró que los síntomas foliares varían entre distintos cultivares, e incluso algunos no muestran signos de la enfermedad debido a que se encuentra en fase de latencia o por los diversos mecanismos de resistencia propios de ciertas variedades de caña (Daugrois *et al*, 2014; Garcés *et al*, 2014). Estos factores impiden un control efectivo de dicha enfermedad y propician la dispersión de la misma a través de la propagación de explantes provenientes de plantas aparentemente sanas.

Para la detección a gran escala de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* y *Xanthomonas albilineans* se emplean diversos métodos, entre ellos, los ensayos serológicos como el inmunoensayo ligado a enzimas de unión evaporativa (EB-EIA), aunque consumen mucho tiempo, poseen mayor especifici-

¹ Proyecto realizado en los laboratorios de la Estación Experimental del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar de LAICA como práctica dirigida para la obtención del título de bachiller en biología con énfasis en biotecnología.

² Estudiante de biología con énfasis en biotecnología, Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Costa Rica. Correo - e: vane.oviedo21@gmail.com



idad, al utilizar anticuerpos, en comparación con la Microscopía de inmunofluorescencia (IFM) o la microscopía en contraste de fase (PCM). Como alternativa se emplea el método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Ghai *et al*, 2014; Grisham *et al*, 2007; Langlois *et al*, 2017), que consiste en una técnica más sensible, rápida y de bajo costo (Naidoo *et al*, 2017).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final y la PCR cuantitativa (qPCR) se consideran los principales métodos de diagnóstico, caracterizados por su alta sensibilidad y especificidad.

La forma más efectiva de controlar ambas enfermedades, es la plantación de cultivares resistentes, en reemplazo de los más susceptibles, ya que estudios han detectado que las poblaciones bacterianas se encuentran significativamente más elevadas en genotipos susceptibles (Champoiseau *et al*, 2006, Garces *et al*, 2014, Grisham *et al*, 2007).

DIECA es una dependencia de LAICA dedicada, en parte, a el mejoramiento genético y desarrollo de variedades de caña de azúcar y la propagación *in vitro* con el propósito de disponer de material vegetal a los productores que están vinculados al sector azucarero nacional, para contribuir a la mejora del rendimiento de la actividad, de esta manera incrementan su producción y por ende sus ganancias. Con esto, el sector azucarero se beneficia al contar con mayor cantidad de materia prima y de óptima calidad.

Por lo tanto, es imprescindible identificar las plantas sanas, completamente libres de cualquier patógeno como virus, bacterias y hongos que causan graves pérdidas; y descartar inmediatamente las enfermas. Esto también favorece la selección de variedades más resistentes.

Actualmente, los métodos de diagnóstico convencionales utilizados en Costa Rica consisten en la observación de los síntomas aparentes, en el caso de la escaldadura foliar se detectan generalmente líneas blancas o amarillentas en la superficie de la lámina foliar desde la base y nervadura central de la hoja hasta los bordes y necrosis en los bordes. Mientras que el raquitismo de retoños se puede determinar por microscopía de autofluorescencia directa (MAF), la técnica de tinción de los haces vasculares (THV) o con la técnica de impresiones en membranas de nitrocelulosa.

Para evaluar el grado de infección de ambas enfermedades se utilizan rangos o niveles de severidad según los síntomas mostrados (Charvarría, 2006). Asimismo se emplea el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), para detectar *X. albilineans*.

Tales métodos se caracterizan por su baja sensibilidad y especificidad. Como consecuencia, pueden resultar falsos negativos y contribuir a la dispersión de los patógenos en el campo al multiplicar en el laboratorio plantas infectadas, que posteriormente, serán cultivadas por los productores.

Por estas razones, es primordial estandarizar una técnica más sensible y específica que permita la detección temprana y adecuada de la especie fitopatógena, como el diagnóstico molecular por PCR directamente de los tejidos de la planta hospedera (Umaña *et al*, 2013). De esta forma es posible obtener información más precisa para el control eficaz de estas enfermedades de manera que permita la aplicación inmediata de tratamientos específicos con el propósito de mejorar la productividad de las plantaciones, evitar pérdidas económicas, brindar un manejo apropiado de las plantaciones; tales como la implementación de la termoterapia de explantes (Carvalho *et al*, 2016), cultivo de variedades resistentes o tolerantes, desinfección de los instrumentos utilizados para la cosecha, entre otros.

Además en Costa Rica, no se han identificado otras técnicas económica y operativamente viables enfocadas en la detección molecular de *X. albilineans* y *L. xyli subsp. xyli*, a pesar de que la incidencia de enfermedades causadas por estas bacterias es frecuente en fincas agrícolas productoras de caña de azúcar a nivel nacional.

Objetivos

Objetivo principal

Optimizar la técnica de detección molecular de *Leifsonia xyli subsp. xyli* y *Xanthomonas albilineans* mediante PCR tiempo final en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cultivada en fincas agrícolas de Costa Rica, con el propósito de evitar pérdidas económicas de los productores a través de la mejora del control de estos fitopatógenos.

Objetivos específicos

A. Evaluar un protocolo de extracción de ADN a partir de hojas y tallos de *Saccharum* spp. para determinar la concentración y pureza del ADN obtenido.

B. Estandarizar la técnica PCR tiempo final para la detección de *Leifsonia xyli subsp. xyli* y *Xanthomonas albilineans* en material de campo.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Las plantas de caña de azúcar fueron recolectadas en plantaciones comerciales ubicadas en diversas zonas del país y fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de DIECA donde se realizaron todos los experimentos. Para la primera extracción de ADN se utilizaron 18 tallos correspondientes a plantas seleccionadas al azar, ubicadas en la "Finca 01" (Código A). La segunda extracción se llevó a cabo con 18 tallos correspondientes a plantas seleccionadas al azar, colectadas de la "Finca 04" (Código B). La tercera extracción se realizó con las muestras especificadas en el Cuadro 2.

Liofilización y pulverización de tejidos

Previo a la ejecución del protocolo y entre cada muestra, todos los implementos utilizados fueron lavados en una solución de NaClO al 10%, seguido de agua destilada para evitar la contaminación cruzada. Se utilizaron tallos, hojas y nervaduras obtenidos a partir de las plantas de caña de azúcar, con el propósito de determinar el tejido con mayor rendimiento y más óptimo para los análisis moleculares.



SECCIÓN CIENTÍFICA

Primeramente el material fue cortado en trozos pequeños y se colocó 200 mg de muestra en un tubo de microcentrífuga de 2 mL. A continuación, los tubos se ubicaron con la tapa abierta dentro de un contenedor con silica gel, durante un periodo de 3 días, las muestras utilizadas para la tercera extracción, permanecieron liofilizando por 6 días. Una vez liofilizados los tejidos, fueron macerados en un disruptor mecánico (MM400, Retsch). Previo a la primera extracción de ADN, se llevó a cabo una prueba de pulverización con esferas de acero inoxidable de 5 mm (cantidad 1, 2 y 3), 4 mm (cantidad 2, 3 y 4) y 3 mm (cantidad 2, 3, 4, y 5) de diámetro, a una frecuencia de 30 ciclos por segundo durante 1 min. Para la segunda y tercera extracción de ADN se utilizaron 2 balines de 5 mm de diámetro, ya que fueron los más eficientes. Las muestras de hojas y nervaduras se pulverizaron de la misma forma, incrementando el tiempo a 4 minutos para que fuera completa.

Extracciones del ADN total de los tejidos vegetales

La extracción de ADN se realizó según el protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) con algunas modificaciones. Las muestras previamente pulverizadas, fueron homogenizadas en 500 μ L de solución de extracción CTAB [2% p/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 2% p/v polivinilpirrolidona (PVP) y 0.2% v/v b-mercaptoetanol] previamente calentado a 55°C, luego se agregó Proteinasa K (0.2 mg/mL) y después las muestras fueron incubadas durante una hora a 65°C, con agitación cada 15 min. Seguidamente se adicionó un volumen de 500 μ L de solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min.

A continuación, se recuperó la fase acuosa y se le realizó una re-extracción con cloroformo: alcohol isoamílico, después las muestras se centrifugaron nuevamente. En seguida, se extrajo el sobrenadante y el ADN fue precipitado con 0,7 volúmenes de isopropanol, las muestras se dejaron incubando por 30 min a 4°C, una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.

El botón de ADN que se obtuvo de este procedimiento fue purificado con etanol 95% y segui-

damente con etanol 70%. Finalmente, el ADN se resuspendió en 100 μ L de agua ultra pura libre de nucleasas. Para la segunda extracción se omitió la re-extracción, ya que este paso no mejoró la pureza del ADN.

Finalmente para la tercera extracción, además de tallos, se incluyó las muestras de hojas y nervaduras, también una muestra de jugo de caña (Cuadro 2). Para obtener el jugo, se colocó un trozo de tallo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min, se colectó 300 μ L del extracto y fue transferido a un nuevo tubo de microcentrífuga. Para todas las muestras se llevó a cabo el mismo procedimiento con el método CTAB, incrementando el volumen del buffer a 600 μ L y omitiendo el paso de re-extracción.

Extracción de ADN de *X. albilineans*

Se realizó extracción de ADN a partir de un control positivo de *X. albilineans* para pruebas ELISA (Agdia). Primeramente se resuspendió el extracto liofilizado de planta infectada en el buffer designado, y luego se tomó 200 μ L para efectuar la extracción mediante el kit comercial NucleoSpin (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Cuantificación y evaluación del ADN

Se llevó a cabo la cuantificación del ADN extraído a partir de cada tejido, empleando un espectrofotómetro UV-visible (Multiscan GO, Thermo Scientific). Además se determinó su pureza mediante los coeficientes A260 / A280 y A260 / A230, proporcionados por el mismo equipo.

Para evaluar la integridad del ADN y posible ARN remanente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% con una solución amortiguadora TBE 0,5X (Tris 10 mM, Borato 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) siguiendo las recomendaciones descritas por Yabar (2003). Con un tiempo de movilidad electroforética de 60 minutos a 80 V. La tinción del gel se llevó a cabo con Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) durante 30 minutos y finalmente se visualizó en un fotodocumentador (UVP BioDoc-It™ Imaging System).

Amplificaciones por PCR de punto final para detección de fitopatógenos

Se llevó a cabo PCR para detectar fragmentos de genes específicos de *L. xyli subsp xyli* y *X. albilineans*, mediante los cebadores indicados en el Cuadro 1. Cada reacción de PCR estuvo compuesta por 1X de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 0,4 μ M (PGBL1/PGBL2) o 0,2 μ M (202F/331R) de cada cebador, agua ultra pura libre de nucleasas y 80-100 ng de ADN. La amplificación por PCR fue llevada a cabo en un termociclador (Arktik, Thermo Scientific) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, alineamiento de cebadores a 50-65°C por 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Con una extensión final a 72 °C por 10 min.

Visualización de los amplicones

Los productos de PCR se resolvieron por electro-

foresis en gel de agarosa al 3% con TBE 0,5X. La migración electroforética se realizará a 80 V por 1,5 h. El gel fue digitalizado en un fotodocumentador. Las bandas que presentaron un peso molecular esperado fueron consideradas positivas, tomando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific).

Resultados

Cuantificación y evaluación del ADN

Las concentraciones de ADN mostraron variaciones en un rango de 15,9 - 2731 ng/ μ L. Los valores más elevados correspondieron a las muestras de hojas y nervaduras, seguido por las de tallos, mientras que la concentración inferior pertenece a la muestra del jugo de caña (Figuras 1.A y 2.A).

Cuadro 1.

Cebadores utilizados para la detección molecular por PCR de las bacterias *L. xyli subsp xyli* y *X. albilineans* en tejidos vegetales de *Saccharum spp*

Especie	Secuencia diana	Cebador	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>Leifsonia xyli subsp. xyli</i>	Gen Pat1	Pat1-F2	GGAATACTCGCTATGTGTTG	597	Fu et al, 2016
		Pat1-R2	CCAATACTATGCCGTAGAAAG		
<i>Leifsonia xyli subsp. xyli</i>	Región ITS de 16S-23S rRNA	CxxITSf#5	TCAACGCAGAGATTGTCCA	305	Fegan et al, 1998
		CxxITSr#5	GTACGGCGGTACCTTTTC		
<i>Leifsonia xyli subsp. xyli</i>	Región ITS de 16S-23S rRNA	202F	CGAAGTACTAGCCTGCTTG	139	Grisham et al, 2007; Young &
		331R	GGATTCGGTTCTCATCTC		
<i>Xanthomonas albilineans</i>	Región ITS de 16S-23S rRNA	PGBL1	CTTTGGGTCTGTAGCTCAGG	288	Pan et al, 1999
		PGBL2	GCCTCAAGGTATATTCA GC		
<i>Xanthomonas albilineans</i>	Gen albl	XAprF6	CGAGCAGGTGAAGGACAG	98	Garces et al, 2014
		XAprR6	GCGATGGCACTAGGTACA		

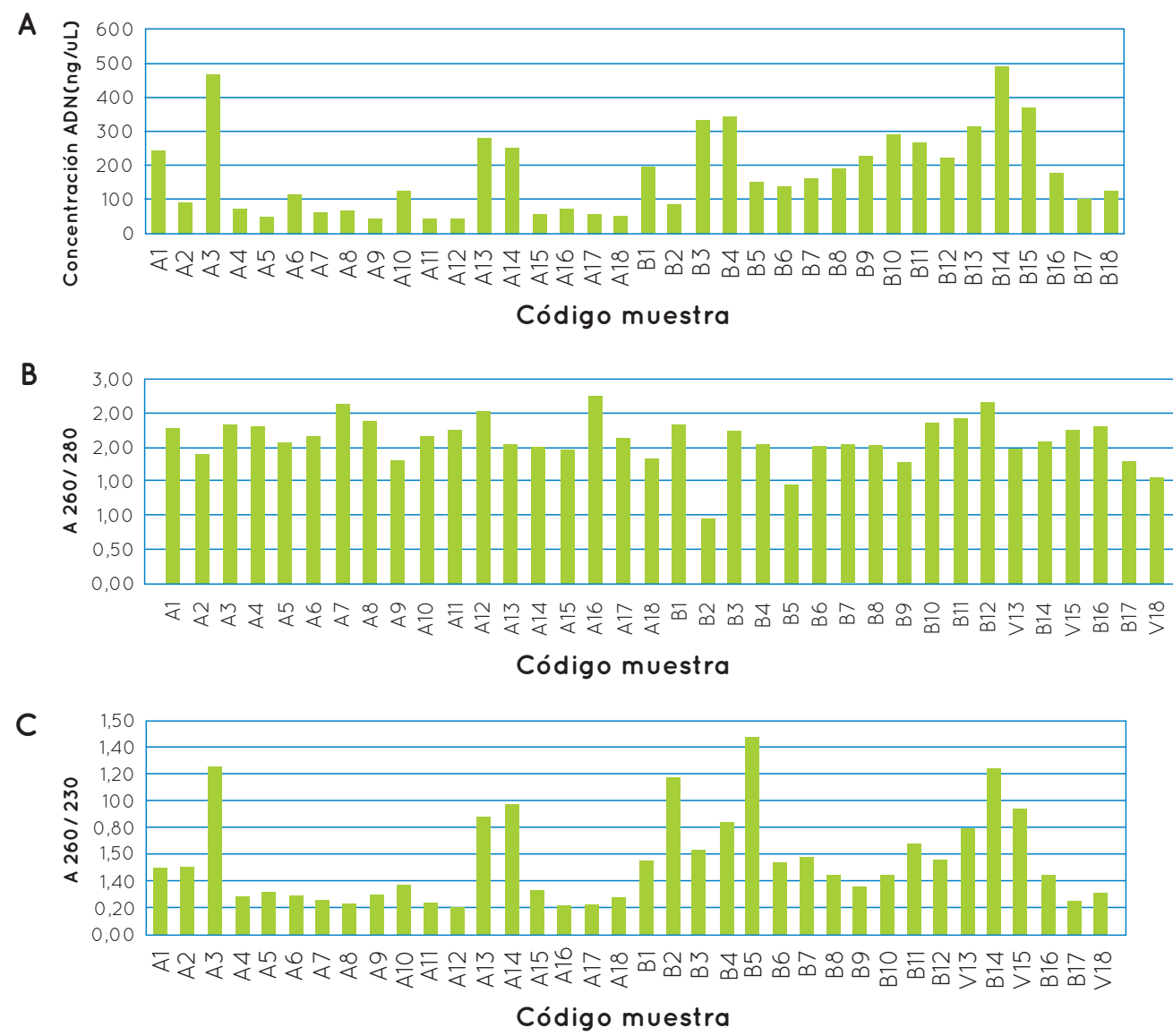


Figura 1.

Cuantificación del ADN obtenido a partir de caña de azúcar en la primera (código A) y segunda extracción (código B), mediante espectrofotómetro UV-visible. A) Concentración de ADN, B) Coeficiente 260/280, C) Coeficiente 260/230.

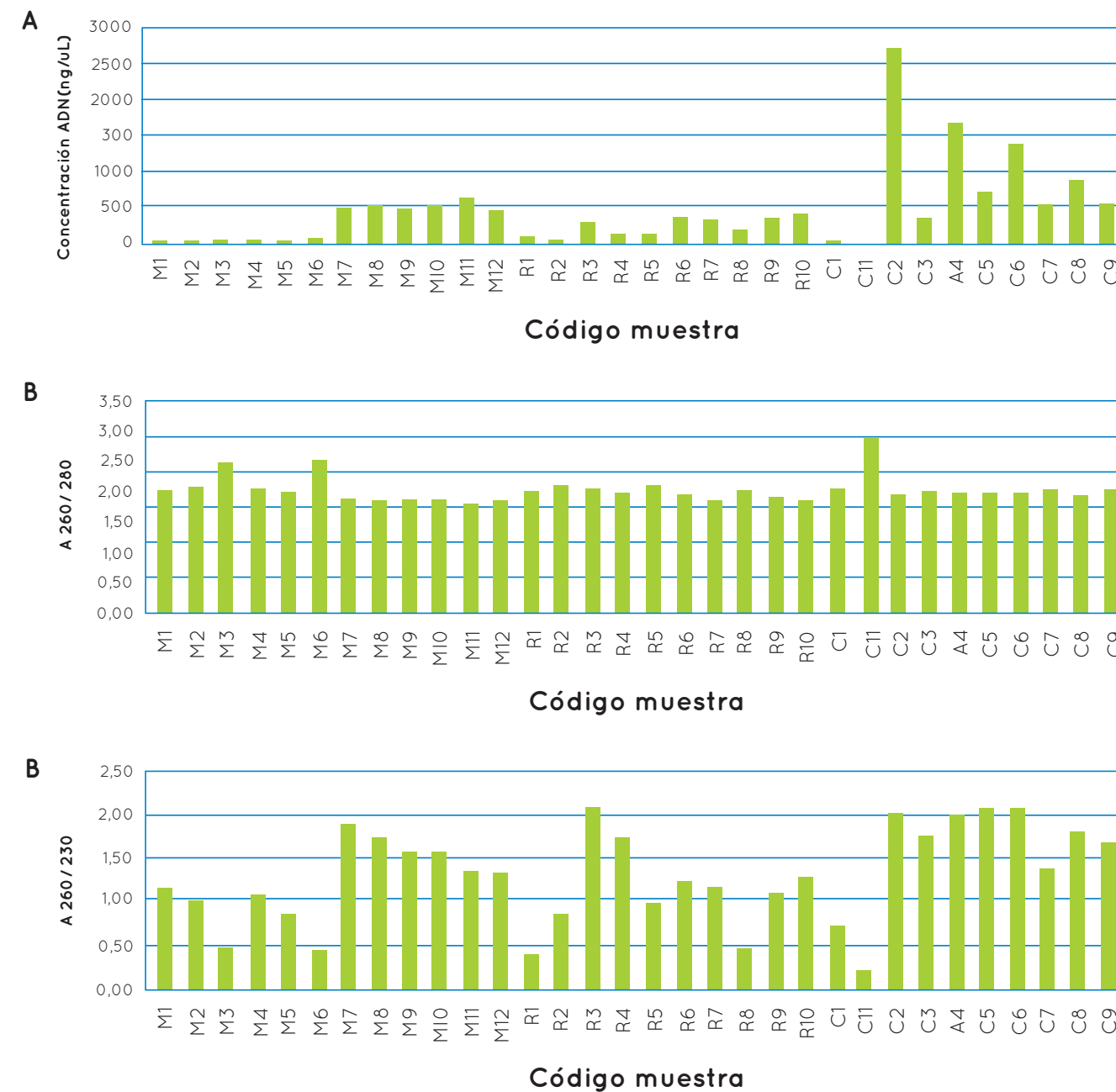


Figura 2.

Cuantificación del ADN obtenido a partir de caña de azúcar en la tercera extracción, mediante espectrofotómetro UV-visible. A) Concentración de ADN, B) Coeficiente 260/280, C) Coeficiente 260/230.

SECCIÓN CIENTÍFICA

Con respecto a la proporción 260/280, la mayoría de muestras presentaron valores dentro del rango estandarizado y las restantes obtuvieron valores levemente superiores, indicando una probable contaminación (Figuras 1 B y 2 B). En cuanto a la relación 260/280, la totalidad de los ADN obtenidos a partir de la primera y segunda extracción (Figura 1.C), presentaron coeficientes inferiores a los estándares, lo cual indica contaminación. En contraste, el ADN extraído posteriormente (Figura 2 C), obtuvo valores dentro o muy cercanos al rango esperado, principalmente las muestras provenientes de hojas, es decir, libres de contaminantes.

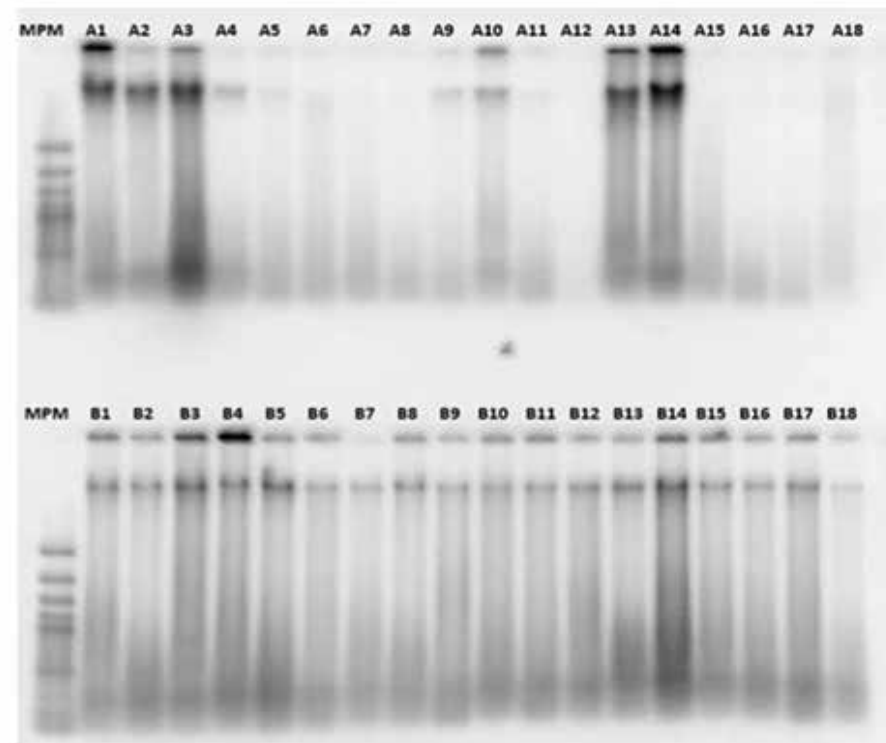


Figura 3.

Perfil de ADN genómico en gel de agarosa 1% para muestras de hojas, nervaduras y tallos de caña de azúcar; obtenido a partir de la primera (carriles superiores) y segunda (carriles inferiores) extracción. Escalera de peso molecular GeneRuler 100 bp (ThermoScientific)

Al realizar la electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico derivado de la primera extracción, se observaron algunas bandas fuertes de alto peso molecular que representan ADN íntegro y de elevada concentración, correspondientes a las muestras pulverizadas con los balines de mayor tamaño (5 y 4 mm de diámetro). Mientras que las restantes se visualizan como ADN degradado y bandas muy tenues, es decir, la eficiencia de extracción disminuyó al utilizar balines de menor tamaño (3 mm), debido a que el proceso de pulverización no fue completo (Figura 3).

El material genético obtenido a partir de la segunda extracción se visualizó como bandas de alto peso molecular similares para todas las muestras (Figura 4). En cuanto a la tercera extracción, se visualizó ADN más íntegro y concentrado para hojas y nervaduras, en comparación con

los tallos. Asimismo, para la totalidad de las muestras se observaron manchas difusas o rastros, por la presencia de ADN degradado y posible ARN remanente, debido a que no se utilizó RNasa durante el protocolo de extracción (Figuras 3 y 4).

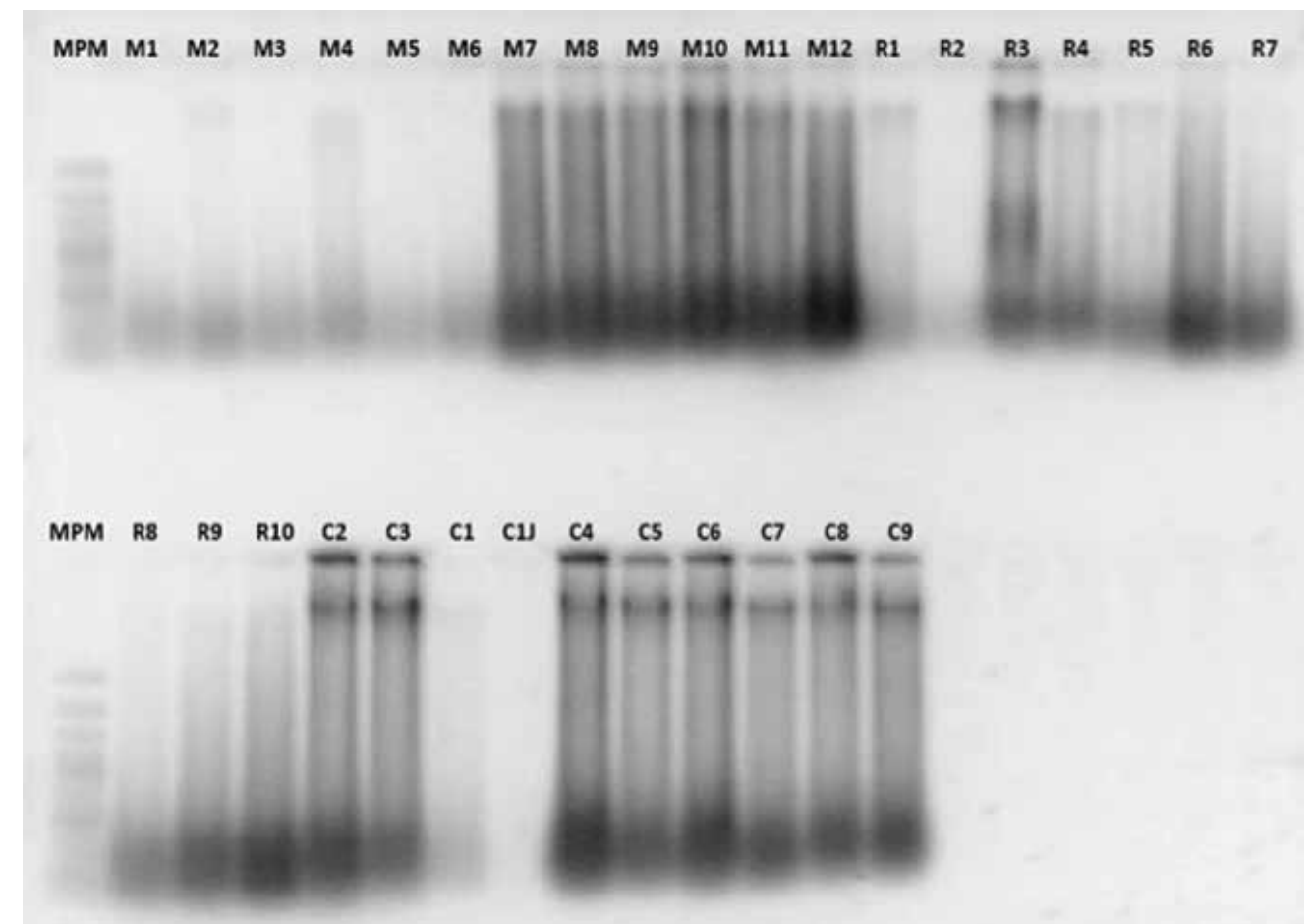


Figura 4.

Perfil de ADN genómico en gel de agarosa 1% para muestras de hojas, nervaduras y tallos de caña de azúcar; obtenido a partir de la tercera extracción. Escalera de peso molecular GeneRuler 100 bp (ThermoScientific)



SECCIÓN CIENTÍFICA

Por otro lado, el material genético extraído del control positivo para ELISA de *X. albilineans* dio una concentración de solo 2,2 ng/μL. En cuanto al coeficiente 260/280 resultó un valor de 1,74, ubicado dentro del rango óptimo; sin embargo, la proporción 260/230 con un valor de 0,7 indica posible contaminación. Además este ADN no se logró visualizar en el gel de agarosa 1%, debido a la baja concentración.

Amplificaciones por PCR punto final

Se logró el diagnóstico de *X. albilineans* mediante

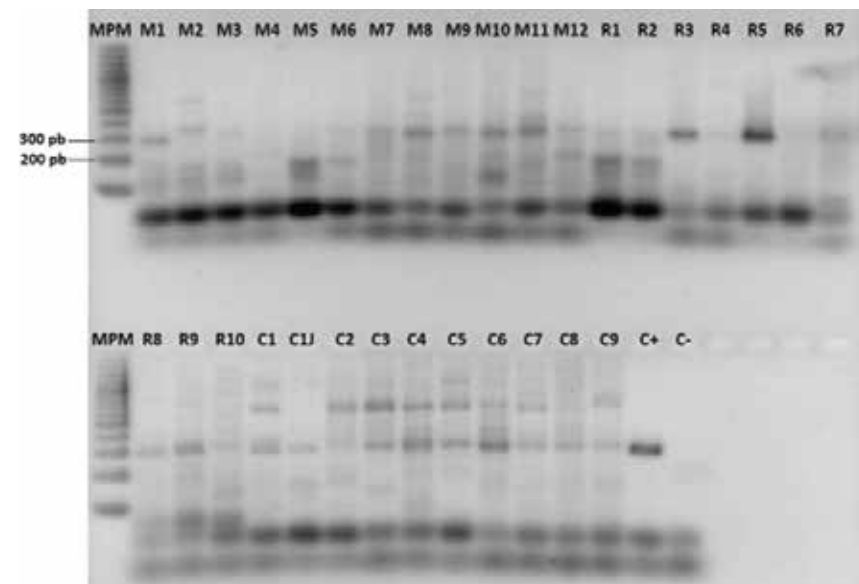


Figura 5.

Productos de amplificación por PCR punto final mediante los cebadores PGBL1/PGBL2 (288 pb) para la detección de la región ITS de *X. albilineans* en ADN extraído de caña de azúcar, visualizados con electroforesis en gel de agarosa 3%. El control positivo 2 (C+) corresponde al ADN del extracto para ELISA y el control negativo (C-) es un control de reacción PCR sin ADN. Escalera de peso molecular GeneRuler 100 bp (ThermoScientific).

los cebadores PGBL1/PGBL2 (Figura 6) a una temperatura de alineamiento de 57°C. También de *L. xyli subsp. xyli* con los iniciadores 202F/331R, utilizando un *touchdown*³ de la temperatura de alineamiento a 59,5°C (-0,5°C/ciclo) (Figura 7).

Mientras que con los cebadores restantes que fueron probados, no fue posible obtener amplicones del peso molecular esperado para ninguna de las muestras, solamente se visualizaron algunas amplificaciones inespecíficas con CxxITSf#5/CxxITSr#5 y XAprF6/XAprR6.

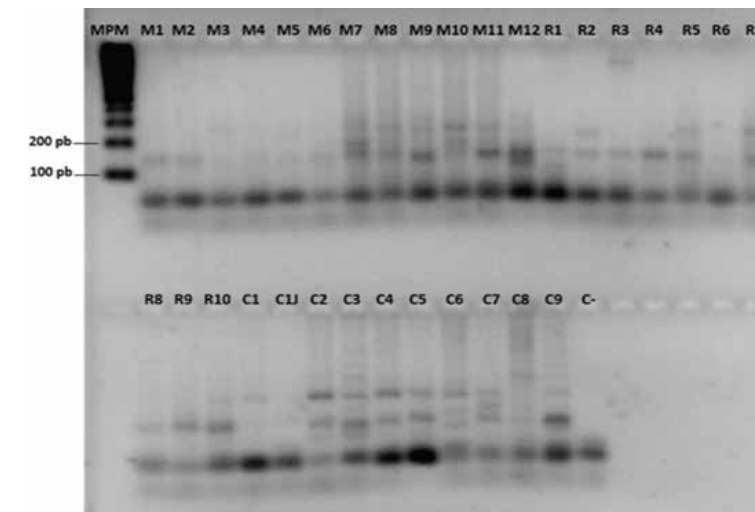


Figura 6.

Productos de amplificación por PCR punto final mediante los cebadores 202F/331R (130 pb) para la detección de la región ITS de *L. xyli subsp. xyli* en ADN extraído de caña de azúcar, visualizados con electroforesis en gel de agarosa 3%. El control negativo (C-) es un control de reacción PCR sin ADN. Escalera de peso molecular GeneRuler 100 bp (ThermoScientific).

En cuanto a los diferentes tejidos, se visualizaron amplicones positivos más nítidos para las muestras de tallos, ya que con las hojas y nervaduras se observó una mayor frecuencia de amplificaciones inespecíficas y artefactos. Para algunas de las muestras no hubo correspondencia entre la presencia e intensidad de las bandas positivas que se obtuvieron para tallo y hoja de la misma planta.

En el Cuadro 2 se evidencia que del total de 32 muestras analizadas, 18 resultaron positivas para la presencia de *X. albilineans*, de las cuales, 31,25% corresponden a hojas, 12,5% a tallos y 3 de las 4 muestras provenientes de nervaduras que se utilizaron. Mientras que 19 fueron positivas para *L. xyli subsp. xyli*, el 31,25% corresponden a hojas y el 18,75% a tallos. Lo anterior indica que el diagnóstico de ambas bacterias fue exitoso a partir de los tres tejidos.



³Touchdown es una técnica para incrementar la especificidad de las reacciones de PCR, en la que se incrementa la temperatura de alineamiento de los imprimadores por arriba de lo recomendado para luego reducirla gradualmente.

Cuadro 2.

Evaluación por PCR punto final de la presencia o ausencia de *X. albilineans* y *Leifsonia subsp xyli* en en muestras de tallos, hojas y nervaduras de caña de azúcar.

Variedad o procedencia	Planta	Tipo de tejido	Código	Xalb_PGBL1/PGBL2	Lxx_202F/331R
Mex 79-431	1	Tallo	M1	+	+
	2	Tallo	M2	-	+
	3	Tallo	M3	SR	-
	4	Tallo	M4	-	-
	5	Tallo	M5	-	-
	6	Tallo	M6	SR	SR
	1	Hoja	M7	+	+
	2	Hoja	M8	+	+
	3	Hoja	M9	+	+
	4	Hoja	M10	+	-
	5	Hoja	M11	+	+
	6	Hoja	M12	SR	+
RB 73-9735	7	Tallo	R1	-	SR
	8	Tallo	R2	-	+
	9	Tallo	R3	+	+
	10	Tallo	R4	-	+
	11	Tallo	R5	+	+
	7	Hoja	R6	-	-
	8	Hoja	R7	SR	+
	9	Hoja	R8	+	SR
	10	Hoja	R9	+	+
	11	Hoja	R10	SR	+
Caña comercial	12	Tallo	C1	+	-
	12	Jugo	C1J	+	-
	12	Hoja	C2	SR	+
	12	Nervadura	C3	+	+
Semillero	13	Hoja	C4	+	+
	13	Nervadura	C5	+	+
Planta I	14	Hoja	C6	+	-
	14	Nervadura	C7	+	SR
Planta II	15	Hoja	C8	+	-
	15	Nervadura	C9	SR	+

SR, sin resultado confiable

El gradiente térmico realizado para optimizar la detección de *X. albilineans* (Figura 7) demostró que la amplificación ocurre incluso a temperaturas de annealing notablemente más elevadas que la temperatura de melting propia de los cebadores PGBL1 (60,5°C) y PGBL2 (58,4°C). Se visualizaron amplicones nítidos incluso hasta la temperatura más alta que se probó (65°C), tanto para la muestra de campo R5, como para el control positivo. En la primera se observa que la banda se va atenuando conforme incrementa esta variable, pero se mantiene nítida.

Por otro lado, el mismo gradiente térmico llevado a cabo con los cebadores 202F/331R para optimizar el diagnóstico de *L. xyli subsp. xyli*, se observaron amplicones de tamaño esperado en todo el rango de temperaturas desde 63 hasta 65°C, aunque la temperatura de disociación de los imprimadores es inferior (61,3°C). Sin embargo, se visualizaron bandas muy tenues y se presentó una amplificación inespecífica en todo el gradiente

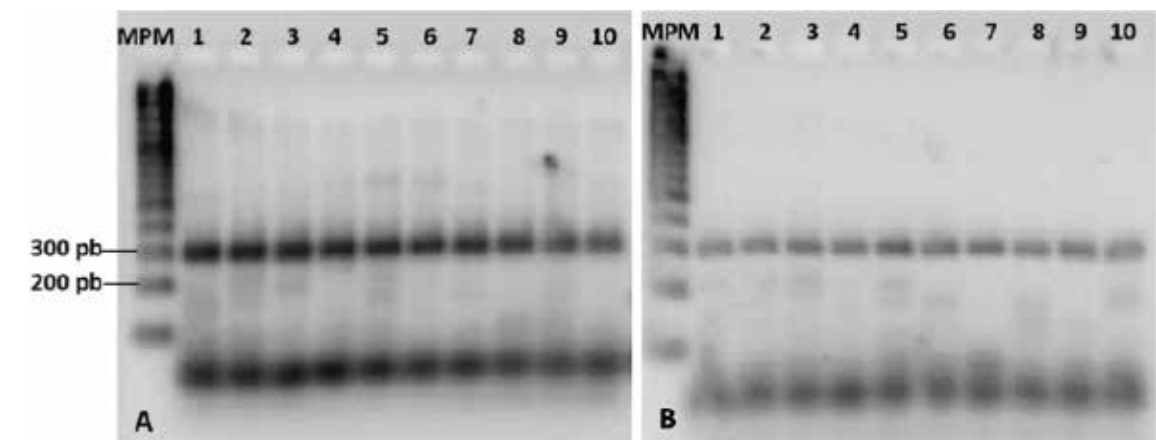


Figura 7.

PCR gradiente térmico 53-65°C con los cebadores PGBL1/PGBL2 (288 pb) visualizado con electroforesis en gel de agarosa 3%, A) Muestra de campo R5 extraída de caña de azúcar, B) Control positivo 2 de *X. albilineans*. Temperaturas: 1= 53°C; 2= 53,8°C; 3= 54,8°C; 4= 56,2°C; 5= 57,9°C; 6= 59,8°C; 7= 61,6°C; 8= 63°C; 9= 64,1°C; 10= 65°C.

La prueba de sensibilidad demostró que la técnica PCR fue capaz de detectar la presencia de *X. albilineans* hasta la concentración más baja (0,03 ng) del ADN de planta infectada, a esta

concentración se obtuvo la banda más tenue, pero igualmente resultó un amplicón claro (Figura 8).



Figura 8.

Prueba de sensibilidad con PCR punto final mediante los cebadores PGBL1/PGBL2 (288 pb) en control positivo 1 de *X. albilineans*, visualizados con electroforesis en gel de agarosa 3%. Concentraciones: 1= 3 ng; 2= 0,3 ng; 3= 0,06 ng; 4= 0,03 ng. Escalera de peso molecular GeneRuler 100 bp (ThermoScientific).

Discusión

El perfil de ADN genómico obtenido evidenció la presencia de contaminación por ARN, esto advierte la gran necesidad de adicionar enzimas RNasas en el protocolo de extracción para obtener un ADN más puro y por ende, más adecuado para llevar a cabo técnicas moleculares como PCR (Fraga *et al*, 2004; Poutou *et al*, 2005)

Asimismo, es imprescindible realizar la cuantificación del ADN extraído, ya que se requieren concentraciones específicas de ADN para las ampliificaciones por PCR, debido a que la adición de un exceso de material genético puede interferir con la reacción (de Lourdes *et al*, 2013), para esto se prepararon las respectivas diluciones. Esto debido a que los resultados obtenidos muestran altas concentraciones para prácticamente todas las muestras, principalmente las correspondientes al tejido foliar. Los tallos obtuvieron concentraciones inferiores debido a que poseen mayor contenido de agua en comparación con una masa equivalente de tejido foliar.

También es esencial la determinación de la pureza mediante los coeficientes 260/280 y 260/230, el primero se calcula para detectar posible contaminación con proteínas si el valor es inferior al rango establecido (1,8-2,0), o contami-

nación con solventes como cloroformo o fenoles cuando se encuentra por encima del rango. La relación 260/230 indica contaminación con sales, carbohidratos, polifenoles, entre otros, cuando el valor está fuera del rango óptimo (2 a 2,2). (Osorio *et al*, 2013).

La mayoría de muestras se encontraron libres de proteínas; sin embargo, los valores de la absorbancia 260/230 fueron muy variados. Lo anterior se debe a que las hojas de caña de azúcar se caracterizan por poseer alto contenido de polifenoles y carbohidratos, estas sustancias pueden permanecer como remanentes en el ADN extraído e inhibir la reacción de PCR, los polifenoles en sus formas oxidadas se unen irreversiblemente a los ácidos nucleicos y a las proteínas durante la lisis en el proceso de extracción, originando una coloración marrón e interfieren con los análisis moleculares posteriores (Johari & Majumder, 2015).

Por otro lado, los carbohidratos también pueden quedar remanentes en el ADN extraído, y como consecuencia, impiden la resuspensión completa de los ácidos nucleicos precipitados durante la extracción. Además, afectan la actividad enzimática en el proceso de amplificación por PCR al asemejarse a la estructura del ADN. (Schrader *et al*, 2012). Lo primero también podría

explicar que las concentraciones inferiores se obtuvieron para tallo y jugo, los cuales poseen mayor concentración de azúcares que los tejidos foliares.

Por las razones anteriores, se debe seleccionar el método de extracción correcto y optimizarlo, con el propósito de obtener el máximo rendimiento y evitar la co-purificación de inhibidores. Se ha demostrado que el método de extracción CTAB con diversas modificaciones, es eficiente para extraer ADN a partir de plantas con alto contenido de estas sustancias, dando como resultado elevados rendimientos (Turaki *et al*, 2017; Shen *et al*, 2016; Racedo *et al*, 2016). Sin embargo, no es capaz de remover por completo contaminantes (Hu *et al*, 2015), lo cual coincide con los resultados obtenidos para la absorbancia 260/280 que indicó presencia de impurezas.

En un estudio realizado por Fu y colaboradores (2016), se estandarizó el diagnóstico molecular de *L. xyli subsp. xyli* empleando el jugo de caña como fuente del material genético para el análisis, y la detección resultó exitosa tanto por PCR punto final como por qPCR. Además indicaron que el protocolo de extracción es más rápido al omitir el paso de pulverización y se disminuye la presencia de inhibidores, en comparación con tejido proveniente de hojas. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que la extracción de ADN a partir de jugo de caña fue la menos eficiente en cuanto a la concentración y pureza, además no fue posible obtener bandas nítidas mediante la amplificación por PCR.

La detección también es posible a través de la vaina y lámina de la hoja para ambas bacterias, esto posee la ventaja de posibilitar el análisis de cultivos jóvenes que ni han desarrollado tallo y además el muestreo es menos invasivo, más rápido y no es necesario destruir la planta completa para llevar a cabo el diagnóstico (Young & Nock, 2017; Gutierrez *et al*, 2016). Por lo tanto, se considera el tejido foliar como el más óptimo, debido a que se extrajo ADN con índices de pureza aceptables, con las concentraciones más elevadas y con el perfil más íntegro, además permite el muestreo no destructivo.

Se ha demostrado que la concentración bacteriana (UFC/mL) varía dependiendo del tejido de la planta, en una investigación fueron probados tres tejidos distintos, meristemo apical, hoja y base del tallo con el propósito de determinar la mejor

fente para la detección de *X. albilineans*; de esta forma, las poblaciones bacterianas más elevadas fueron encontradas en el primero (Gutierrez *et al*, 2016). Considerando lo anterior, es importante experimentar con meristemo apical, además de los tejidos analizados.

Se ha comprobado que las técnicas moleculares como la PCR punto final y qPCR son altamente sensibles, capaces de detectar *X. albilineans* tanto en plantas con síntomas sistémicos como severos, en áreas cloróticas y necróticas, incluso en ausencia de signos visibles de la infección (Garces *et al*, 2014). Por esta razón, en este estudio las muestras fueron analizadas por PCR punto final, ya que otras técnicas de inmunodetección, como el ELISA que se utiliza actualmente, poseen una sensibilidad considerablemente inferior. Además, al ser una bacteria sistémica capaz de colonizar hojas, tallos y raíces; posibilita el diagnóstico a partir de cualquier tejido de la planta (Pieretti *et al*, 2015).

Igualmente, estas técnicas moleculares son más eficientes para detectar el agente causal del raquitismo de retoños, incluso en etapas tempranas del crecimiento de la planta, ya que durante los primeros estadios de desarrollo, las hojas son el único tejido disponible para el muestreo. Mientras que para otros ensayos como el TB-EIA, se necesita esperar hasta la madurez del tallo, debido a que requiere elevadas concentraciones de la bacteria, que se encuentran en el fluido del xilema (Grisham *et al*, 2007), lo cual consiste en



SECCIÓN CIENTÍFICA

una limitación para la detección temprana del patógeno.

En el presente estudio se logró el diagnóstico de ambas bacterias, tanto de ADN extraído de tallos y como de los tejidos foliares. Aunque en los últimos, el porcentaje de resultados positivos fue mayor, al igual que la persistencia de amplificaciones inespecíficas.

A pesar de que la detección de los fitopatógenos fue exitosa, es necesario continuar con su optimización con el propósito de obtener resultados confiables para la totalidad de las muestras. Para lo cual, es recomendable aumentar la temperatura de annealing y por ende, la especificidad de unión de los cebadores a la secuencia blanco, disminuyendo la generación de amplificaciones inespecíficas. Esto es posible, ya que los resultados mostraron que la amplificación también ocurre a temperaturas considerablemente más elevadas.

Además, se ha comprobado que ciertos inhibidores presentes en el ADN molde, actúan obstaculizando el alineamiento de los cebadores a la secuencia blanco durante la PCR, ya que la sustancia compite de manera activa por la unión a la hebra molde de ADN, lo cual se puede solucionar utilizando cebadores con altas temperaturas de melting (Schrader *et al*, 2012), como los empleados en este estudio. Por las razones anteriormente descritas, es propicio modificar el perfil térmico elevando la temperatura de alineamiento, para evitar este tipo de inhibición e incrementar la especificidad.

Por otro lado, para la detección de ambas bacterias se utilizaron iniciadores diseñados a partir de la región intergénica 16S-23S del ARNr (ITS), los cuales son ampliamente utilizados en técnicas de amplificación por PCR, debido a que esta secuencia permite el diagnóstico específico, la identificación y la clasificación taxonómica de bacterias, además cabe destacar que se encuentra entre dos regiones altamente conservadas (Iglesia *et al*, 2007; Young & Nock, 2017, Fegan *et al*, 1998, Pan *et al*, 1999).

Sin embargo, se han diseñado cebadores con mayor especificidad, como los XAprF6/ XAprR6, los cuales amplifican la secuencia de ADN que codifica para la toxina albicidina producida por *X. albilineans*, (Garces *et al*, 2014) o los Pat1-F2/ Pat1-R2 que detectan el gen Pat1 de *L. xyli* subsp.

xyli. (Fu *et al*, 2016) Sin embargo, en esta investigación no fue posible obtener ningún amplicón del peso molecular esperado al analizar las muestras de campo mediante los mismos, por esto, se recomienda llevar a cabo la optimización con controles positivos certificados, porque existe la posibilidad de que el patógeno esté ausente en todas las muestras. Ya que, se ha comprobado que los PPGBL1/PGBL2 no discriminan entre especies distintas de *Xanthomonas* spp. (Sawazaki *et al*, 2013), por lo tanto es indispensable comparar los resultados obtenidos mediante los diferentes cebadores y seleccionar los más convenientes.

En Australia se reportó por primera vez la existencia de otras cepas de *Leifsonia* spp. asociadas a la caña de azúcar, además de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, las mismas fueron identificadas mediante secuenciación de la región ITS, seguido del análisis filogenético (Young & Nock, 2017). Sin embargo, no se tiene evidencia de que esas otras bacterias generen patogenicidad. Además, en Brazil se aisló una nueva cepa de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* a partir de caña de azúcar, la cual se identificó por secuenciación del gen 16S (Zavaglia *et al*, 2016).

Por otro lado, una investigación en Francia reveló que entre las 19 diferentes cepas de *X. albilineans* genéticamente muy cercanas que lograron aislar, hubo variabilidad en cuanto a la patogenicidad y capacidad de colonización del tallo y la expresión de los síntomas foliares (Champoiseau *et al*, 2006). Se conoce que la virulencia que posee esta bacteria está dada por genes específicos, entre ellos el que codifica para la endoglucanasa PglA, tres transportadores dependientes de TonB y un grupo de genes del metabolismo del glucógeno (Pieretti *et al*, 2015).

Por último, ha sido ampliamente comprobado que la técnica qPCR es más sensible y eficiente que requiere menor tiempo que la PCR convencional, y que se ha observado que resultan más muestras positivas mediante la primera en comparación con la PCR punto final (Naidoo *et al*, 2017), esto porque es capaz de detectar concentraciones considerablemente bajas de la secuencia blanco, hasta 10⁻⁵ ng de ADN bacteriano en 100 ng de ADN de la planta (Carvalho *et al*, 2016). Esto evidencia la necesidad de confirmar los resultados obtenidos en este trabajo, mediante qPCR, además de realizar la respectiva cuantificación.

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar un protocolo de extracción de ADN, obteniendo elevadas concentraciones del material genético, de pureza y calidad aceptables, lo cual es sumamente importante para los análisis moleculares posteriores.

Además fue posible detectar la presencia de fitopatógenos en plantas es de caña de azúcar provenientes de campo, mediante la técnica PCR punto final, una técnica altamente sensible y específica. Esto se considera un gran aporte a DIECA para implementar el diagnóstico temprano de plantas cultivadas *in vitro* y así evitar la propagación de material infectado.



Recomendaciones

Para disminuir la degradación del ADN obtenido, no se debe exceder el tiempo de liofilización a más de tres días, ya que este periodo es suficiente para la desecación requerida de las muestras. También es recomendable reducir las agitaciones exhaustivas durante el proceso de incubación al extraer el ADN, para mantener la integridad del mismo.

Además, durante la ejecución del protocolo de extracción, se debe adicionar RNasa con el fin de eliminar el ARN remanente y así obtener ADN más puro y con un perfil más íntegro de mejor calidad para llevar a cabo los análisis moleculares.

En cuanto a las amplificaciones por PCR, se recomienda dar continuidad a la optimización del método, con el propósito de generar resultados más confiables. Para esto es necesario experimentar con imprimadores de mayor especificidad y con temperaturas de alineamiento más elevadas y además modificar otras variables del perfil térmico, como el tiempo que requiere cada fase de reacción, la cantidad de ciclos, entre otros. Asimismo es importante probar gradientes de concentración de los reactivos que se utilizan

para la reacción PCR, con la finalidad de definir el procedimiento más apto, confiable y técnicamente viable.

También se advierte la necesidad de llevar a cabo la optimización identificando controles positivos confiables, ya que cabe la posibilidad de que el patógeno esté ausente en las muestras de campo y como consecuencia se consume gran cantidad de tiempo y reactivos sin lograr resultados.

De la misma forma es imprescindible incluir reacciones control al llevar a cabo la PCR para detectar falsos negativos provocados por la presencia de inhibidores o severa degradación del ADN molde, como los controles positivos internos y externos, así como de amplificación.

La qPCR puede ser empleada para confirmar los resultados obtenidos, ya que es más sensible, además es capaz de cuantificar el ADN blanco.



Referencias bibliográficas

- Carvalho, G., da Silva, T. G., Munhoz, A. T., Monteiro-Vitorello, C. B., Azevedo, R. A., Melotto, M., & Camargo, L. E. A. (2016). Development of a qPCR for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and quantification of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. *Crop Protection*, 80, 51-55.
- Champoiseau, P., Daugrois, J. H., Pieretti, I., Cociancich, S., Royer, M., and Rott, P. 2006. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology* 96, 1081-1091.
- Chavarría, E. (2006). Escalas Descriptivas para la Evaluación de Enfermedades de la Caña de Azúcar. DIECA-LAICA.
- Chaves, M. & Chavarría, E. (2013). ¿Cómo se distribuye y dónde se cultiva territorialmente la caña destinada a la fabricación de azúcar en Costa Rica? Memoria Congreso ATACA 19, Congreso ATACORI 20, Tomo I. Heredia, Costa Rica. P. 179-203.
- Daugrois, J. H., Boisne-Noc, R., & Rott, P. (2014). Leaf surface colonization of sugarcane by *Xanthomonas albilineans* and subsequent disease progress vary according to the host cultivar. *Plant Disease*, 98(2), 191-196.
- De Lourdes Torres, M., Mejía, L., & Arahana, V. S. (2013). Estandarización de un protocolo para detección de OGMs: evaluación de la presencia de OGMs en granos de soya colectados en diferentes centros de acopio de Ecuador. *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 5(1).

- Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19, 11-15.
- Fegan, M., Croft, B. J., Teakle, D. S., Hayward, A. C., & Smith, G. R. (1998). Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. *Plant Pathology*, 47(4), 495-504.
- Fraga-Nodarse, J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., & Fernández-Calienes, A. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(3), 203-207.
- Fu, H. Y., Sun, S. R., Wang, J. D., Ahmad, K., Wang, H. B., Chen, R. K., & Gao, S. J. (2016). Rapid and Quantitative Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Sugarcane Stalk Juice Using a Real-Time Fluorescent (TaqMan) PCR Assay. *BioMed research international*, 2016.
- Garces, F. F., Gutierrez, A., & Hoy, J. W. (2014). Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. *Plant Disease*, 98(1), 121-126.
- Ghai, M., Singh, V., Martin, L. A., McFarlane, S. A., Antwerpen, T., & Rutherford, R. S. (2014). A rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* targeting a transposase gene. *Letters in applied microbiology*, 59(6), 648-657.
- Grisham, M. P., Pan, Y. B., & Richard Jr, E. P. (2007). Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 91(4), 430-434.
- Gutierrez, A., Garces, F. F., & Hoy, J. W. (2016). Evaluation of Resistance to Leaf Scald by Quantitative PCR of *Xanthomonas albilineans* in Sugarcane. *Plant Disease*, 100(7), 1331-1338.
- Hashimi, S. M., Wall, M. K., Smith, A. B., Maxwell, A., & Birch, R. G. (2007). The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(1), 181-187.
- Hashimi, S. M., Huang, G., Maxwell, A., & Birch, R. G. (2008). DNA gyrase from the albicidin producer *Xanthomonas albilineans* has multiple-antibiotic-resistance and unusual enzymatic properties. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1382-1390.
- Hu, Q., Liu, Y., Yi, S., & Huang, D. (2015). A comparison of four methods for PCR inhibitor removal. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 94-97.
- Iglesia, A., González, R., Martín, D., Díaz, M., & Álvarez, E. (2007). Aislamiento e identificación morfológica, bioquímica y molecular de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 22(1), 29-33.
- Johari, S., & Majumder, S. (2015). An Efficient DNA Extraction Protocol for Successful PCR Detection of Banana bunchy top virus from Banana Leaves. *Asian Journal of Biotechnology*, 7(2), 80-87.

SECCIÓN CIENTÍFICA

- LAICA (Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar). (2012). Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA-LAICA). Recuperado de: <https://www.laica.co.cr/investigacion.php>
- LAICA (Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar). (2012). Plagas y enfermedades. Recuperado de: https://www.laica.co.cr/programa_plagas.php
- Langlois, P. A., Snelling, J., Hamilton, J. P., Bragard, C., Koebnik, R., Verdier, V., & Leach, J. E. (2017). Characterization of the *Xanthomonas translucens* Complex Using Draft Genomes, Comparative Genomics, Phylogenetic Analysis, and Diagnostic LAMP Assays. *Phytopathology*, 107(5), 519-527.
- Naidoo, N., Ghai, M., Moodley, K., Mkhize, L., Martin, L., McFarlane, S., & Rutherford, S. (2017). Modified RS-LAMP assay and use of lateral flow devices (LFDs) for rapid detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). *Letters in Applied Microbiology*.
- Osorio, J., Pachajoa, H., & Hurtado, P. (2013). Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. *Revista Estomatología*, 21(1).
- Pan, Y. B., Grisham, M. P., Burner, D. M., Legendre, B. L., & Wei, Q. (1999). Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant disease*, 83(3), 218-222.
- Pieretti, I., Cociancich, S., Bolot, S., Carrère, S., Morisset, A., Rott, P., & Royer, M. (2015). Full genome sequence analysis of two isolates reveals a novel *Xanthomonas* species close to the sugarcane pathogen *Xanthomonas albilineans*. *Genes*, 6(3), 714-733.
- Poutou, R., Burbano, M., Sierra, S., Torres, K., Carrascal, A. K., & Mercado, M. (2005). Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum*, 10(2).
- Quecine, M. C., Silva, T. M., Carvalho, G., Saito, S., Mondin, M., Teixeira-Silva, N. S., & Monteiro-Vitorello, C. B. (2016). A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. *Plant Pathology*, 65(1), 154-162.
- Racedo, J., Perera, M. F., Bertani, R., Funes, C., González, V., Cuenya, M. I. & Castagnaro, A. P. (2016). Molecular Diagnostic of Both Brown and Orange Sugarcane Rust and Evaluation of Sugarcane Brown Rust Resistance in Tucuman, Argentina, Using Molecular Markers Associated with Bru. *Sugar Tech*, 18(4), 414-419.
- Sawazaki, H. E., Nogueira de Sá, L. A., Goncalves, C. R., Ferraz, R., & Colombo, C. (2013). Molecular diagnosis optimization of virus, bacteria and fungi in sugarcane. *International Research Journal of Plant Science*, 4(3), 76-83.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1014-1026.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). (2016). Boletín *Estadístico Agropecuario*. San José, Costa Rica.

- Shen, W., Xu, G., Sun, L., Zhang, L., & Jiang, Z. (2016). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. *Annals of Applied Biology*, 168(3), 321-327.
- Solas, M. T., Piñón, D., Acevedo, R., Fontaniella, B., Legaz, M. E., & Vicente, C. (2003). Ultrastructural changes and production of a xanthan-like polysaccharide associated with scald of sugarcane leaves caused by *Xanthomonas albilineans*. *European journal of plant pathology*, 109(4), 351-359.
- Turaki, A. A., Ahmad, B., Magaji, U. F., Abdulrazak, U. K., Yusuf, B. A., & Hamza, A. B. (2017). Optimised cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction method of plant leaf with high polysaccharide and polyphenolic compounds for downstream reliable molecular analyses. *African Journal of Biotechnology*, 16(24), 1354-1365.
- Umaña, R., Clara, P., Juan, R. A., Fernando, R., & Gabriela, P. (2013). Evaluation of four viroid RNA extraction methods for the molecular diagnosis of CEVd in Citrus lemon using RT-PCR, Dot blot and Northern blot. *Bioteconología Aplicada*, 30, 125-130.
- Yabar, C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. *Serie de normas técnicas*. Lima: Perú.
- Young, A. J., & Nock, C. J. (2017). Molecular Detection of Diverse *Leifsonia* Strains Associated With Sugarcane. *Plant Disease*, 101(8), 1-42.
- Zavaglia, A. C., Cia, M. C., Popin, R. V., & Camargo, L. E. A. (2016). No alternative hosts of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* were identified among grass and non-grass species using novel PCR primers. *Tropical Plant Pathology*, 41(5), 336-339.



Cuadro 3.

Cuantificación del ADN extraído a partir de caña de azúcar en la primera (código A) y segunda extracción (código B), mediante espectrofotómetro UV-visible.

Muestra	Concentración ADN (ng/μL)	A 260/280	260/230
A1	A1	2,33	0,51
A2	A2	1,94	0,51
A3	A3	2,16	1,26
A4	A4	2,36	0,29
A5	A5	2,1	0,34
A6	A6	2,2	0,29
A7	A7	2,69	0,27
A8	A8	2,42	0,25
A9	A9	1,85	0,32
A10	A10	2,2	0,39
A11	A11	2,31	0,26
A12	A12	2,56	0,21
A13	A13	2,09	0,9
A14	A14	2,04	0,99
A15	A15	2,01	0,35
A16	A16	2,81	0,23
A17	A17	2,2	0,23
A18	A18	1,88	0,28
B1	B1	2,37	0,56
B2	B2	1	1,2
B3	B3	2,29	0,65
B4	B4	2,11	0,86
B5	B5	1,49	1,48
B6	B6	2,06	0,55
B7	B7	2,09	0,58
B8	B8	2,05	0,46
B9	B9	1,82	0,37
B10	B10	2,39	0,45
B11	B11	2,48	0,36
B12	B12	2,7	0,51
B13	B13	2,02	0,64
B14	B14	2,12	0,59
B15	B15	2,31	0,62
B16	B16	2,35	0,41
B17	B17	1,84	0,27
B18	B18	1,59	0,26

Cuadro 4.

Cuantificación del ADN extraído a partir de caña de azúcar en la tercera extracción, mediante espectrofotómetro UV-visible.

Muestra	Concentración ADN (ng/μL)	A 260/280	260/230
M1	58,9	2,02	1,16
M2	54,2	2,09	1,02
M3	63,6	2,48	0,5
M4	80,8	2,05	1,09
M5	46,9	1,99	0,87
M6	88,8	2,51	0,46
M7	517	1,9	1,88
M8	545,2	1,88	1,72
M9	511	1,87	1,56
M10	535,1	1,86	1,56
M11	652,8	1,81	1,34
M12	481,1	1,87	1,32
R1	118,6	2	0,4
R2	49,9	2,1	0,86
R3	314,6	2,06	2,07
R4	158,1	1,98	1,72
R5	172,9	2,11	1
R6	396,9	1,94	1,23
R7	333,1	1,87	1,15
R8	214	2,03	0,47
R9	357	1,93	1,11
R10	449,9	1,88	1,29
C1	61,3	2,05	0,73
C1J	15,9	2,89	0,23
C2	2731,4	1,94	2
C3	392,2	2,01	1,74
C4	1685,5	1,98	1,99
C5	745,2	1,98	2,06
C6	1393,5	1,98	2,05
C7	569,7	2,04	1,38
C8	909,6	1,96	1,8
C9	566,4	2,02	1,68



A La floración no es un factor deseado para la producción comercial de caña de azúcar, pero desde el punto de vista del mejoramiento genético, la floración es un elemento esencial para la realización de múltiples cruzamientos, a través de los cuales se busca superar deficiencias de la caña de azúcar, mediante el intercambio de genes, tratando de buscar la mayor concentración de caracteres positivos en las variedades. Es por este motivo que la conservación del germoplasma en cualquier cultivo es sumamente importante

EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA E INTENSIDAD DE LA FLORACIÓN EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp*) EN COSTA RICA, DURANTE EL AÑO 2016

Juan Pablo Carvajal Quesada¹, José Roberto Duran Alfaro², Alvaro Angulo Marchena³

Resumen

El objetivo de este trabajo es el determinar la incidencia e intensidad de la floración en el banco de germoplasma de caña de azúcar de Costa Rica, así como describir el comportamiento de la floración de los principales grupos de variedades por centro de origen, que se encuentran presentes en nuestro país.

Para alcanzar el objetivo se realizaron visitas al banco de germoplasma de caña de azúcar, el cual se encuentra ubicado en San Miguel de Cañas, Guanacaste. La evaluación se realizó entre los meses de octubre a diciembre de 2016. La parcela sembrada por cada variedad en el banco de germoplasma es de un surco de tres metros de largo, en esta se contaron de forma continua 10 tallos adultos, sin tomar en cuenta brotes ni tallos inmaduros (mamones), para extraer la información de floración. Se evaluó la incidencia, la intensidad y días a floración (Precoces < 220 días e Intermedias a tardías 221 - 280 días).

De las 1045 variedades que componen este banco, 549 presentaron floración, lo que equivale a un 52,53 % del total de materiales. El porcentaje de floración promedio de estas variedades fue de un 72,0%, lo que equivale a una floración **intensa**, según los parámetros utilizados para evaluar

floración. De las 549 variedades que florecieron, 44 presentaron flor antes de los 220 días de edad, catalogándose como materiales precoces y 545 mostraron o mantuvieron flor entre los 221 y 280 días de edad, siendo estas variedades intermedias a tardías.

El comportamiento de la floración en este banco de germoplasma es muy diverso, ya que se encontraron grupos como las variedades provenientes de Estados Unidos y Argentina con una floración **muy intensa**, mientras que en otros grupos como el de Barbados, Oceanía, México, Colombia y Puerto Rico, la intensidad de floración fue **media**.

Introducción

La floración no es un factor deseado para la producción comercial de caña de azúcar, ya que la planta no puede permanecer en el campo en este estado por mucho tiempo, porque disminuye las toneladas de caña por deshidratación e inversión de azúcares (Castillo y Silva 2004; Viveros *et al*, 1991). La floración es una cadena de procesos fisiológicos complejos que consta de varias etapas de desarrollo, donde cada una de

¹Ingeniero Agrónomo, funcionario del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA), Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA). Programa de Variedades. Grecia, Costa Rica. E-mail: pcarvajal@laica.co.cr. Teléfono (506) 2494-1129/ (506) 2494-7555.

²Ingeniero Agrónomo, funcionario del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA), Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA). Jefe Programa de Variedades. Grecia, Costa Rica. E-mail: jduran@laica.co.cr. Teléfono (506) 2494-1129/ (506) 2494-7555.

³Ingeniero Agrónomo, funcionario del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA), Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA). Coordinador Región Guanacaste Este, Cañas, Costa Rica. E-mail: aangulo@laica.co.cr. Teléfono (506)



estas tiene distintas necesidades fisiológicas y ambientales que se producen dentro de un período de más de 120 días después de la siembra. Entre los diversos factores que influyen para que se dé la floración se encuentran los internos (genotipo, edad de la caña, estímulo inductivo, hormonas) y externos (fotoperiodo, temperatura, humedad, latitud, condiciones químicas del suelo) (Carabaloso *et al.*, 2011; Araldil *et al.*, 2010; Polo 2005; Silva *et al.* 2013).

Contrariamente, para los programas de mejoramiento genético, la floración es un factor esencial (Viveros *et al.*, 1991) para la realización de múltiples cruzamientos, lo que significa un medio efectivo de superar deficiencias de la caña de azúcar a través de la reconstitución del material genético (Gómez 2015).

Actualmente existen diversos centros de investigación alrededor del mundo, que cuentan con jardines de variedades o bancos de germoplasma, para preservar la diversidad de los recursos fitogenéticos de las especies cultivadas y sus especies relacionadas, con el fin de realizar cruzamientos y de obtener nuevos materiales genéticos aptos para las diversas condiciones de suelo, sequía, exceso de agua, entre otros (Chaves 2013). Cabe recalcar que los recursos genéticos constituyen la base del desarrollo de programas de mejoramiento genético, ya que los híbridos modernos poseen una estrecha base genética y uno de los objetivos de todo programa de mejoramiento genético es precisamente ampliar esa base genética (Arellano-Litardo *et al.*, 2010; Bello-Bello *et al.*, 2014).

Como lo indica Chaves (2013), las funciones tradicionales de protección, acumulación y conservación de los bancos de germoplasma tienen un papel importante en la conservación de las espe-

cies; además de poder efectuar diversas evaluaciones de variabilidad genética, estudios filogenéticos, para seleccionar los materiales con los mejores caracteres deseables para realizar la mayor cantidad de cruzamientos posibles, con los progenitores que presenten mejor adaptación a nuestras condiciones ambientales.

Este trabajo tiene como objetivo determinar la incidencia e intensidad de la floración en el banco de germoplasma de caña de azúcar de Costa Rica, así como describir el comportamiento de la floración de los principales grupos de variedades por centro de origen que se encuentran presentes en nuestro país.

Materiales y métodos

Este estudio se realizó en el banco de germoplasma de caña de azúcar que fue creado y es manejado por el programa de variedades de la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar en Costa Rica. El mismo se encuentra ubicado en el distrito de San Miguel de Cañas, provincia de Guanacaste (10°20' 70" Latitud Norte y 85°09'37" Longitud Oeste), a una altitud de 10 msnm, en una zona de vida clasificada como Bosque Seco Tropical, con suelos de textura franca de origen Inceptisol. La evaluación se realizó en el año 2016, siendo la segunda soca del banco de germoplasma ya que este había sido cosechado el 25 de marzo de 2016. Por cada variedad se tiene sembrada una parcela constituida por un surco de tres metros de largo. Para obtener la información de floración se realizaron dos muestreos, uno a finales del mes de octubre y el otro a finales de noviembre. En cada muestreo se contaron diez tallos adultos por parcela de forma seguida, sin tomar en cuenta brotes ni tallos inmaduros (mamones).

Cuadro 1.

Datos climáticos de la estación meteorológica ubicada en el Ingenio Taboga Cañas Costa Rica, año 2016.

Mes	Temperatura media °C	Temperatura máxima °C	Temperatura mínima °C	HR% Media	Precipitación (mm)	ET(mm)	Viento km/h
Enero	28,11	32,91	23,3	66,36	0	179,58	9,89
Febrero	28,65	32,7	24,6	63,72	0	178,54	13,02
Marzo	29,82	34,95	24,69	63,26	0	186,96	8,92
Abril	30,02	35,33	24,71	68,09	143,72	164,69	7,29
Mayo	29,09	33,66	24,52	80,13	251,35	125,8	4,92
Junio	28,32	32,94	23,7	83,02	122,84	115,8	4,14
Julio	28,15	33,08	23,21	82,1	212,74	128,03	4,38
Agosto	28,04	32,91	23,17	85,65	324,69	114,62	3,25
Setiembre	27,9	33,03	22,76	85,97	75,07	119,4	2,89
Octubre	27,22	31,39	23,04	88,54	153,86	98,58	2,42
Noviembre	26,67	30,88	22,45	84,59	146,64	100,2	2,78
Diciembre	26,9	31,07	22,73	79,65	73,78	114,7	5,05
Promedio	28,24	32,9	23,57	77,59	1504,69	1626,9	5,75

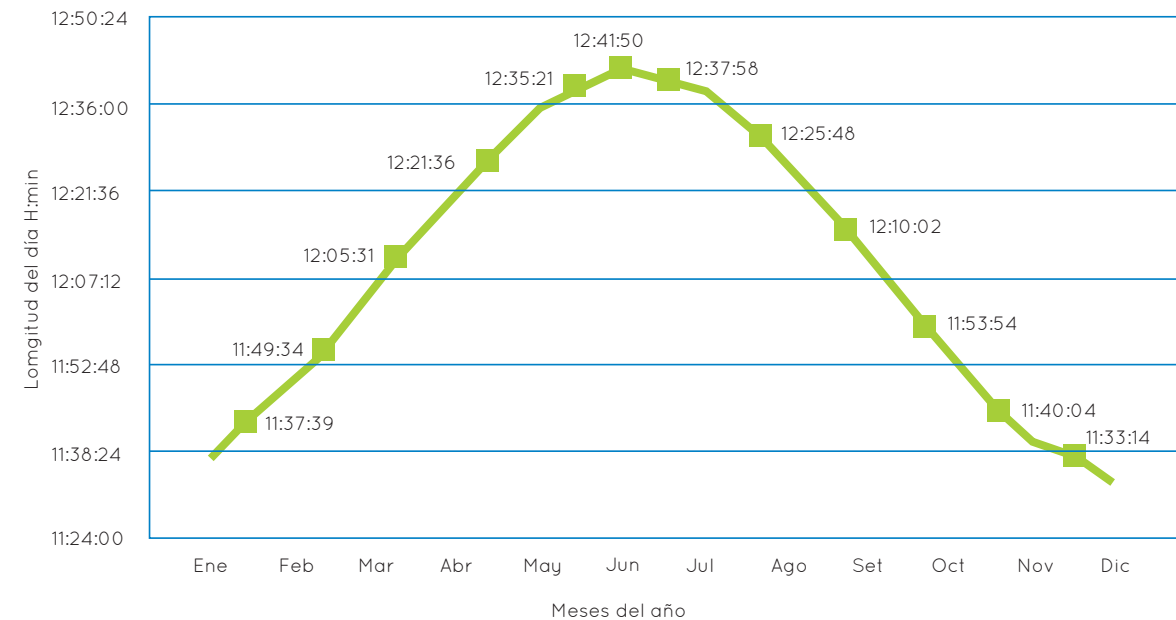


Figura 1.

Datos climáticos de la estación meteorológica ubicada en el Ingenio Taboga Cañas Costa Rica, año 2016.

SECCIÓN NOTAS TÉCNICAS

Evaluaciones realizadas

Incidencia de floración

Se determinó como variedades incidentes a todas aquellas que presentaron floración entre las dos evaluaciones.

Intensidad de floración

Esta variable se deriva del número de inflorescencias con respecto al número de tallos maduros totales en la unidad experimental, expresado en porcentaje. Para llegar a obtener esta variable se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Intensidad de floración} = \frac{\text{número de inflorescencias}}{\text{número de tallos maduros}} * 100$$

Cuadro 2.

Porcentaje de la intensidad de la floración utilizado en la evaluación del banco de germoplasma de caña de azúcar Costa Rica 2016.

Descripción	Intensidad (%)
Nula floración	0
Leve	1 - 20
Media	21 - 60
Intenso	61-80
Muy intensa	81 - 100

Fuente: Polo 2005

Días a floración

Es el tiempo que transcurre desde la fecha de corta del banco de germoplasma hasta el momento de la aparición de la flor, la cual se dividió en las dos categorías que fueron:

- Precoces: hasta octubre (< 220 días)
- Intermedias a tardías: entre noviembre y diciembre (221 - 280 días)

Discusión de resultados

Incidencia de floración

Al momento de hacer este estudio el banco de germoplasma (10°20' 70" latitud norte, 10 msnm) estaba conformado por 1045 materiales de 71 siglas diferentes, procedentes de 28 países alrededor del mundo (cuadro 3); de estos materiales, en el año 2016 se presentó floración en 549 variedades (52,53 %), bajo condiciones naturales.

Este resultado se encuentra cercano a lo reportado en distintas publicaciones de CENICAÑA Colombia, donde la floración es del 60% con 986 variedades ubicadas en la Estación Experimental de San Antonio (EESA) (3° 23', de latitud norte, 980 msnm) (Viveros *et al.* 1991). También CENICAÑA realizó evaluaciones para determinar el porcentaje de floración natural en la estación de México (14° 57' latitud norte, 366 msnm), donde el 71% de las variedades enviadas por CENICAÑA florecieron, mientras que en la EESA en Cali solo entre el 31 y 34% de las variedades evaluadas produjo inflorescencias (Viveros *et al.* 2009).

Mientras que en COPERSUCAR Brasil, en la Estación Experimental de Camamú (13° 55, de latitud sur), cerca del 92% de las 1,064 variedades que componen la colección de trabajo, florecen en forma natural (Viveros y Cassalet 1993 citado por Polo 2005).



En Ecuador la floración reportada en el banco de germoplasma (02° 19' 33' de Latitud Sur, 60 msnm) que está compuesto por 761 genotipos (610 variedades introducidas y 151 variedades y clones nacionales) fue de un 44 % (335 variedades), siendo los valores más altos registrados en los últimos 10 años (CINCAE 2017).

En el caso de Guatemala, posee dos bancos de germoplasma con 2575 materiales cada uno, donde para el 2015 tuvo un promedio de floración del 58% en la estación experimental Los Tarros (14° 23' 29" latitud Norte, 760 msnm) y de un 30% en la estación experimental Camantulul (14° 19' 30" latitud Norte, 280 msnm) (CENICAÑA 2017). Polo (2005) indica que para el caso de Guatemala,

para encontrar floración natural en la mayoría de variedades, es más apta la finca de Los Tarros donde este autor encontró un 71% de floración en 306 variedades de caña de azúcar.

En Australia la BSES Meringa (17° 04' latitud sur) reporta un promedio de floración del 40% de los materiales genéticos, entre los años 1978-2003 en su llamada colección activa de padres (Berding *et al.* 2004). Como indica Polo (2005), las causas de la incidencia de floración puede deberse a la especificidad de ciertas variedades respecto a las condiciones climáticas, la altitud y el factor genético y hormonal, ya que cada individuo presenta sus propios requerimientos para ser inducido a floración.

Cuadro 3.

Número de variedades de caña de azúcar ubicadas en el banco de germoplasma según origen y porcentaje de floración obtenido. Cañas Guanacaste. 2016.

Origen semilla sexual	Siglas	N° variedades	% N° Variedades	Variedades floreadas	% Variedades floreadas
USA	TCP, CL, CP, Lho, L, LCP, MER, HoCP, CPCL, Ho	373	35,69	344	92,23
Brasil	CB, CRP, CT, RB, SP, IANE, RBB	210	20,10	61	29,05
Barbados	D, DB, B, BT, BR, BJ, BBZ, BRD	164	15,69	18	10,98
México	LTMEX, MEX, ZMEX	53	5,07	23	43,40
Puerto Rico	PR	42	4,02	13	30,95
Colombia	CC, CCSP, MZC	37	3,54	12	32,43
Argentina	FAM, NA, RA, TUC	33	3,16	24	72,73
Oceania	Q, ATLAS, CATO, ENDOR, EROS, LUNA, MENTOR, PINDAR, RAGNAR, TRITON, TROJAN y WAYA	32	3,06	10	31,25
Costa Rica	LAICA	32	3,06	12	37,50
Continentes asiático	BO, COK, CO, PHIL, POJ, KNB, F	25	2,39	14	56,00
Cuba	C, JA, ML, MY, UCW	20	1,91	7	35,00
República Dominicana	RD, CR	7	0,67	3	42,86
Continentes africano	M, N, NCO	5	0,48	3	60,00
Guatemala	PGM, CGCP	5	0,48	3	60,00
Otros	IVP, V, CIMCA	7	0,67	2	28,57
		1045	100	549	

SECCIÓN NOTAS TÉCNICAS

Intensidad de floración

En las 549 variedades que florecieron en el banco de germoplasma, los porcentajes de floración variaron entre 10-100%, con un promedio de 72,0%; lo que se puede calificar como una

floración intensa, de acuerdo al parámetro utilizado (cuadro 2). Polo (2005) encontró una intensidad del 44% (300 msnm) y 36% (760 msnm) en su investigación de floración, lo que se califica como media.

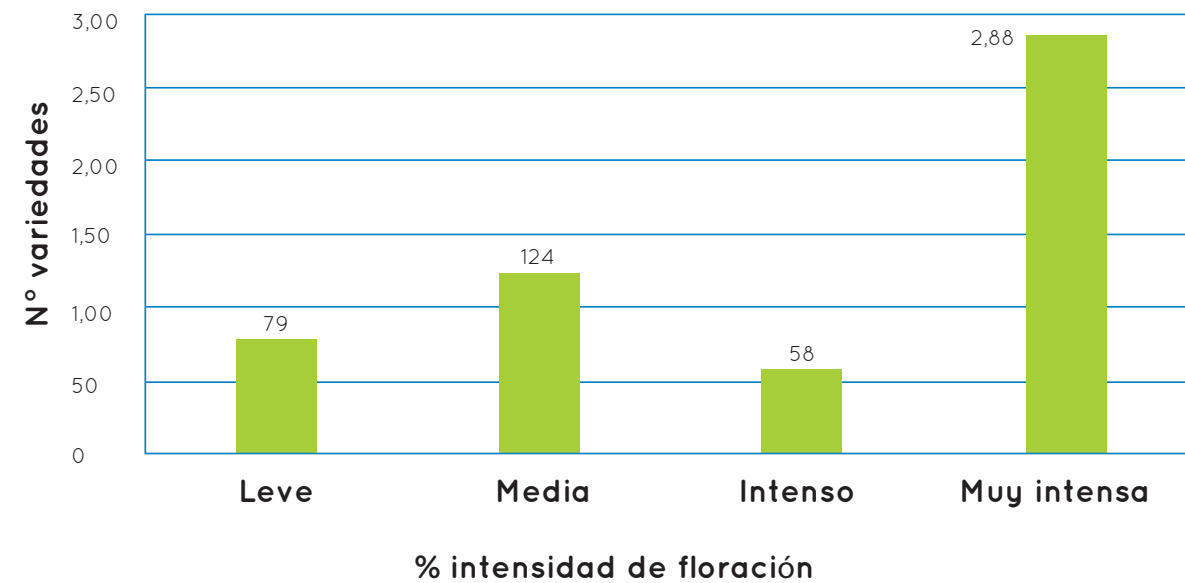


Figura 1.

Intensidad de la floración de las 549 variedades de caña de azúcar que presentaron flor en el banco de germoplasma DIECA, 2016.

Edad en días de las variedades para que se manifestara la floración

Con base en el tiempo que había transcurrido desde que estas parcelas habían sido cosechadas (25 de marzo de 2016) hasta la aparición de la flor, las mismas se ubicaron en dos categorías:

- Precoces: Presencia de flor antes del 31 de octubre de 2016 (< 220 días)

Con los resultados obtenidos en el primer muestreo, se encontraron un total de 44 variedades que presentaron floración antes de los 220 días de edad, con un rango entre 10 y 90% de los tallos



floreados, para un promedio de 36,14% de floración; estos materiales (44) representan el 4,2% del banco de germoplasma. Polo (2005) encontró las primeras inflorescencias en variedades a los 220 dds (estación Camantulul, 280 msnm) y a los 245 dds (subestación Los Tarros, 760 msnm); lo que indica que bajo las condiciones donde está ubicado el banco de germoplasma, las variedades precoces presentan floración de forma más anticipada. De las variedades de floración precoz, la mayoría son de origen de Estados Unidos (CP, HoCP, LHo, L, TCP), así como de otros países siglas Co, B, BT, C, Mex, NA, RB, PR, entre otras.

- Intermedias a tardías: Presencia de flor entre noviembre y diciembre de 2016 (221 - 280 días)

Con base en las dos evaluaciones de floración realizadas en el banco de germoplasma, se colocaron como variedades de floración intermedia y tardía a todos aquellos materiales que en la segunda evaluación aumentaron la intensidad de floración con respecto al primer muestreo. De las variedades que presentan floración intermedia a tardía fueron 545 materiales con un porcentaje de 72%, lo que indica que la concentración de la floración en nuestro país se da principalmente en los meses de noviembre y diciembre. Como lo indica Polo (2005), la caña de azúcar necesita de un periodo inductivo de 120 a 200 días en algunos materiales, donde la época de inducción de floración se presenta en el mes de agosto (Queme et al. 2011), debido a que la longitud del día (horas luz) se encuentra entre 12:30-12:15; por lo cual las variedades de caña de azúcar en Costa Rica presentan floración entre los meses de noviembre a diciembre con un periodo inductivo de 85-115 días.

Comportamiento de la floración de algunos grupos de variedades de caña de azúcar

Variedades de Estados Unidos

Entre los materiales presentes en el banco de germoplasma procedentes de USA se encuentran las siglas TCP, CL, CP, LHo, L, LCP, MER, HoCP,



CPCL y Ho; las cuales representan el 35,69 % (373 variedades). Para el año 2016, la floración de estos materiales fue del 92,23% (344 variedades) con una intensidad de floración de 83,31% la cual es calificada como **muy intensa**. En Costa Rica los materiales procedentes de USA presentan alta floración comúnmente y solo 29 variedades no presentaron flor los cuales son: CP 01-1424, CP 09-1726, CP 09-1823, CP 09-2074, CP 10-1207, CP 10-2338, CP 10-2474, CP 80-1743, CP 82-1172, CP 87-1248, CP 88-1573, CP 89-1268, CP 89-1756, CP 90-1428, CP 90-1464, CP 91-1560, CP 92-1168, CP 92-1641, CP 93-1256, CP 93-1309, CP 93-1688, CP 94-1266, CP 94-1481, CP 94-1489, CP 94-1500, CP 94-1604, L 82-43, MER 60-10 y MER 60-12.

En Costa Rica, las variedades procedentes de Estados Unidos más sobresaliente e importantes a la fecha han sido CP 72-2086 y CP 72-1210, ya que representan el 12,6 y 8,2 % respectivamente del territorio cultivado con caña de azúcar (Chaves 2015). Estas presentaron floración entre el 50% (CP 72-2086) y 100 % (CP 72-1210) durante el año 2016. Esta floración **muy intensa** de la CP 72-1210 ha provocado una fuerte disminución del área de siembra por materiales con menor floración.

Algo sobresaliente en este muestreo es que la variedad CP 87-1248 no presentó floración bajo estas condiciones, aunque en la región sur de Costa Rica, en suelos aluviones se ha encontrado hasta el 100 % de floración.

SECCIÓN NOTAS TÉCNICAS

Variedades de Brasil

Procedentes de Brasil se encuentran un total de 210 variedades de diferentes siglas CB, CRP, CT, RB, SP, IANE, RBB, las cuales representan un 20,10% del banco. De estos materiales, florecieron 61 (29,05%), con una intensidad promedio del 61,8% (**intensa**).

Entre las variedades brasileñas más sobresalientes que se encuentran en el banco de germoplasma, 35 son CT, 112 son RB y 53 son SP. De estas, durante el año 2016 florecieron: 16 CT (45,71 %), 29 RB (25,89 %) y 11 SP (20,75 %). Estos resultados nos indican que las variedades CT, aunque se presentan en menor número, demuestran la mayor cantidad de materiales floreadores (16), y la floración es intermedia a tardía, con una intensidad de 58,75%, calificada como **media**. De la sigla RB que es la mayoritaria de este origen, tres presentaron floración temprana y veintinueve intermedia a tardía, con una intensidad de floración de 60,69 % (**intensa**). Las variedades SP presentaron una floración promedio de 74,55 %, catalogada como intensa, además de ser materiales intermedios a tardíos.

Entre las variedades procedentes de Brasil, las siglas RB y SP han presentado buena adaptación a nuestras condiciones, es así como algunas de ellas han llegado a cultivarse comercialmente como la SP 71-5574, RB 73-9735, RB 86-7515, SP 70-1284, SP 79-2233, SP 81-2068, SP 81-3250 entre otras. Actualmente las variedades brasileñas más importantes en Costa Rica son la SP 81-3250 y RB 86-7515 que representan el 4,3 y 3,4% respectivamente del área destinada a caña de azúcar, con mucha opción al crecimiento, además de SP 81-2068, SP 70-1284 y SP 70-1143 con 1,9, 1,9 y 1,6% respectivamente de área de caña de azúcar (Chaves 2015).

Variedades originarias de Barbados

En este grupo se colocaron las variedades obtenidas con semilla sexual producida en Barbados, debido a que el comportamiento de los materiales es muy similar. Procedentes de esta isla se encuentran 164 variedades de diversas siglas como D, DB, B, BT, BR, BJ, BBZ y BRD, lo que representa el 15,69 % del banco de germoplasma.

De las 164 variedades, 18 presentaron floración

con una intensidad de 26,11% (**media**). En el caso de días a floración, 2 variedades fueron precoces y 16 de intermedios a tardíos; entre los materiales precoces se encontraron BT 93-320 y B 93-939 con una floración del 10 y 20% respectivamente. De las variedades de floración intermedia a tardía se encontraron B 50-377, B 84-118, B 86-654, B 91-841, B 97-1190, BBZ 81-08, DB 86-20, B 93-939, BBZ 80-240, BBZ 82-10, BT 92-320, B 82-430, B 86-1152, B 93-812, DB 85-91, B 86-967, B 82-213 y B 86-49 con un rango de floración entre el 10 y 70%.

Actualmente las variedades de este origen más sobresalientes en nuestro país son: B 82-333, B 80-689, B 76-259 y B 77-95 que representan el 10%, 3,1%, 2,2% y 1,5% respectivamente del territorio sembrado con caña de azúcar (Chaves 2015); las cuales bajo las condiciones naturales donde se encuentra ubicado el banco de germoplasma, ninguna presentó floración. La B77-95 y B 76-259 son variedades que se han adaptado a la Región Norte (60-80 msnm) y a la Región de Turrialba (550-800 msnm), en estas zonas si presentan floración debido a diferentes condiciones climáticas; donde B76-259 es calificada como de floración media y B 77-95 de floración leve (Chaves 2017).

Variedades procedentes de México

En el banco de germoplasma se encuentran 53 variedades de caña de azúcar procedentes de México de siglas MEX, LTMEX y ZMEX, lo que representa el 5,07% del banco. De estos 53 materiales, 23 presentaron floración (43,39%), con una intensidad del 52,17 %, clasificada como **media**.

Las variedades MEX 68-818 y MEX 69-1829 presentaron floración precoz con 10 y 30% respectivamente, y de floración intermedia a tardía se presentaron 22 variedades las cuales son: MEX 78-416, MEX 79-534, MEX 83-498, MEX 80-1428, MEX 83-254, MEX 80-402, MEX 83-484, MEX 56-476, MEX 79-536, MEX 59-32, MEX 65-1413, MEX 68-1345, MEX 69-1829, MEX 78-1907, MEX 80-422, MEX 83-419, Z-MEX 55-32, MEX 79-546, MEX 66-1235, MEX 79-567, MEX 65-1424 y MEX 81-414, estas presentaron floración en un rango de 10 al 100%.

Entre las variedades más importantes de origen mexicano, y de gran adaptabilidad a nuestras

diversas condiciones, se encuentra la MEX 79-431, que representa el 6,5% del área cañera del país. Curiosamente, esta se encuentra reportada como de floración media en la zona de Guanacaste y el Valle Central (Chaves 2017), pero en esta evaluación del banco de germoplasma no presentó flor.

Variedades procedentes de Puerto Rico

De las variedades procedentes de Puerto Rico con la sigla PR, en el banco de germoplasma se encuentran un total de 42 para un 4,02%, las cuales presentaron una floración que varío entre 10-100%, con un promedio de 55,38%, siendo su intensidad calificada como **media**.

La floración precoz se presentó en la variedad PR 86-2023 con un 30% y entre las variedades intermedias a tardías se encontraron PR 67-1070, PR 68-3120, PR 10-13, PR 85-2010, PR 80-2073, PR 86-2023, PR 87-2073, PR 62-195, PR 86-2027, PR 85-22, PR 87-2065, PR 87-2077 y PR 87-37.

La PR 80-2038 ha sido la variedad de mayor relevancia en nuestro país, principalmente en la Región Norte, donde abarca un 1,9% del territorio con caña de azúcar. Esta variedad presenta floración en esa zona de leve intensidad (Chaves 2017), aunque en el banco de germoplasma no presentó flor, esto debido a diferencias climáticas entre las dos regiones.

Variedades procedentes de Colombia

En el banco de germoplasma se encuentran 37 variedades colombianas de las siglas CC, CCSP y MZC, las cuales representan el 3,54%. De estos materiales, en el año 2016 se encontró floración en 12 de ellos, con un rango entre el 10 y el 80%, para una intensidad promedio de 28,33%, calificada como **media**.

Las 12 variedades que presentaron flor de intermedia a tardías fueron CC 91-1599, CC 93-4181, CC 93-4418, CC 01-1922, CC 82-15, CC 85-52, CC 92-2188, CCSP 89-1997, CC 87-434, CC 90-1160, CC 93-7513 y CC 97-7170.

Variedades procedentes de Argentina

De las variedades procedentes de Argentina de las siglas FAM, NA, RA y TUC, que han ingresado a

Costa Rica, 33 se encuentran en el banco de germoplasma, lo que representa un 3,16 %. De estas 33 variedades en el año 2016 florecieron 24, en un rango que osciló entre de 30-100%, con un promedio de 94,17%, calificada como de **muy intensa**. De las 24 variedades con flor, solo la NA 63-44 presentó floración precoz con 60% de intensidad, y de intermedias a tardías se encontraron NA 56-26, TUC 00-56, RA 94-42, NA 56-128, NA 63-44, NA 63-90, NA 685, RA 87-3, RA 89-28, RA 91-4, RA 94-33, RA 95-34, RA 97-8, RA 97-9, TUC 00-19, TUC 00-55, TUC 00-71, TUC 67-29, TUC 95-10, TUC 95-24, TUC 95-35, TUC 96-46, TUC 97-30 y TUC 97-7.

De las variedades provenientes de Argentina, dos materiales se han colocado como variedades comerciales NA 56-42 y NA 85-1602 las cuales conforman el 12 y 3,4% del área de caña de azúcar de Costa Rica. NA 56-42 no presentó flor en el banco de germoplasma; y en el caso de la NA 85-1602 no se encuentra actualmente en el banco, pero ambas variedades se encuentran reportadas como de floración media en la región de Guanacaste (Chaves 2017).

Variedades procedentes del continente oceánico

De las variedades provenientes del continente oceánico se encuentran las siglas Q, ATLAS, CATO, ENDOR, EROS, LUNA, MENTOR, PINDAR, RAGNAR, TRITON, TROJAN y WAYA, las cuales son 32 materiales para una representación del 3,06% del banco de germoplasma.

De los 32 materiales, 10 presentaron flor en la segunda evaluación, catalogándose así como de floración intermedia a tardía, con un rango que varío entre 10-90%, siendo el promedio de 31% (intensidad **media**). Las variedades que presentaron floración fueron ATLAS, Q 136, LUNA, Q 28, Q 58, TROJAN, EROS, Q 107, Q 141 y Q 138. La variedad de este grupo que ha sido más importante y que actualmente se siembra en las diferentes regiones de Costa Rica es la Q 96 procedente de Australia, que representa un 4,1% del territorio cañero. Esta variedad en el 2016 no presentó floración, aunque se encuentra documentado que florea con una intensidad media a intensa entre las distintas zonas cañeras (Chaves 2017). Además, la Q 132 y Q 138 tienen una representación del 1,4 y 1,0% del área cañera, respectivamente, donde Q 138 florea en un 90%.

CONCLUSIONES

- La incidencia de floración del banco de germoplasma en el año 2016 fue de un 52,53% y esta se debe principalmente a que está conformado en un alto porcentaje con variedades provenientes de Estados Unidos.
- La intensidad de floración en este banco de germoplasma se cataloga como intensa (promedio 72% en las variedades que presentaron flor).
- La floración predominante fue la intermedia a tardía (noviembre a diciembre) con 545 variedades y solo 44 presentaron flor de forma precoz (antes del 31 octubre).
- Los grupos de variedades presentan mucha variabilidad entre la intensidad e incidencia de la floración.



Agradecimientos

Se le agradece a Ing. Agr. Héctor Orozco de CENGICAÑA, Ing. Agr. Fernando Villegas de CENICAÑA y a Ing. Agr. Jose Molina del Ingenio Taboga por la información suministrada para la realización del trabajo.

Bibliografía

- Araldi, R. Silva, F. Orika, E. Rodrigues, J. 2010. Florescimento em cana-de-açúcar: Revisão bibliográfica. *Ciência Rural*, Santa María, 40 (3): 694-702, mar
- Arellano-Litardo, A, Korneva, S. Fischer, F. Tola, N. Ramos-Leal, M. Pincay-Flores, A. 2010. Obtención de semilla biotecnológica de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) de alta calidad genética y fitosanitaria en el Ecuador. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 17 (1): 101-110 Junio
- Bello-Bello, J.J. Morales-Ramos, V.; Gómez-Merino, F.C. 2014. Conservación de recursos genéticos en caña de azúcar. *Agroproductividad* 7 (2): 42-46. Marzo-abril
- Berding, N. Dunne, V. Swain, R.S. Owens, W.G. 2004. Tropical, managed initiation of sugarcane flowering: optimisation of non-photoperiodic variables. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.* 26: 1-13
- Carabaloso, V. Garcia, H. Jorge, H. Bernal, N. 2011. Influencia del ambiente en la floración de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en la región central de Cuba. *Agrotecnia de Cuba* 35 (1): 12-17.
- Castillo, R. Silva, E. 2004. Fisiología, floración y mejoramiento genético de la caña de azúcar en Ecuador. *Publicación Técnica No. 3. Programa de Variedades del CINCAE.* Guayaquil, Ecuador. 27p.

CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar). 2017. Informe Anual 2015-2016. Cotz, Guatemala. 178 p.

Chaves, M.A. 2013. Composición del banco de germoplasma de caña de azúcar de Costa Rica. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA, enero. 28 p.

Chaves, M.A. 2015. Principales variedades de caña cultivadas comercialmente en algunos países de tradición azucarera del Continente Americano. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA, marzo. 26 p.

Chaves, M.A. 2017. Floración de la caña de azúcar. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA, abril. 69 p.

CINCAE (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador). 2017. Informe Anual 2016. El Triunfo, Ecuador. 70 p.

Gómez, N. 2015. Inducción a la floración en caña de azúcar. Famaillá, Tucumán, Argentina. Práctica profesional: Modalidad Practicantado Agronómico. Universidad Nacional de Tucumán. 45 p.

Polo, P. 2005. Caracterización de la floración en 306 variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) con fines de mejoramiento para dos localidades de la zona cañera de Guatemala. Tesis Lic. Ciudad de Guatemala, Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. 67 p.

Quemé, J.L. Orozco, H. Castro, O. Buc, R. Ralda, G. López, A. Acán, J. Solares, E. Natareno, E. Coronado, M. 2011. Floración de la caña de azúcar y sus efectos en variables relacionadas con la productividad de azúcar. Presentación PowerPoint. Cengicaña, Cotz. Guatemala. 33p.

Silva, E. Martínez, F. Madrid, C. León, T. 2013. La floración en caña de azúcar, su manejo para mejoramiento genético y en la producción comercial. III Congreso AETA, Sep.18-20 del 2013. Guayaquil-Ecuador

Viveros, C. Baena, D. Palma, A. Salazar, F. Victoria, J. Flores, C. Ranjel, H. 2009. Contribución de los cruzamientos hechos en México en el proceso de obtención de variedades Cenicaña Colombia. *Carta Trimestral, Cenicaña.* V.31, nos. 3 y 4. p. 23-26

Viveros, C. Cassalett, C. López, Y. 1991. Efecto de la edad de la planta y de diferentes tratamientos fotoinductivos en la floración de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) *Acta Agronómica.* 41(1/4): 37-45.

